

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten,
plastische und ästhetische Operationen
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen

**Einfluss nativer und andifferenzierter mesenchymaler
Stammzellen auf Proliferation und Vitalität von
Kopf-Hals-Tumorzellen *in vitro***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Magdalena Steber

aus Zusmarshausen

Würzburg, Juni 2019

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser, MHBA
Korreferent/Korreferentin: Priv.-Doz. Dr. med. Ernst Joachim Diessner
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Februar 2020
Die Promovendin ist Ärztin.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Entstehung, Epidemiologie und Therapie von Kopf-Hals-Tumoren	1
1.2	Mesenchymale Stammzellen <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i>	3
1.3	Interaktion von mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen	6
1.4	Interleukin-6 als ein zentraler Mediator	9
1.5	Mesenchymale Stammzellen in der zielgerichteten Tumorthherapie	12
1.6	Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material	15
2.1.1	Lösungen und Puffer	15
2.1.2	Geräte	17
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	19
2.1.4	Medien und Reagenzien	20
2.1.5	Software	25
2.2	Versuchsaufbau	26
2.3	Zellkultur	28
2.3.1	Isolierung der Stammzellen aus Spongiosa	28
2.3.2	Vitalitätsmessung und Zellzählung	29
2.3.3	Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen	30
2.3.4	Verwendete Tumorzelllinien und deren Kultivierung	30
2.3.5	Kryokonservierung von Zellen	31
2.4	Methoden zur Charakterisierung der mesenchymalen Stammzellen	31
2.4.1	Differenzierung	32
2.4.2	Histologische Färbungen	33
2.4.3	Durchflusszytometrie	34
2.4.4	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion	36
2.5	Quantifizierung der Tumorzellproliferation	41
2.5.1	Proliferationsassay der Tumorzellen mit nativen mesenchymalen Stammzellen	42
2.5.2	Proliferationsassay der Tumorzellen mit Überstand andifferenzierter mesenchymaler Stammzellen	43
2.5.3	Proliferationsassay der Tumorzellen in Co-Kultur mit andifferenzierten mesenchymalen Stammzellen	43

2.6 Zytokin-Analyse.....	44
2.6.1 Dot Blot Assay als Screening für Zytokine und Wachstumsfaktoren.....	44
2.6.2 ELISA zur IL-6 Bestimmung	46
2.7 Evaluation der pERK1/2- und pSTAT3-Expression im Western Blot.....	48
2.7.1 Herstellung der Proben für den Western Blot	48
2.7.2 Proteinbestimmung.....	49
2.7.3 Elektrophorese und Blotten	49
2.7.4 Antikörper-Inkubation und Chemolumineszenz	51
2.7.5 Densitometrische Auswertung der Banden	52
2.8 Graphische Darstellung	52
2.9 Statistische Auswertung	52
3 Ergebnisse	54
3.1 Ergebnisse der Charakterisierung der mesenchymalen Stammzellen	54
3.1.1 Nachweis der Differenzierung anhand von histologischen Färbungen	54
3.1.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenmarker	55
3.1.3 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion der osteogenen und adipogenen Andifferenzierung.....	56
3.2 Ergebnisse der Proliferationsassays	57
3.2.1 Ergebnisse des Proliferationsassays mit nativen mesenchymalen Stammzellen.....	58
3.2.2 Ergebnisse des Proliferationsassays mit Überstand andifferenzierter mesenchymaler Stammzellen.....	61
3.2.3 Ergebnisse des Proliferationsassays in Co-Kultur mit andifferenzierten mesenchymalen Stammzellen	64
3.3 Ergebnisse der Zytokin-Analyse.....	67
3.3.1 Dot Blot Assay: Überblick über beteiligte Zytokine	67
3.3.2 Auswertung der IL-6 Konzentration in den Überständen durch ELISA	69
3.4 Ergebnisse des Western Blots: Evaluierung proliferationsfördernder Signalwege.....	70
3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse.....	74
4 Diskussion.....	76
4.1 Evaluierung der verwendeten Methoden	76
4.1.1 Andifferenzierung als Möglichkeit der Modifikation der MSC.....	76
4.1.2 Vor- und Nachteile der Zellkultur	78

4.1.3 Proliferationsassays zur Quantifizierung des Einflusses der mesenchymalen Stammzellen auf die Proliferation der Tumorzellen.....	78
4.1.4 Analyse der Zytokine und Signalwege.....	80
4.2 Hinweise für proliferationshemmende Effekte	82
4.3 Hinweise für proliferationssteigernde Effekte	84
4.4 Mesenchymale Stammzellen in der Tumorthherapie - Möglichkeiten und Herausforderungen.....	86
5 Zusammenfassung	91
6 Anhang	93
6.1 Zusammenstellung der Ergebnisse des Proliferationsassays und zugehöriger IL-6 Konzentrationen	93
6.2 Abbildungsverzeichnis.....	102
6.3 Tabellenverzeichnis.....	104
6.4 Literaturverzeichnis	104
6.5 Kongressbeiträge und Publikation mit Inhalten der vorliegenden Arbeit...	118

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
adipo-Co-Kultur	Co-Kultur mit adipogen andifferenzierten MSC
adipo-Überstand	Überstand adipogen andifferenzierter MSC
ALPL	alkalische Phosphatase
AML	akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Aqua dest.	Aqua destillata
BCA	Bicinchoninic Acid
BGLP	Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein
BMP	Bone Morphogenetic Protein
BSA	bovines Serumalbumin
bspw.	beispielsweise
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CCL	CC-Chemokinligand
CD	Cluster of Differentiation
d. h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphate
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EM	Expansionsmedium
engl.	englisch

ERK1/2	Extracellular Signal-regulated Kinases 1/2
FABP4	Fatty Acid Binding Protein 4
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor
GRO	Growth-related Oncogen
h	Stunde
HNSCC	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma
HRP	Horseradish Peroxidase
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthine
IL	Interleukin
l	Liter
LEP	Leptin
LPL	Lipoproteinlipase
M	Stoffmengenkonzentration (mol/l)
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-activated Protein Kinase
MCP1	Monocyte Chemoattractant Protein 1
M-CSF	Macrophage Colony-stimulating Factor
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mm	Millimeter
MSC	Mesenchymal Stem Cell
nat-Co-Kultur	Co-Kultur mit nativen MSC
nat-Überstand	Überstand nativer MSC
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
osteo-Co-Kultur	Co-Kultur mit osteogen andifferenzierten MSC

osteo-Überstand	Überstand osteogen andifferenzierter MSC
PBS	Phosphate-buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PG	Prostaglandin
pg	Picogramm
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay
RNA	Ribonucleinsäure
rpm	Revolutions per Minute
RPMI	Rosewell Park Memorial Institution
RT	Raumtemperatur
RUNX2	Runt-related Transcription Factor 2
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
STAT3	Signal Transducers and Activators of Transcription 3
TAF	Tumor-assoziierte Fibroblasten
TBS	Tris-buffered Saline
TBS-T	Tris-buffered Saline with Tween20
TGF	Transforming Growth Factor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
V	Volt
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vgl.	vergleiche
z. B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Entstehung, Epidemiologie und Therapie von Kopf-Hals-Tumoren

Damit aus einer gesunden Zelle eine maligne Tumorzelle entsteht, durchläuft sie eine komplexe Entwicklung. Sie muss zusätzliche Fähigkeiten akquirieren, wie wachstumshemmenden und apoptoseinduzierenden Signalen zu entgehen und sich selbst mit Wachstumssignalen zu versorgen. Sie benötigt die Möglichkeit zur unbegrenzten Replikation, Gewebeinvasion und Metastasierung. Außerdem muss sie zusammen mit den anderen Tumorzellen die eigene Blutversorgung aufrechterhalten und die dazu nötige Angiogenese induzieren. Diese Eigenschaften wurden von Hanahan und Weinberg im Jahr 2000 als die sogenannten Hallmarks of Cancer beschrieben, ohne die eine gesunde Zelle nicht zur Tumorzelle werden kann [Hanahan et al., 2000]. 2011 ergänzten Hanahan et al. ihre Liste um weitere Punkte: die Fähigkeiten, der Zerstörung durch das Immunsystem zu entgehen, Veränderungen im zellulären Metabolismus vorzunehmen sowie die genetische Instabilität, die weitere Mutationen begünstigt [Hanahan et al., 2011]. Bis heute ist der Prozess der Tumorentstehung (Karzinogenese) noch nicht im Detail verstanden, für die Entwicklung neuer Therapieoptionen jedoch essenziell. Diese sind unter anderem für Kopf-Hals-Tumore dringend nötig, da deren Diagnose trotz moderner Therapie noch immer mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergehen.

Die 2017 veröffentlichten Zahlen des Zentrums für Krebsregisterdaten des Robert Koch-Instituts fassen alle bösartigen Erkrankungen der Mundhöhle und des Rachens (ICD-10: C00-C14) zusammen. Für Deutschland zeigte sich im Jahr 2014 eine Erkrankungsrate je 100.000 Personen von 23,00 für Männer und 9,0 für Frauen. Davon waren 90 % Plattenepithelkarzinome und etwas mehr als 5 % Adenokarzinome. Die relative 5-Jahre-Überlebensrate war mit 48 % bei den Männern und 59 % bei den Frauen im bundesdeutschen Durchschnitt nach wie vor gering. Auch von Larynxkarzinomen waren Männer wesentlich häufiger betroffen als Frauen. Je 100.000 Personen erkrankten 7,5 Männer bzw. 1,3

Frauen. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate lag bei 63 % bzw. 64 % [Kaatsch et al., 2017].

Zu den wichtigsten Risikofaktoren für die meisten Kopf-Hals gehören Nikotin- und Alkoholkonsum. Diese werden in Ländern mit hohem Durchschnittseinkommen für 80 %, in Länder mit niedrigem Durchschnittseinkommen für 42 % der Todesfälle durch Kopf- und Halstumore verantwortlich gemacht [Danaei et al., 2005]. Daneben werden außer genetischer Veranlagung noch zahlreiche weitere Risikofaktoren genannt, wie z. B. eine vitaminarme, fleischreiche Ernährung, mangelnde Mundhygiene, Kontakt mit Holzstäuben oder bestimmten Chemikalien. Für Larynxkarzinome ist ein erhöhtes Risiko bei beruflicher Exposition gegenüber verschiedenen Stoffen, insbesondere Asbest, bekannt [Brown et al., 2012; Kaatsch et al., 2017].

Die Rolle von Infektionen bei der Karzinogenese ist Gegenstand aktueller Forschung. Von besonderer Bedeutung für Karzinome vor allem des Oropharynx sind Infektionen mit einer der Hochrisikogruppen der humanen Papillomaviren (HPV) [Kaatsch et al., 2017]. In einer Metaanalyse mit Daten aus 148 Studien mit über 12.000 Fällen von Kopf-Hals-Tumoren aus 44 Ländern lag die HPV-DNA Prävalenz bei 29,5 %. Man geht davon aus, dass beide zugelassenen HPV-Impfstoffe, Gardasil und Cervarix, neben dem Schutz vor Zervixkarzinomen einen positiven Effekt auf die Entwicklung von Tumoren des Oropharynx haben könnten. Jedoch fehlen bisher Langzeitstudien und detaillierteres Verständnis für die molekularbiologischen Ähnlichkeiten und Unterschiede zwischen genitalen und oralen HPV-Infektionen [Takes et al., 2015].

Da HPV-positive Kopf-Hals-Tumore ein besseres Ansprechen auf die Therapie und damit auch eine bessere Überlebensrate zeigen, ist eine Diskussion um die Anpassung der entsprechenden Therapieempfehlungen entstanden [Fakhry et al., 2008; Fung et al., 2017].

Der Großteil der Therapien sämtlicher Kopf-Hals-Tumore wird nach wie vor auf Grundlage der drei traditionellen Säulen bestritten: chirurgische Resektion, Radiatio und Chemotherapie. Abhängig von Lokalisation und Stadium des Tumors wird individuell für den Patienten die Therapie, häufig bestehend aus einer Kombination der genannten Optionen, ausgewählt. Eine alleinige

Chemotherapie wird lediglich in palliativen Behandlungssituationen eingesetzt. Bei fortgeschrittenen Krankheitsverläufen sind seit einigen Jahren monoklonale Antikörper zugelassen. Für Cetuximab, einem Antikörper gegen den Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR), sowie für die Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab konnte ein positiver Effekt auf die mediane Überlebensrate nachgewiesen werden. Als Antikörper gegen das Programmed Death Protein (PD)-1 reduzieren diese die Fähigkeit der Tumorzellen, der Zerstörung durch das Immunsystem zu entgehen [Blasco et al., 2017; Kurzweg et al., 2016].

Um die Nebenwirkungen auf den Organismus zu reduzieren und gleichzeitig die Wirkung auf das Tumorgewebe zu steigern, ist eine möglichst zielgerichtete Therapie wünschenswert. Ein neuer Ansatz im Sinne der sogenannten Targeted Therapy stellt die Verwendung mesenchymaler Stammzellen dar [Stuckey et al., 2014].

1.2 Mesenchymale Stammzellen *in vivo* und *in vitro*

Bevor über Stammzellen als Therapieoption nachgedacht werden kann, sollte ihre physiologische Funktion im menschlichen Körper betrachtet werden. Ohne sie wäre weder die Entstehung noch der Erhalt eines Organismus möglich. Ein Embryo im sogenannten 8-Zell-Stadium besteht aus totipotenten Stammzellen. Aus ihnen kann sowohl die Plazenta als auch der komplette Embryo entstehen. Im weiteren Prozess verringert sich die Potenz der Stammzellen. Aus pluripotenten Stammzellen können alle Zellen des menschlichen Körpers hervorgehen, jedoch keine Plazenta. Nach der Geburt sind die Stammzellen im menschlichen Körper noch höchstens multipotent. Dazu zählen z. B. die mesenchymalen und hämatopoetischen Stammzellen. Aus diesen können weiterhin mehrere verschiedene Zelltypen entstehen. Wenn aus Stammzellen wenige oder nur ein Zelltyp hervorgehen kann, werden sie als oligo- bzw. unipotent bezeichnet [Lüllmann-Rauch et al., 2015]. Allen Stammzellen gemein sind laut Lüllmann-Rauch die Fähigkeit zur Selbsterneuerung, ein langsam laufender Zellzyklus sowie ein niedriger Differenzierungsgrad. Dadurch wird die lebenslange Erneuerung und Regeneration des Organismus gewährleistet [Lüllmann-Rauch et al., 2015].

In der vorliegenden Arbeit wurden humane mesenchymale Stammzellen (MSC) verwendet. Mesenchym beschreibt zunächst das embryonale Bindegewebe, welches für den Rumpf aus dem Mesoderm, dem mittleren Keimblatt, und für den Kopf aus der Neuralleiste entsteht, welche wiederum aus dem Ektoderm hervorgeht. Doch auch im postnatalen Körper bilden sich aus den multipotenten MSC weiterhin die Zellen des Bindegewebes, Knochens, Knorpels, Fetts und glatten Muskels [Lüllmann-Rauch et al., 2015].

Die Nomenklatur der Zellen ist nach wie vor nicht eindeutig. Die Abkürzung MSC wird in der Literatur sowohl für Mesenchymal Stromal Cells als auch für Mesenchymal Stem Cells verwendet und die Bezeichnungen werden wiederum teilweise synonym verwendet. Horwitz forderte 2005, dass mesenchymale Stroma-Zellen als Begriff für alle fibroblastenartigen und plastikadhärent wachsende Zellen angewandt werden sollte, unabhängig davon, aus welchem Gewebe sie isoliert worden sind. Mesenchymale Stammzellen hingegen bedurften weiterer Definition und Charakterisierung [Horwitz et al., 2005]. Dafür legten er (2005) und Dominici (2006) mit der International Society for Cellular Therapy die folgenden Minimalkriterien für mesenchymale Stammzellen fest:

- Plastikadhärenz unter Standardkulturbedingungen
- spezifisches Expressionsmuster von Oberflächenmarkern (CD, engl. Cluster of Differentiation)
 - positiv für: CD73, CD90, CD105
 - negativ für: CD34, CD45, CD14 oder 11b, CD79 oder CD19, HLA-DR
- Differenzierbarkeit in Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten *in vitro*, durch histologische Färbung nachweisbar [Dominici et al., 2006; Horwitz et al., 2005].

Die erste dokumentierte Isolierung von MSC gelang Alexander Friedenstein vor über 50 Jahren aus dem Knochenmark von Mäusen. Er beobachtete, dass diese Zellen die Fähigkeit zur Osteogenese besaßen, jedoch nicht zur Hämatopoese [Friedenstein et al., 1966]. Weitere Meilensteine in der Forschung zu dieser Zellart legten unter anderem Owen, der 1988 erste Beweise dafür fand, dass multipotente, stromale Stammzellen auch außerhalb des Knochenmarks zu finden seien [Owen, 1988] und Caplan, der 1991 bereits das Potential sah, die MSC eines Tages zu

therapeutischen Zwecken einzusetzen [Caplan, 1991]. Pittenger et al. zeigten 1999 die *in vitro* Differenzierbarkeit der aus humanem Knochenmark gewonnenen MSC in Adipozyten, Osteozyten und Chondrozyten [Pittenger et al., 1999].

Tatsächlich gelang über die Jahre die Isolierung von MSC aus unterschiedlichen Geweben: neben Knochenmark vor allem aus Fettgewebe [Dubois et al., 2008; Zuk et al., 2002; Zuk et al., 2001], aber auch aus zahlreichen weiteren, wie z. B. Synovialmembran [De Bari et al., 2001], Zahnpulpa [Gronthos et al., 2000], Tonsillen [Janjanin et al., 2008], Nabelschnurblut [Erices et al., 2000], Nebenschilddrüse [Shih et al., 2009] und Brustmilch [Patki et al., 2010].

Generell wird derzeit vermutet, dass die meisten MSC perivaskulär zu finden sind, von wo aus sie bei Entzündung oder Gewebeschaden aktiviert werden, sich teilen, differenzieren und Zytokine sowie Wachstumsfaktoren ausschütten [Crisan et al., 2008; da Silva Meirelles et al., 2008]. Dazu passt die Beobachtung, dass nach einer Verletzung neugebildete Chondrozyten bzw. Osteoblasten aus markierten Perizyten entstehen, wie Diaz-Florez bereits 1991 bzw. 1992 schilderte [Diaz-Flores et al., 1991; Diaz-Flores et al., 1992].

Obwohl intensiv danach geforscht wird, ist es bisher nicht gelungen, einen gemeinsamen spezifischen Marker für MSC zu finden [Boxall et al., 2012; Busser et al., 2015]. Das Fehlen eines eindeutigen Markers erschwert auch die *in vivo* Identifikation und Charakterisierung von MSC, sodass deren physiologische Aufgaben noch nicht vollständig untersucht und verstanden wurde, zumal sie sich je nach Gewebe und Stimuli unterscheiden [Keating, 2012; Shi, 2012].

Keating sah eine Perspektive in der Identifikation von Transkriptom (Gesamtheit der vorliegenden RNA-Moleküle, also transkribierte Gene), Proteom (Gesamtheit der vorliegenden Proteine) und Sekretom (Gesamtheit aller sezernierten Zytokine) von MSC und bezog sich dabei auf Ranganath et al., die sich in ihrer Arbeit bereits der Definition des Sekretoms der MSC und dessen therapeutischen Potentials näherten [Keating, 2012; Ranganath et al., 2012].

Die sezernierten Stoffe der MSC wirken sowohl auto- als auch parakrin und helfen bei der Begrenzung des Gewebeschadens und der Regeneration. Es gibt Hinweise, dass sie die lokale Immunreaktion supprimieren, Fibrose und Apoptose in der Umgebung der Verletzung verhindern, Angiogenese fördern und

gewebeeigene Stammzellen zur Mitose und Differenzierung anregen [Caplan et al., 2006]. Zudem wird ihnen auch eine Rolle bei der Regulierung der Hämatopoese im Knochenmark zugeschrieben [Kfoury et al., 2015; Mendez-Ferrer et al., 2010].

Wie Dvorak bereits 1986 beschrieb, haben Tumore Ähnlichkeit mit einer nicht-heilenden Wunde [Dvorak, 1986]. In diesem Sinne reagieren MSC auf Tumore ähnlich wie auf Wunden oder Verletzungen. Sie werden sowohl aus dem den Tumor umgebenden Fettgewebe als auch aus weiter entferntem Knochenmark rekrutiert und migrieren zum Tumor [Bergfeld et al., 2010; Kidd et al., 2012; Zhang et al., 2012]. Diese Eigenschaft der MSC wird als Tumortropismus bezeichnet. Wie die Rekrutierung aus dem Knochenmark und anderen Organen vermittelt wird und das sogenannte Homing, der Übertritt der Zellen vom Blutkreislauf ins Gewebe, abläuft, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt [De Becker et al., 2016; Droujinine et al., 2013]. Es gewisse Ähnlichkeit zum Homing von Lymphozyten wird angenommen. Die Hypothese wird durch Versuche im Mausmodell gestärkt, die Hinweise auf die Substanz P als wichtigen Mediator gaben [Hong et al., 2009; Vishwanath et al., 1996]. Vermutlich wird der Tumortropismus der MSC über ein komplexes Zusammenspiel aus Zytokinen, Chemokinen, mechanische Veränderungen des Blutkreislaufs und weiteren bisher unbekanntem Mechanismen gesteuert. Am Tumor angekommen, integrieren sich die MSC in das Tumorstroma [Droujinine et al., 2013].

1.3 Interaktion von mesenchymalen Stammzellen und Tumorzellen

Entgegen der landläufigen Vorstellung, Tumore bestünden aus Zellen, die völlig autonom auf Basis von intrazellulären Mutationen ungehemmt proliferieren, ergibt sich durch die Forschung der letzten Jahre ein immer klarer werdendes Bild der komplexen Interaktion der Tumorzellen sowohl mit dem Gewebe in der unmittelbaren Umgebung als auch mit dem gesamten Organismus.

Diese Kommunikation des Tumors mit dem Organismus findet auf zahlreichen Ebenen statt. So z. B. zwischen Bestandteilen der Extrazellulärmatrix, löslichen Faktoren sowie verschiedensten Zellklassen, welche in der Lage sind, den Zellzyklus, die Apoptose und Migration von Tumorzellen zu beeinflussen [Hanahan

et al., 2011]. Hanahan beschreibt in seiner Arbeit „Hallmarks of cancer: next generation“ Tumore als Organ. Die eigentlichen Krebszellen entsprechen dem Parenchym. Das Stroma, also das Gerüstgewebe des Tumors, besteht aus nicht entarteten Zellen, wie beispielsweise Endothelzellen, Perizyten, Zellen des Immunsystems, Fibroblasten sowie Extrazellulärmatrix. Der Begriff des Tumormikromilieus beschreibt diese direkte Umgebung des Tumors. Es entsteht ein komplexes Zusammenspiel zwischen verschiedenen Zellarten. Dies wirft zahlreiche weitere Fragen auf. So ist z. B. nach wie vor ungeklärt, ob das Fortschreiten des Tumors die Zusammensetzung des Tumormikromilieus verändert oder dieses die Tumorzellen erst zur Progredienz, Invasion und Metastasierung anregt [Hanahan et al., 2011].

Auch MSC, die zum Tumor migrieren, integrieren sich in dieses Mikromilieu. Ihre Funktionen und Wirkungen im „Organ Tumor“ sind vielseitig und unterscheiden sich je nach Tumor und Herkunft. Zum Beispiel migrierten und proliferierten intravenös applizierte MSC im Mausmodell ausschließlich in Tumoren und durchliefen eine unterschiedliche Differenzierung, je nachdem um welchen Tumor es sich handelte [Wang et al., 2009]. In einem anderen Versuch fanden sich nach Veränderung des Tumormikromilieus durch Bestrahlung die applizierten MSC an unterschiedlichen Stellen im Tumor: ohne Bestrahlung vor allem perivaskulär und nach Bestrahlung hingegen überwiegend im Tumorparenchym [Klopp et al., 2007]. In zahlreichen Reviews wird über die Rolle von MSC in Tumoren diskutiert (u. a. [Bergfeld et al., 2014; Bergfeld et al., 2010; Droujinine et al., 2013; Klopp et al., 2011]).

Die Organisation der MSC im Tumor, ihre Lebensdauer sowie ihre Differenzierung werden von einer Vielzahl an Zytokinen und Wachstumsfaktoren gesteuert. Interleukin (IL)-6, Wnt5a, Transforming Growth Factor (TGF)- β , C-X-C Motif-Chemokin-Rezeptor (CXCR) 4 sind einige Beispiele für bioaktive Substanzen, die unter anderem von Myofibroblasten sezerniert werden und in einem engen Zusammenspiel mit Inhibitoren zur Kommunikation zwischen MSC und Myofibroblasten beitragen [Quante et al., 2011].

In einer Studie von Kidd et al. 2012 wurde gezeigt, dass die tumorassoziierten Fibroblasten (TAF) vor allem aus MSC aus dem Knochenmark hervorgehen. Die Zellen des vaskulären und fibrovaskulären Tumorstromas hingegen bilden sich

vor allem aus MSC des den Tumor umgebenden Fettgewebes [Kidd et al., 2012]. Die neuen Perizyten ermöglichen in Verbindung mit dem Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und anderen, von MSC sezernierten Faktoren, die Angiogenese des Tumors [Beckermann et al., 2008; Zhang et al., 2012]. Die TAF sind ebenso sekretorisch aktiv und tragen über diesen Weg zu Wachstum und Angiogenese des Tumors bei [Orimo et al., 2005].

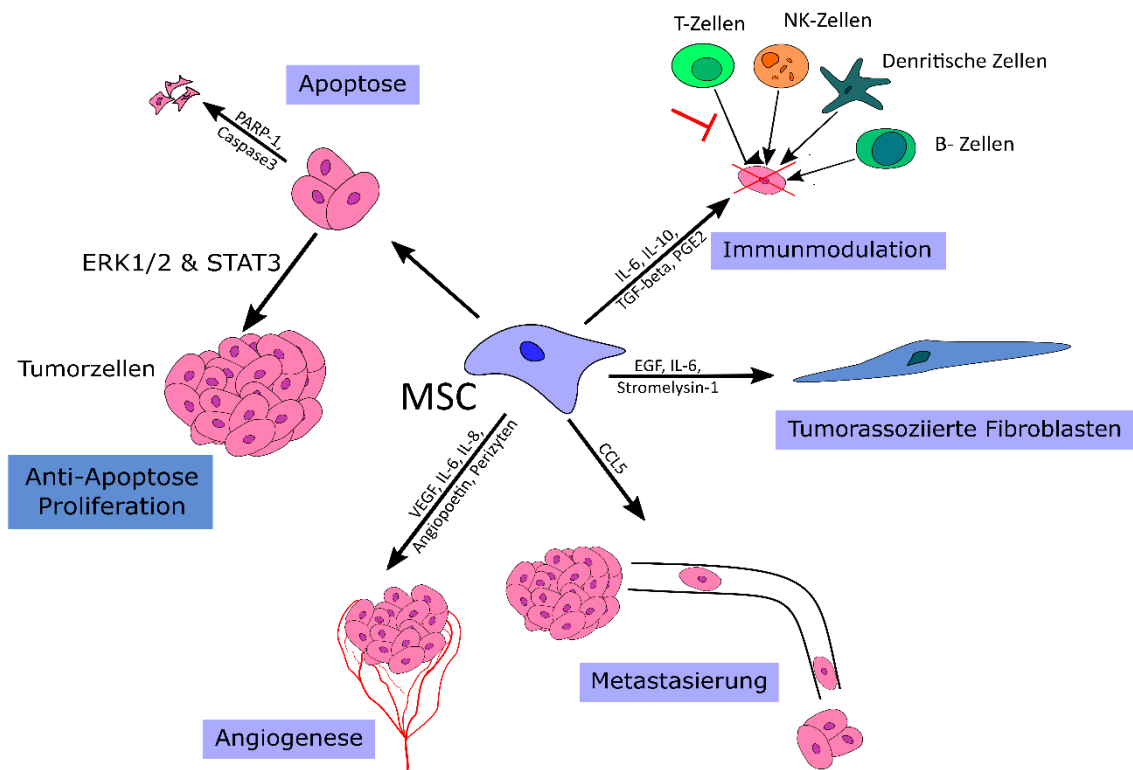


Abbildung 1. Funktionen von MSC in Tumoren
 Das Schema zeigt Funktionen mit beteiligten Zytokinen und Signalwegen, die MSC in Tumoren zugeschrieben werden. Diese Arbeit setzt sich vor allem mit dem Aspekt der Proliferation, unter anderem vermittelt durch ERK1/2 und STAT3, auseinander. Für die ausführlichere Beschreibung siehe Text. Diagramm modifiziert nach [Bergfeld et al., 2010; Droujinine et al., 2013]

Auch eine Beteiligung der MSC an der Regulierung der Metastasierung wurde nachgewiesen. Über Zytokin-Interaktionen wird die sogenannte epitheliale-mesenchymale Transition und damit Motilität und Extravasation der Tumorzellen vermittelt, wobei der Einfluss der MSC sowohl hemmend als auch fördernd sein kann [Bohrnsen et al., 2015; Karnoub et al., 2007; Scherzed et al., 2013].

Generell wirken MSC immunmodulatorisch. Bei Wunden und Verletzung ist dies nützlich, da verletzte Zellen vor einem Angriff des Immunsystems geschützt

werden, was zur Wundheilung beiträgt. Auch im Falle eines Tumors kann diese Eigenschaft der MSC die Zerstörung der Tumorzellen durch das Immunsystem verhindern [Droujinine et al., 2013]. Dieses Phänomen wird Immunescape genannt. MSC beeinflussen sämtliche Zellen des Immunsystems vor allem über Zytokin-Sekretion, wie z. B. IL-6, IL-10, TGF β , Prostaglandin (PG)-E2 etc. Dadurch werden Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, T-Helfer- und zytotoxische T-Zellen, B-Zellen, natürliche Killerzellen sowie dendritische Zellen in Proliferation, Differenzierung bzw. Wirkung gehemmt [Djouad et al., 2003; Ghannam et al., 2010; Nauta et al., 2007; Uccelli et al., 2008].

1.4 Interleukin-6 als ein zentraler Mediator

Das Zytokin IL-6 ist an fast allen genannten Vorgängen der Interaktion zwischen Tumorzellen und MSC beteiligt. Es ist ein Immunmodulator und wichtiger Mediator bei Entzündungsreaktionen [Coussens et al., 2002; Hodge et al., 2005]. Im Blut von Gesunden ist es nur in sehr geringer Konzentration von ca. 1–5 pg/ml nachweisbar. Bei sämtlichen Krankheiten mit entzündlicher Komponente steigen die Werte, bei Sepsis bis auf das 1000-fache [Waage et al., 1989; Wolf et al., 2014]. Auch bei Tumoren sind erhöhte IL-6-Werte nachweisbar. IL-6 scheint in diesem Kontext sowohl von Tumorzellen [Rattigan et al., 2010] als auch von MSC [Liu et al., 2011] bzw. den von ihnen abstammenden Zellen wie TAF oder Myofibroblasten [Quante et al., 2011] sezerniert zu werden.

Bezüglich des Rezeptors werden zwei Arten unterschieden: ein membranständiger Rezeptor (mIL-6R), der physiologisch nur auf wenigen Zellen, nämlich Hepatozyten, Megakaryozyten und einigen Leukozyten, vorkommt, sowie ein löslicher Rezeptor (sIL-6R). Zusammen mit gebundenem IL-6 bilden sie einen Komplex, der sich an das ubiquitär vorhandene, membrangebundene Signalrezeptor-Protein gp130 anlagert, woraufhin dieses dimerisiert. Über den membranständigen Rezeptor werden vor allem anti-inflammatorische und regenerative Wirkungen vermittelt. Dieser Weg wird auch als Classic Signaling bezeichnet. Trans-Signaling beschreibt die Vermittlung des Signals über IL-6-Bindung an den sIL-6R und Bindung dieses Komplexes an das gp130 an Zellen, die keinen eigenen IL-6 Rezeptor exprimieren [Heinrich et al., 2003;

Scheller et al., 2011; Scheller et al., 2006]. Über diesen Signalweg wird insbesondere die pro-inflammatorische Wirkung von IL-6 umgesetzt. So haben diese beiden Rezeptoren antagonistische Effekte. Die weitere Signaltransduktion kann über die Januskinase (JAK, engl. Just Another Kinase), eine Tyrosinkinase, erfolgen, die Transkriptionsfaktoren der Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT)-Familie aktiviert. Ein zweiter Signalweg, der durch IL-6 aktiviert wird, ist die Mitogen-Activated Protein (MAP)-Kinase. Über diese Signalwege wird die Genexpression der Zielzellen modifiziert. Auch weitere Signalwege, wie die Phosphatidylinositol-Triphosphat Kinase (PI3K)-Kaskade können beteiligt sein [Heinrich et al., 2003; Scheller et al., 2011; Scheller et al., 2006].

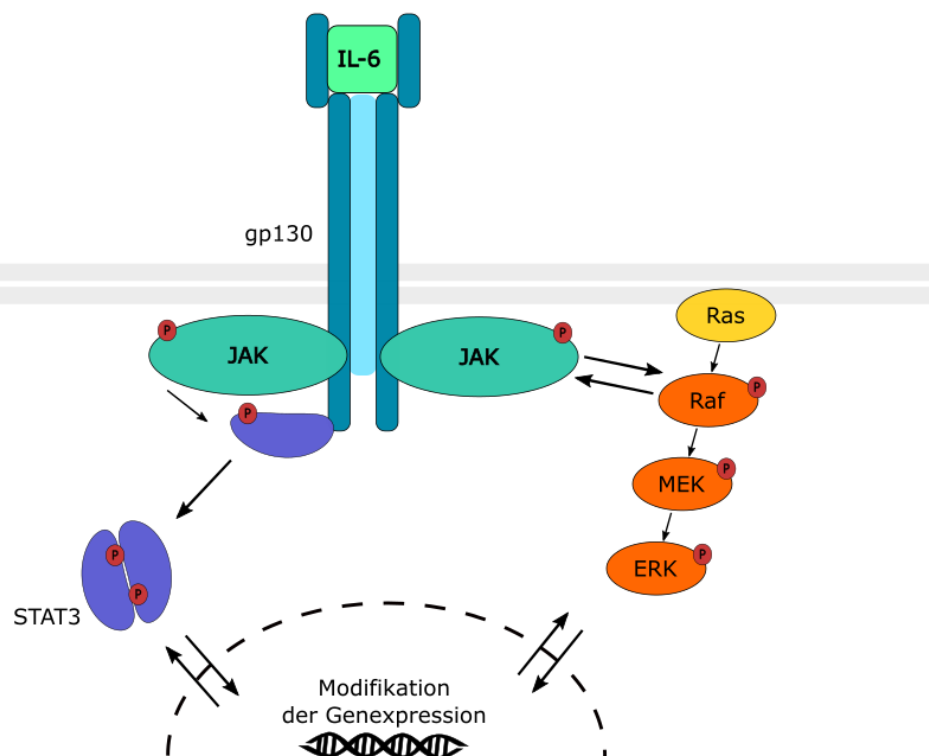


Abbildung 2. IL-6 und wichtige Signalkaskaden
Übersicht über die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs und der MAP-Kinase-Kaskade durch IL-6: Der Komplex aus IL-6 und Rezeptor lagert sich an das Signalrezeptor-Protein gp130 der Zielzelle an. Die weitere Signaltransduktion erfolgt über Januskinasen (JAK), welche u.a. über die Aktivierung des STAT3-Signalwegs und der MAP-Kinase-Kaskade eine Modifikation der Genexpression vermitteln. Für die ausführlichere Beschreibung siehe Text. „P“ bezeichnet phosphorylierte Proteine. Diagramm modifiziert nach [Heinrich et al., 2003].

Die Möglichkeiten und Mechanismen der Aktivierung ebenso wie die Signaltransduktion dieser Kaskaden sind äußerst zahlreich und komplex. Daher werden hier nur die wichtigsten kurz beschrieben.

Der STAT3-Signalweg kann neben IL-6 auch durch verschiedene andere Zytokine und Wachstumsfaktoren aktiviert werden. Diese binden extrazellulär an einen transmembranären Rezeptor der Zielzelle. Die meisten Rezeptoren dieses Signalwegs sind, wie auch der oben beschriebene Zytokinrezeptor gp130, zur Weitergabe des Signals auf die JAK angewiesen. JAK-Tyrosinkinasen sind im Zytoplasma vorhanden und binden an die intrazelluläre Domäne des Rezeptors. Nach Anlagerung eines Liganden an die Extrazellulärseite des Rezeptors, phosphorylieren und damit aktivieren sich die Januskinasen gegenseitig. Die Weitergabe des Signals erfolgt über die Phosphorylierung der Tyrosine des Rezeptors. An diese kann nun ein STAT-Protein binden und wird ebenso von den JAK phosphoryliert. Je zwei phosphorylierte STAT-Proteine dimerisieren und aktivieren sich so gegenseitig. Aufgrund ihrer Größe von 90 kDa werden sie aktiv in den Zellkern transportiert. Dort dienen sie als Transkriptionsfaktoren u. a. für Gene, die für Anti-Apoptose, Proliferation, Metastasierung und Angiogenese verantwortlich sind [Bromberg et al., 1999; Darnell, 1997; Darnell et al., 1994; Heinrich et al., 2003; Jia et al., 2016].

Aus der Gruppe der MAP-Kinasen ist insbesondere die Extracellular-Signal Regulated Kinase (ERK)1/2-Kaskade von großer Bedeutung für die Signaltransduktion von IL-6. Diese Kaskade wird vor allem von Mitogenen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren aktiviert, die an einen extrazellulären Rezeptor binden. Auf diese Weise wird deren Wirkung auf Wachstum, Proliferation, Differenzierung und Migration der Zelle vermittelt. Zudem steigert es die Expression von Genen, welche Zellen vor Apoptose schützen [Heinrich et al., 2003]. Eine Dysregulierung dieses Signalwegs kann daher eine entscheidende Rolle in der Kanzerogenese spielen [Dhillon et al., 2007].

Durch Ligandenbindung wird die Rezeptor-Tyrosinkinase aktiviert, welche so die Guanosintriphosphat (GTP)-Bindung und damit Aktivierung der Ras-GTPase ermöglicht. Das aktivierte Ras kann so eine Rapidly Accelerated Fibrosarcoma (Raf)-Kinase rekrutieren und über Phosphorylierung Protein-Protein- und

Protein-Lipid-Interaktionen aktivieren. In verschiedenen Geweben sind dabei unterschiedliche Raf-Isoformen zu finden [Dhillon et al., 2007; O'Neill et al., 2004; Wellbrock et al., 2004]. Ein aktiviertes Raf-Protein phosphoryliert MEK 1 und MEK 2 (MAP/ERK-Kinase) an Serine 218 und 222, wodurch auch diese aktiviert sind. Diese aktivieren nun die ERKs, welche auf diese Weise verschiedene Kinasen, Phosphatasen, Transkriptionsfaktoren in Zytoplasma sowie im Zellkern phosphorylieren können [Yoon et al., 2006].

Weiter gibt es zahlreiche Verbindungen zwischen der MAP-Kinase-Kaskade und dem STAT3-Signalwegs, welche über diverse Adapter-Proteine vermittelt werden. Ein Beispiel ist der Grb2-SOS-Komplex (engl. Growth-Factor-Receptor-bound Protein/Son of Sevenless), welcher über die Src-Homology (SHP)2-Domäne am gp130-Rezeptor bindet. Über eine JAK1-abhängige Phosphorylierungskaskade wird schließlich das Ras-Protein aktiviert, welches so die Ras-Raf-MEK-ERK-Kaskade auslösen kann [Heinrich et al., 2003].

Für das Mammakarzinom konnte gezeigt werden, dass IL-6, von Tumorzellen sezerniert, als ein wichtiges chemotaktisches Signal für die MSC dient und ihr Homing zum Tumor steuert. Zudem steigert es die Produktion des Chemokins C-X-C Motif Ligand (CXCL)7 durch die MSC. CXCL7 wiederum induziert in den Tumorzellen die Synthese zahlreicher Zytokine, u. a. von IL-6 und IL-8. Hieraus ergibt sich ein sogenannter Positive Feedback Loop [Liu et al., 2011].

Während die Wirkung von IL-6 bei Entzündungen und Wunden z. B. durch die Hemmung von Apoptose der schnelleren Heilung zuträglich ist, kann es bei Tumorzellen Proliferation, Metastasierung und Resistenzen gegen Chemotherapeutika beeinflussen [Hodge et al., 2005].

1.5 Mesenchymale Stammzellen in der zielgerichteten Tumorthherapie

Die oben beschriebenen Eigenschaften der MSC, insbesondere ihre gezielte Migration sowie die immunmodulatorische Wirkung legen einen therapeutischen Einsatz nahe. Eine Herausforderung dabei stellt neben der noch nicht im Detail verstandenen Interaktionen der MSC mit dem Organismus nach wie vor das sichere und dauerhafte Tracking der Zellen dar. Dies ist nötig, um den Weg, die

Verteilung und das Überleben von exogen applizierten MSC im Körper nachweisen zu können [Argibay et al., 2016]. Bei einer Recherche in der weltweit größten Datenbank zu klinischen Studien (<https://clinicaltrials.gov>) findet man dennoch bereits zahlreiche Studien, bei denen der Einsatz von mesenchymalen Stammzellen bei unterschiedlichsten Krankheiten am Patienten erprobt wird. In einigen Studien, wie z. B. zum Herzinfarkt [Hare et al., 2009], zur Prophylaxe von Abstoßungsreaktionen bei Nierentransplantationen [Tan et al., 2012] und bei der steroidresistenten Graft-versus-Host-Krankheit [Kurtzberg et al., 2014], wurden bereits Erfolge verzeichnet.

Durch ihren Tumortropismus und die Integration ins Tumorstroma sind MSC besonders in der Onkologie von großem Interesse. Dabei werden verschiedene Herangehensweisen getestet. Eine Möglichkeit stellen genetisch modifizierte MSC dar, die z. B. Prodrug-aktivierende Enzyme [Cavarretta et al., 2010] oder Proteine, wie den Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL) exprimieren und so auf Tumorzellen pro-apoptotisch wirken [Loebinger et al., 2009]. Zudem können MSC als Vehikel verwendet werden, die onkolytische Viren [Komarova et al., 2006; Mader et al., 2009] oder Nanopartikel, welche als Teil eines sogenannten Drug-Delivery-Systems fungieren, zum Tumor transportieren [Cheng et al., 2010; Li et al., 2011; Roger et al., 2010].

Zu Vorsicht mahnen jedoch Untersuchungen, die zeigen, dass MSC am Tumorprogress beteiligt sein können bzw. diesen fördern [Quante et al., 2011; Scherzed et al., 2013]. Ergebnisse von Battula et al. stützen diese Hypothese. Sie konnten nachweisen, dass Akute myeloische Leukämie (AML)-Zellen die osteogene Differenzierung von MSC fördern und die adipogene Differenzierung hemmen. Normale CD34-positive Zellen scheinen dazu nicht in der Lage zu sein. Während der osteogenen Differenzierung exprimieren die MSC deutlich mehr des Connective Tissue Growth Factor (CTGF). CTGF gilt als prognostischer Marker bei AML und scheint an deren Fortschreiten beteiligt zu sein [Battula et al., 2013; Battula et al., 2017; Lu et al., 2014; Safadi et al., 2003]. Diese Ergebnisse machen deutlich, wie wichtig es ist, MSC nicht als statische Zellart zu begreifen, sondern ihre Differenzierungsfähigkeit in die Forschung miteinzubeziehen.

1.6 Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Aufgrund der hohen Morbidität und schlechten Überlebensraten sind für an Kopf-Hals-Tumoren erkrankte Patienten dringend neue Therapieoptionen nötig. Der Einsatz von MSC stellt hierfür eine vielversprechende Option dar. Die Ergebnisse der aktuellen Forschung zur Verwendung von MSC in der onkologischen Therapie sind jedoch widersprüchlich. Es wurden sowohl proliferationssteigernde als auch -hemmende Einflüsse von MSC auf Tumorzellen festgestellt. Diese Arbeit soll dazu dienen, systematisch die Wirkung von aus Knochenmark isolierten MSC auf die Proliferation von Tumorzelllinien von Kopf-Hals-Tumoren zu untersuchen. Da sich in der Literatur die Ergebnisse je nach Art der Exposition unterscheiden, sollen im Rahmen der Proliferationsassays verschiedene Möglichkeiten getestet werden: Die Kultur von Tumorzellen mit durch MSC konditionierten Überständen soll ein Bild über die Beeinflussung der Tumorzellen durch die MSC geben. In Co-Kulturen soll die wechselseitige Interaktion untersucht werden.

Des Weiteren ist die Wirkung der Differenzierung der MSC auf Tumorzellen noch nicht vollständig geklärt. Ihr wird durch neuere Erkenntnisse eine bedeutende Rolle in der Interaktion der beiden Zellarten zugeschrieben. Um den Prozess der Differenzierung der MSC mitabzubilden, sollen die Versuche jeweils mit nativen sowie adipogen und osteogen andifferenzierten MSC durchgeführt werden.

Es wird angenommen, dass ein Großteil der Zell-Zell-Interaktion auf Zytokin-Ebene vermittelt wird. Daher sollen die Zytokin-Muster der unterschiedlichen Tumorzell-MSC-Kulturen bestimmt und verglichen werden. Da IL-6 eine zentrale Rolle in der Kanzerogenese zugeschrieben wird, soll hierauf ein besonderes Augenmerk gelegt werden.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe legen eine Beteiligung der Signalwege ERK1/2 und STAT3 an der Interaktion der MSC mit Tumorzellen nahe. Daher soll deren Aktivierung untersucht sowie die Möglichkeit der Hemmung evaluiert werden.

Mit Hilfe der gewonnenen Erkenntnisse soll eine weitere Einschätzung zum Einsatz von MSC in der Therapie der Kopf-Hals-Tumore ermöglicht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Lösungen und Puffer

Tabelle 1. Angesetzte Nährmedien

Bezeichnung	Zusammensetzung
DMEM-Expansionsmedium	DMEM-Nährlösung 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin
RPMI-Expansionsmedium	RPMI-Nährlösung 10 % FCS 1 % Penicillin/Streptomycin 1 % Natriumpyruvat 1 % nicht-essenziellen Aminosäuren

Tabelle 2. Angesetzte Lösungen und Puffer
H₂O steht hier für Aqua dest.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Ammoniumperoxidsulfat	10 % in H ₂ O
Blot-Puffer 1	25 mM Tris/HCL, pH 10,4 400 ml Methanol (20 %, technisch) 2 l H ₂ O
Blot-Puffer 2	300 mM Tris/HCl, pH 10,4, 400 ml Methanol (20 %, technisch) 2 l H ₂ O
Blot-Puffer 3	40 mM Norleucin 25 mM Tris/HCl, pH 9,6 2 l H ₂ O
Lämmli-Puffer 10x	144 g Glycin 30 g Tris/HCL, pH 8,3 10 ml SDS (20 %) 1 l H ₂ O

Material und Methoden

RIPA-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 15 mM NaCl 1 % NP-40 IGEPAL CA-630 0,5 % Na-Desoxycholat 0,1 % SDS
SDS-Laufpuffer	14 g Tris 71,5 g Glycerin 14 g SDS 5l H ₂ O
SDS-PAGE-Lösung A	60 g Acrylamid 1,6g N,N'-Bisacrylamid 200 ml H ₂ O
SDS-PAGE-Lösung B	18,17 g Tris/HCl, pH 8,8 0,4 g SDS 100 ml H ₂ O
SDS-PAGE-Lösung C	6,06 g Tris/HCl, pH 6,8 0,4 g SDS 100 ml H ₂ O
SDS-PAGE-Probenpuffer (2x)	20 % Glycerol 4 % SDS 100 mM Tris, pH 6,8 0,002 % Bromophenol blue 1 % β -Mercaptoethanol H ₂ O
Sammelgel	1,3 ml SDS-PAGE-Lösung A 2,5 ml SDS-PAGE-Lösung C 6,2 ml H ₂ O 20 μ l Temed 300 μ l APS

TBST (10x)	12,1 g Tris/HCl, pH 8,0 87,7 g NaCl 5,0 g Tween 20 1 l H ₂ O
TBST ⁺⁺ (5x)	6,05 g Tris/HCl, pH 8,0 160,75 g NaCl 2,5 g Tween 20 5 g Triton X 100 1 l H ₂ O
Trenngel	10 ml SDS-PAGE-Lösung A 7,5 ml SDS-PAGE-Lösung B 20 µl Temed 300 µl APS 12,4 ml H ₂ O

2.1.2 Geräte

Tabelle 3. Verwendete Laborgeräte

Laborgerät	Hersteller, Ort
Absaugpumpe LABOPORT-Membran-Vakuumpumpe	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Akku-Pipettierhilfe Accu-jet pro	Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland
Autoklav Laborclav	SPH Steriltechnik AG, Magdeburg, Deutschland
Brutschrank CB220	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
CASY Cell Counter and Analyzer Systems TT	OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
Durchflusszytometer FACSCantoTM	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Elektrophoresekammer MTV 1	Cti GmbH, Idstein, Deutschland

Material und Methoden

Inverses Durchlichtmikroskop DM IL 4000B	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Isopropanolbox Cryo 1 % Freezing Container	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Laborwasserbad	Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Deutschland
Lichtmikroskop 473028	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mikrotiterplattenphotometer Multiscan Plus	Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim, Deutschland
PCR Instrument StepOne Plus	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Präzisionspipetten 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Präzisionswaage H 110	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Schüttelwasserbad SW B25	Thermo Electron GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Semi-Dry-Blotter	Cti GmbH, Idstein, Deutschland
Spektralphotometer BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Sterilwerkbank Hera Safe KS	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Techne Progene DNA Thermal Cycler	Marshall Scientific, Hampton NH, USA
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge MiniSpin	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4. Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Ort
12-Well-Platten	Corning Inc., Corning, NY, USA
4-Well-Platten	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
CASY Cups Messgefäße	OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
Cellstar Tubes 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Cryogefäße Cryovial 2ml	Simport Scientific, Saint-Mathieu-de- Beloeil, QC, Canada
Einmalpipetten 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning Inc., Corning, NY, USA
FACS-Röhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Falcon-Röhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Falcon-Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Küvetten nach Hellendahl	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Nitrocellulose Blotting Membrane	GE Healthcare Bio-Science, Pittsburgh, PA, USA
Parafilm M	Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI, USA
Pasteurpipetten	Brand GmbH + CO KG, Wertheim, Deutschland
PCR-Mikrotiterplatten 96-Well Micro Amp Fast Optical mit Klebefolie	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Pipetten (Glas) 5 ml, 10 ml, 20 ml	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland

Pipettenspitzen 0,5 µl–10 µl	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, Deutschland
Pipettenspitzen 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Pipettenspitzen 200 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäße 1,5 ml (transparent), 1,5 ml (braun)	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Transwell Permeable Supports, Porengröße 0,4 µm Polyester Membran	Corning Inc., Corning, NY, USA
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel, Deutschland
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster, Österreich
Zellschaber	Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht, Deutschland

2.1.4 Medien und Reagenzien

Table 5. *Verwendete Medien und Reagenzien*

Reagenz	Hersteller, Ort
1,2-Propandiol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Agarose Standard	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Alizarin Red S Solution	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ammonium Persulfate (APS)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
BC Assay Reagent A und B	Interchim, Montluçon, Frankreich

Material und Methoden

BD FACS Clean	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BD FACS Flow	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BD Propidiumiodid Staining Solution (50 µg/ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
BD Shutdown Solution	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Bromphenolblau	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
CASYclean Capillar- und Systemreiniger	OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
CASYton Isotone Salzlösung	OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG, Bremen, Deutschland
Dexamethason 1 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Diethylpyrocarbonat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
DMEM (1x) Dulbecco´s Modified Eagle Medium, [+] 4,5g/L D-Glucose, [+] L-Glutamine, [-] Pyruvate	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Fixierbad Superfix Plus Rapid Fixer	Tetenal Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland
Ham´s F12 Flüssigmedium	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Hämatoxylinlösung	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

Human Cytokine Antibody Array C3	RayBiotech Inc., Norcross, GA, USA
Human IL-6 ELISA Kit	Diaclone SAS, Besançon, Frankreich
IBMX (3-Isobutyl-1-methylxanthin) 500 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Indomethacin 100 mM	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Insulin Solution 5 mg/ml human, recombinant	GE Healthcare Bio-Science, Pittsburgh, PA, USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Konservierer für Wasserbäder	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
L-Ascorbic acid 2-phosphate sesquimagnesium salt 50 mg/ml	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
L-Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
N-Acetyl-L-Cystein	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Natriumthiosulfat	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Non Essential Amino Acids (100x)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Nuclear Fast Red	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Oil Red O	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Paraformaldehyd	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (1000 U/1000 µg/ml)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) 10-fach	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Ponceau-S-Lösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail (100x)	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
RNeasy mini Kits	Quiagen Benelux B.V., Venlo, Niederlande
Rodinal Black and White Film Developer	Agfa Corporation, Ridgefield Park, NJ, USA
Rotiphorese Gel 30	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640 Medium with 2,0 g/L NaHCO ₃ , without L- Glutamine, low endotoxin	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
SDS-Lösung	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Silbernitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Sodium Pyruvat 100 mM	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
SuperScript VILO MasterMix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrat	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Taqman Gene Expression Mastermix	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Tetramethylethylendiamin (Temed)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Triton X	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Trypsin	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
β-Glycerophosphat 1 M	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Tabelle 6. *Verwendete Antikörper für Durchflusszytometrie*

Antikörper	Hersteller, Ort
APC Mouse Anti-Human CD90 (559689)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
PE Mouse Anti-Human CD73 (550257)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
PE Mouse Anti-Human CD34 (550761)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
FITC Mouse Anti-Human CD45 (555482)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
FITC Mouse Anti-Human CD44 (555478)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
PE Mouse Anti-Human CD31 (555446)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland

Tabelle 7. *Verwendete Sonden für Real-Time PCR*

TaqMan Gene Expression Assay	Hersteller, Ort
GAPDH, Assay-ID Hs00985639_g1	Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
FABP4, Assay-ID Hs01086177_m1	Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
LPL, Assay-ID HS00173425_m1	Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
LEP, Assay-ID Hs00174877_m1	Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
ALPL, Assay-ID Hs01029144_m1	Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
BGLP, Assay-ID HS01587814_g1	Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
Col 1, Assay-ID HS00164004_m1	Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA

RUNX2, Assay-ID HS00231692_m1	Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA
-------------------------------	--

Tabelle 8. Verwendete Antikörper für Western Blot

Antikörper	Hersteller, Ort
Phospho-Stat3 (Tyr705) (D3A7) XP Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Phospho-p44/42 MAPK (Erk 1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Peroxidase-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA

2.1.5 Software

Tabelle 9. Verwendete Software

Software	Hersteller, Ort
Word 2016	Microsoft, Redmond, WA, USA
Excel 2016	Microsoft, Redmond, WA, USA
GraphPad Prism 6.00	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Inkscape 0.91	Free Software Foundation, Boston, MA, USA
ImageJ 1.48v	Rasband, W.S., U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA
EndNote X7	Clarivate Analytics, Philadelphia, PA, USA
StepOne Software 2.2	Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA

2.2 Versuchsaufbau

Die Abbildung 3 gibt einen Überblick über den Versuchsaufbau der vorliegenden Arbeit (siehe S. 27).

Zunächst wurden die verwendeten MSC auf die geforderten Minimalkriterien überprüft (vgl. 1.2). Der Nachweis der Plastikadhärenz war bereits durch die Zellkultur in Plastikflaschen erfüllt. Die Differenzierbarkeit wurde durch histologische Färbungen nachgewiesen. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde das Vorhandensein der stammzelltypischen Kombination von Oberflächenmarkern gezeigt. Zusätzlich wurde eine Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt, um die Fortschritte der Differenzierung an Hand von spezifischen Markergenen zu überprüfen.

Die MSC stammten von zehn verschiedenen Spendern. In den durchgeführten Versuchen wurde die Wirkung von nativen MSC mit der osteogen bzw. adipogen andifferenzierter MSC auf die Tumorzellen verglichen. Zudem wurden sowohl die Behandlung der Tumorzellen mit konditionierten Überständen als auch Co-Kulturen von Tumorzellen und MSC untersucht.

Die Proliferationsassays wurden jeweils mit drei verschiedenen Tumorzelllinien von Kopf-Hals-Tumoren durchgeführt: Cal27, HLaC78 und FaDu.

Als Vorbereitung auf die Proliferationsassays wurden MSC für die Co-Kultur in Transwells kultiviert. Zellkulturflaschen wurden zur Gewinnung von ausreichenden Mengen von Überstand eingesetzt. Für jede der zehn Stammzelllinien wurden drei Versuchsreihen durchgeführt: In der ersten wurde der Einfluss nativer MSC in Co-Kultur und durch native MSC konditionierter Überstände verglichen. In der zweiten Versuchsreihe wurden die Überstände, in der dritten Co-Kulturen adipogen und osteogen andifferenzierter MSC getestet. Jeder Proliferationsassay wurde über fünf Tage durchgeführt. Dabei erfolgte täglich eine Bestimmung der Zellzahl und der Vitalität der Tumorzellen.

Die im Proliferationsassay konditionierten Überstände wurden im Dot Blot Assay auf ihre Zytokin-Muster untersucht. Die Bestimmung der jeweiligen IL-6 Konzentration erfolgte ebenfalls aus den Überständen des Proliferationsassays mit Hilfe eines ELISA. Der Western Blot wurde verwendet, um die Aktivierung der beteiligten Signalwege ERK1/2 und STAT3 in den unterschiedlichen

Konstellationen zu bestimmen und die Möglichkeit der Hemmung der Signalwege zu testen.

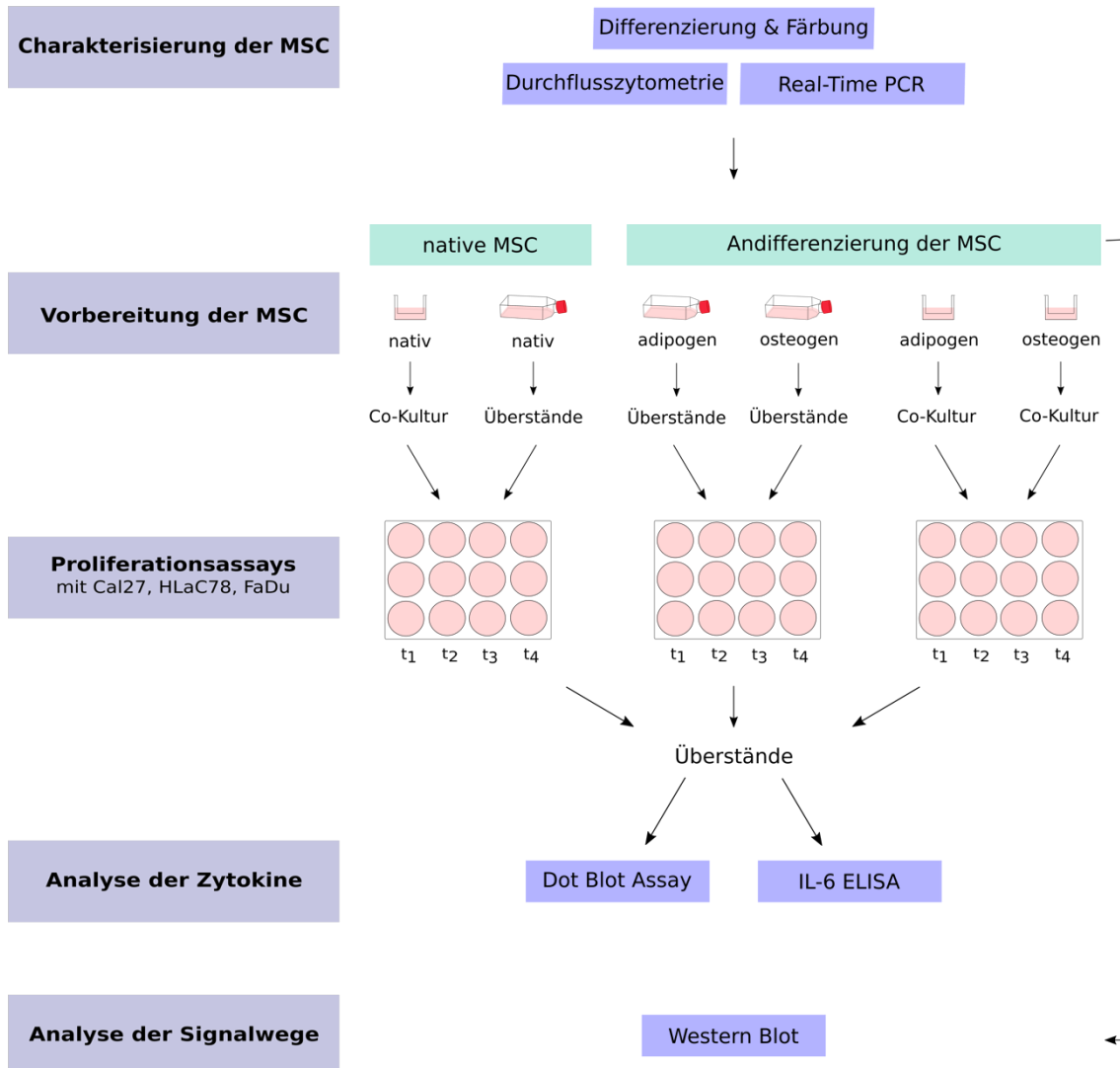


Abbildung 3. Versuchsaufbau
 Die MSC wurden mit Hilfe der genannten Methoden charakterisiert. Als Vorbereitung für die Proliferationsassays wurden MSC in Transwells bzw. Zellkulturflaschen kultiviert. Es wurde jeweils eine native sowie ein adipogen und osteogen andifferenzierte Kultur angelegt. Der Proliferationsassay wurde mit den genannten Tumorzelllinien über fünf Tage durchgeführt. Aus den Überständen wurden zur Zytokin-Analyse ein Dot Blot Assay sowie ein IL-6 ELISA durchgeführt. Die Aktivierung beteiligter Signalwege und die Möglichkeit der Hemmung wurde mit Hilfe des Western Blots bestimmt. Detailliertere Beschreibung siehe Text. Eigenes Diagramm.

2.3 Zellkultur

Grundvoraussetzung für alle durchgeführten Versuche waren gesunde, nicht-kontaminierte Zellkulturen. Dazu wurden sämtliche Experimente, wie nachfolgend beschrieben, in standardisierten Verfahren unter einer Sterilwerkbank mit laminarer Luftströmung durchgeführt.

2.3.1 Isolierung der Stammzellen aus Spongiosa

Die verwendeten MSC wurden aus der Spongiosa von Hüftköpfen gewonnen, die im Rahmen von orthopädischen Operationen entnommen worden waren. Die Spender wurden präoperativ über die Aufarbeitung und Verwendung ihrer Zellen im Labor aufgeklärt und gaben hierzu ihr schriftliches Einverständnis. Zum Schutz der Spender wurden deren Daten ausschließlich pseudonymisiert weiterverwendet. Die Durchführung der Versuche erfolgte mit der Genehmigung der Ethikkommission der Julius-Maximilians-Universität Würzburg (Nr. 72/06).

Die Spender waren zum Zeitpunkt der Zellentnahme im Durchschnitt 63,7 Jahre alt (49,1–77,3 Jahre). Ausschlusskriterien stellten Infektionen mit HIV, Hepatitis A, B oder C sowie maligne Erkrankungen dar.

Aufgearbeitet wurden die Proben im Labor der Orthopädischen Klinik König-Ludwig-Haus Würzburg.

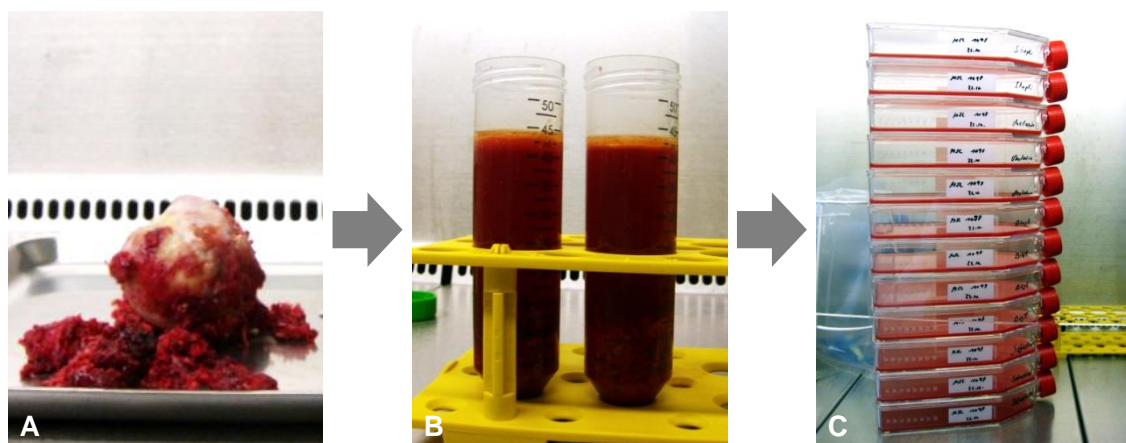


Abbildung 4. Prozess der MSC-Gewinnung
Bild A zeigt einen Hüftkopf ex vivo vor der Aufarbeitung. Die Zellen wurden in mehreren Schritten aus der Spongiosa gelöst (B) und anschließend in Medium in die Zellkulturflaschen überführt (C).

Die Isolierung erfolgte unter sterilen Bedingungen entweder direkt nach der Entnahme des Hüftkopfes oder, wenn zeitlich nicht anders möglich, am Folgetag nach Lagerung bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank.

Zunächst wurde die Spongiosa in 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und mit einer 1:1 Mischung von Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), einem Standardmedium für Säugetierzellen, mit dem nährstoffreichen Flüssigmedium Ham's F12 (DMEM/Ham's F12) aufgefüllt. Um die Zellen aus der Spongiosa zu lösen, wurde das Röhrchen kräftig per Hand geschüttelt und bei 1200 rpm (engl. revolutions per minute) für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, erst das Fett, dann das restliche Medium.

Das Röhrchen wurde mit DMEM/Ham's F12 aufgefüllt und geschüttelt. Nachdem die Knochen- und Bindegewebsreste sedimentiert waren, wurde das Medium, in dem nun die Zellen gelöst waren, in ein frisches 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Dieser Vorgang aus Schütteln und Überstände in eigenem Röhrchen sammeln wurde solange wiederholt, bis die Spongiosa weiß wurde, also die Zellen ausgewaschen waren. Die gesammelten Überstände wurden dann wiederum bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Der dabei entstandene Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in Expansionsmedium (EM) für Stammzellen (DMEM mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin = DMEM-EM) gelöst. Die Zellzahl wurde im Hämacytometer bestimmt. Schließlich wurden jeweils 1×10^9 Zellen pro 175 cm²-Zellkulturflasche ausgesät und in ca. 25 ml DMEM-EM kultiviert. Um einen möglichst schonenden Transport zu gewährleisten, wurden die Zellkulturflaschen nach Zelladhärenz in isolierenden Styroporboxen verpackt und so in das Labor der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten des Universitätsklinikums Würzburg transportiert.

Nach drei bis vier Tagen wurde die Zellkultur mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS, engl. Phosphate-buffered Saline) gewaschen und mit neuem Medium versorgt. Für die Versuche wurden die MSC ab Passage 1 verwendet.

2.3.2 Vitalitätsmessung und Zellzählung

Die Bestimmung von Zellzahl und Vitalität erfolgte mit Hilfe eines CASY Cell Counter and Analyzer Systems (Modell TT). Das Messprinzip dieses Systems besteht aus einem Kapillarpartikelzähler mit Pulsflächenanalyse. Hierzu wurden

jeweils 100 µl (bzw. 50 µl bei Tumorzellen) der zu bestimmenden Zellsuspension in 10 ml CASYton-Lösung verdünnt. Zellzahl und -vitalität wurden durch eine Dreifachmessung des Gerätes bestimmt [OLS-OMNI-LifeScience, 2016].

2.3.3 Kultivierung der mesenchymalen Stammzellen

Die MSC wurden in 175 cm²-Flaschen mit 25 ml DMEM-EM weiter im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Das Medium wurde alle drei Tage ausgetauscht. Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80 % wurde die Passagierung der Zellen durchgeführt. Dazu wurden sie mit 7 ml PBS gewaschen und mit 4 ml Trypsin für 4 min im Brutschrank abgelöst. Mit DMEM-EM wurde die Wirkung des Trypsins abgestoppt und die Zellen im Medium resuspendiert. Die Bestimmung der Zellkonzentration in dieser Lösung wurde, wie in Kapitel 2.3.2 beschrieben, durchgeführt. Davon ausgehend wurde die Zellsuspension bis zur gewünschten Konzentration verdünnt und auf frische Flaschen aufgeteilt.

2.3.4 Verwendete Tumorzelllinien und deren Kultivierung

Für die Versuche wurden humane Tumorzelllinien von Kopf-Hals-Tumoren verwendet, die bis zu ihrem Gebrauch in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

Bei den FaDu-Zellen handelt es sich um Tumorzellen, die 1968 in Kalkutta, Indien, aus einem Plattenepithelkarzinom des Hypopharynx eines 56-jährigen, männlichen Patienten isoliert wurden [Rangan, 1972].

1979 veröffentlichten Zenner et al., dass es ihnen gelungen war, Tumorzellen aus einer Lymphknotenmetastase eines Larynx-Plattenepithelzellkarzinoms zu isolieren und in Kultur zu bringen. Diese Tumorzelllinie ist bekannt als HLaC78 [Zenner et al., 1979].

Cal27 wurde 1982 in Nizza, Frankreich, aus dem OP-Präparat eines gering differenzierten Zungenkarzinoms eines 56-jährigen, männlichen Patienten gewonnen und kultiviert. Zu diesem Zeitpunkt war der Patient unbehandelt. Er erhielt neben einer partiellen Glossektomie und Neck-Dissection auch eine Radiochemotherapie. Dennoch verstarb er sechs Monate nach Diagnosestellung [Gioanni et al., 1988].

Die Zellen wurden in 75 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Dazu wurde Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium verwendet, welches mit 10 % FCS und je 1 % Penicillin/Streptomycin, Natrium Pyruvat und nicht-essenziellen Aminosäuren versetzt wurde (RPMI-Expansionsmedium (RPMI-EM)). Das Medium wurde jeden zweiten Tag ausgetauscht. Bei ca. 70–80 % Konfluenz wurden die Zellen analog zu den bereits beschriebenen MSC abgelöst und auf neue Flaschen verteilt. Der einzige Unterschied bestand darin, dass das Trypsin bereits nach 3 min abgestoppt wurde.

2.3.5 Kryokonservierung von Zellen

Um die Zellen zu konservieren, wurden sie zunächst gezählt und jeweils das entsprechende Volumen mit 1×10^6 Zellen in ein Röhrchen überführt. Diese wurden bei 1500 rpm 5 min lang zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 1 ml FCS mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und in ein Kryogefäß überführt. Durch die Verwendung einer Isopropanolbox wurde eine schonende Kühlung um 1 °C/min gewährleistet. Dazu wurden die Zellen zunächst in der Box für ca. 24 h bei -80 °C eingefroren. Anschließend wurden sie in den Kryogefäßen in flüssigen Stickstoff überführt.

Um die Zellen schonend, d. h. rasch, aufzutauen, wurden sie aus dem flüssigen Stickstoff in ein 37 °C warmes Wasserbad gegeben. Sobald die Zellsuspension komplett aufgetaut war, wurde sie in 10 ml des jeweiligen EM gegeben und bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert. Das so entstandene Zellpellet wurde in frisches EM aufgenommen, resuspendiert und in Zellkulturflaschen ausgesät. Nach einer Passage wurden die so aufgetauten Zellen für die Versuche verwendet.

2.4 Methoden zur Charakterisierung der mesenchymalen Stammzellen

Als Grundlage dienten die in 1.2 beschriebenen Minimal Kriterien für MSC der International Society for Cellular Therapy: Plastikadhärenz in Zellkultur, multipotente Differenzierbarkeit *in vitro* und Expression bestimmter Oberflächenmarkern [Dominici et al., 2006; Horwitz et al., 2005]. Die verwendeten mesenchymalen Stammzellen wurden auf das Vorhandensein dieser

Eigenschaften überprüft. Die geforderte Plastikadhärenz wurde bereits durch die Zellkultur in Kunststoffflaschen erfüllt.

2.4.1 Differenzierung

Um die Stammzellen zu differenzieren, wurden sie jeweils mit spezifischen Medien behandelt: zur Andifferenzierung für jeweils sieben Tage, zur vollständigen adipogenen Differenzierung für 14 Tage bzw. zur osteogenen Differenzierung für 21 Tage. Dabei wurde das Medium alle zwei bis drei Tage erneuert. Als Grundlage der Differenzierungsmedien wurde DMEM-EM verwendet und mit den entsprechenden Zusätzen versehen (vgl. Tabelle 10 und Tabelle 11).

Tabelle 10. Herstellung des adipogenen Differenzierungsmediums

Substanz	Volumen	Endkonzentration
DMEM-EM	10 ml	
Dexamethason Stammlösung 1 mM MG = 392,5 g/mol → 0,00393 g in 10 ml 100 % Ethanol	10 µl	1 µM
3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) Stammlösung 500 mM MG = 222,2 g/mol → 0,5555 g in 5 ml DMSO	10 µl	500 µM
Insulin Stammlösung 5 mg/ml → 1ml in 4 ml Aqua dest.	10 µl	1 µg/ml
Indomethacin Stammlösung 100 mM MG = 357,8 g/mol → 0,03578 g in 1 ml DMSO	10 µl	100 µM

Tabelle 11. Herstellung des osteogenen Differenzierungsmediums

Substanz	Volumen	Endkonzentration
DMEM-EM	10 ml	
L-Ascorbinsäure-2-phosphat Stammlösung 50 mg/ml MG = 289,5 g/mol → 2,5 g in 50 ml Aqua bidest.	10 µl	50 µg/ml
β-Glycerophosphat Stammlösung 1 M MG = 216,0 g/mol → 2,16 g in 10 ml Aqua bidest.	100 µl	10 mM
Dexamethason Stammlösung 1 mM MG = 392,5 g/mol → 0,00393 g in 10 ml 100 % Ethanol	1 µl	100 nM

2.4.2 Histologische Färbungen

Um die Differenzierungen der MSC besser sichtbar zu machen, wurden drei verschiedene Färbungen verwendet. Die MSC wurden in 4-Well-Platten angesetzt. Pro Well wurden 2×10^4 Zellen ausgesät und mit jeweils 100 µl des entsprechenden Differenzierungsmediums bzw. Expansionsmedium (EM) für die Negativkontrolle kultiviert. Nach vollständiger Differenzierung wurden die Zellen stufenweise in Paraformaldehyd (4%ige Lösung) fixiert. Dazu wurden zunächst 30 µl Paraformaldehyd zum Medium gegeben und nach 5 min abgesaugt. Anschließend wurden 100 µl einer 1:1-Mischung aus Paraformaldehyd und DMEM-EM für 30 min auf die Zellen gegeben, bevor zum Schluss die komplette 4-Well-Platte mit 1 ml des Paraformaldehyds bedeckt wurde. So wurden die Präparate bis zur Durchführung der Färbungen bei +4 °C im Kühlschrank gelagert. Vor Beginn der jeweiligen Färbung wurden die Zellen für 5 min in destilliertem Wasser (Aqua dest.) rehydriert. Es wurden drei verschiedene Färbungen durchgeführt.

Zwei Methoden dienen der Färbung von Kalzium. Für die Von-Kossa-Färbung wurden die Präparate mit 1%iger Silbernitratlösung (1 g Silbernitrat in 100 ml

Aqua dest.) bedeckt und so für 20 min mit UV-Licht bestrahlt. Nach einem Waschschrift mit destilliertem Wasser wurde 5%iges Natriumthiosulfat (5 g Natriumthiosulfat in 100 ml Aqua dest.) für 5 min auf die Zellen gegeben. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift mit Aqua dest. und die Färbung der Kerne mit Nuclear Fast Red (= Kernechtrot) für 5 min. Die Präparate wurden in Aqua dest. gewaschen und in aufsteigender Alkoholreihe mit 70 %, 90 % und 100 % Ethanol dehydriert.

Für die zweite Färbung von Kalzium wurde Alizarin Red S Solution (2 g in 100 ml Aqua dest.) auf die Zellen gegeben, nach 5 min abgesaugt und in aufsteigender Alkoholreihe (70 %, 90 % und 100 % Ethanol) dehydriert.

Zur Färbung der Fettvakuolen wurde die Oil Red O-Färbung verwendet. Dazu wurden die Präparate für 5 min in 100 % 1,2-Propandiol inkubiert. Nach dem Absaugen wurden die Zellen mit einer 60 °C warmen 0,5%igen Oil Red O-Lösung (0,5 g Oil Red O in 100 ml 1,2-Propandiol) bedeckt, 10 min bei 60 °C inkubiert und wiederum abgesaugt. Anschließend wurde 85%iges 1,2-Propandiol zu den Zellen gegeben. In dieser Kombination färbte die Oil Red O-Lösung. Es folgten drei Waschschriften mit Aqua dest., bevor die Kerne mit Hämatoxylinlösung für 30 sec gefärbt wurden. Nach drei weiteren Waschschriften wurden die Präparate für 5 min mit Aqua dest. bedeckt. Gelagert wurden die Präparate in PBS.

2.4.3 Durchflusszytometrie

Die fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie wurde 1968 an der Universität Münster entwickelt und zum Patent angemeldet [Dittrich et al., 1971]. Das Prinzip beruht darauf, dass die Zellen der zu untersuchenden Zellsuspension so durch Mikrokanäle geleitet werden, dass sie einzeln nacheinander durch einen Laserstrahl fließen. Dabei wird das Streulicht, das jede Zelle produziert, von zwei Detektoren (Forward Scatter und Side Scatter) aus verschiedenen Winkeln aufgezeichnet und ausgewertet. Dieses Streulicht ist u. a. abhängig von der Größe, Oberflächenstruktur und Granularität der Zelle sowie Größe und Struktur des Zellkerns. Fluoreszenzfarbstoffe können ebenso detektiert werden.

Bisher wurde noch kein eindeutiger MSC-Oberflächenmarker identifiziert. Daher wurden die isolierten MSC auf die Präsenz einer stammzelltypischen

Kombination bestimmter Oberflächenproteine und das Fehlen hämatopoetischer Marker hin untersucht [Dominici et al., 2006]. Diese wurden zuvor mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert. Folgende Oberflächenproteine wurden untersucht:

- CD31, auch bekannt unter PECAM1 (Platelet/Endothelial Cell Adhesion Molecule 1 = Thrombozyten-Endothelzellen-Adhäsionsmolekül), ist auf der Oberfläche von Epithelzellen, Thrombozyten, Monozyten, neutrophilen Granulozyten und einigen Zellen der T-Zell-Linie zu finden [RefSeq, 2010].
- CD34 ist typisch für hämatopoetische Stammzellen [Civin et al., 1996]. Auch frisch isolierte MSC können diesen Oberflächenmarker exprimieren. Im Verlauf der *in vitro* Kultivierung verlieren sie jedoch CD34 als Oberflächenmarker [Kaiser et al., 2007].
- CD44, auch H-Zell-Adhäsionsmolekül, wird von zahlreichen Zellarten exprimiert und ist an verschiedenen Aufgaben beteiligt. So spielt es u. a. eine Rolle in der Zell-Zell-Interaktion, Zell-Adhäsion und wird auch mit Tumorzell-Metastasierung in Verbindung gebracht [RefSeq, 2008a].
- CD45, auch Protein Tyrosin Phosphatase Rezeptortyp C, ist ein Pan-Leukozytenmarker [Dominici et al., 2006]. Ähnlich wie bei CD34 gibt es CD45(+)-MSC, die *in vitro* über die Zeit ihren Phänotyp ändern [Kaiser et al., 2007].
- CD73, auch 5'-Nukleotidase, katalysiert die Umwandlung von extrazellulären Nucleotiden zu membrangängigen Nucleosiden [RefSeq, 2011].
- CD90, auch Thy-1 Oberflächenantikörper, ist bei zahlreichen Zellen an der Zelladhäsion und -kommunikation beteiligt. Es gibt Hinweise, dass das Gen bei Nasopharynxkarzinomen als Tumorsuppressor wirkt [RefSeq, 2015c].

Für die Analyse wurde die MSC-Kultur mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst, im CASY Cell Counter gezählt und je 2×10^5 Zellen in 1 ml PBS mit 10 % FCS in ein FACS-Röhrchen gegeben. Nach 1 h auf Eis wurden die Röhrchen bei 1500 rpm und 4 °C für 5 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in je 1 ml PBS mit 0,05 % Triton X gelöst und anschließend die Antikörper zugegeben:

- APC Mouse Anti-Human CD90 (559689) 1 μ l
- PE Mouse Anti-Human CD73 (550257) 20 μ l
- FITC Mouse Anti-Human CD45 (555482) 20 μ l
- FITC Mouse Anti-Human CD44 (555478) 20 μ l
- PE Mouse Anti-Human CD31 (555446) 20 μ l
- PE Mouse Anti-Human CD34 (550761) 20 μ l

So wurden die Proben im Dunkeln für 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Waschschrift mit PBS: die Proben wurden wie oben beschrieben zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Zellpellet in PBS resuspendiert und wiederum abzentrifugiert. Dann wurden die Proben mit Fluoreszenzfarbstoff gebundenem Antikörper in FACS-Lösung aufgenommen. Die Messung mit Hilfe des Durchflusszytometers FACSCanto™ durchgeführt.

2.4.4 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion

Um die Expression adipozyten- bzw. osteozytenspezifischer Gene in den andifferenzierten MSC zu untersuchen, wurde die Methode der TaqMan Real-Time Polymerase-Kettenreaktion verwendet.

Das Grundprinzip der PCR geht auf Kary B. Mullis zurück, der diese in den 1980er Jahren entwickelte [Mullis et al., 1986].

Die wichtigsten Materialien hierzu sind:

- DNA-Probe, in der nach dem zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt, Template genannt, gesucht wird,
- spezifische Primer für den gesuchten DNA-Abschnitt, also komplementäre DNA, die sich an den Beginn des Templates anlagert und so den Start markiert,
- DNA-Polymerase, ein Enzym, welches die Strangverlängerung ausgehend vom Primer katalysiert und
- Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs), woraus die DNA-Polymerase den weiteren DNA-Strang bilden kann.

In drei Schritten, Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation, welche in zahlreichen Zyklen wiederholt werden, wird das gesuchte DNA-Fragment exponentiell vermehrt.

Die Real-Time PCR ermöglicht eine Quantifizierung des gesuchten DNA-Abschnitts [Heid et al., 1996]. Dazu werden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die durch den Kontakt zu Doppelstrang-DNA aktiviert werden. Durch Standardkurven kann die Fluoreszenz, die bei jedem Zyklus gemessen wird, in Anzahl der Transkripte umgerechnet werden. Hier wurde die TaqMan Real-Time PCR angewendet. Bei dieser Methode werden TaqMan-Sonden als Primer verwendet. Sie sind an beiden Enden mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Der eine fungiert als Reporter und der andere als sogenannter Quencher (engl. to quench: löschen). Wenn sich während der Elongation der Quencher vom Reporter entfernt, kann die Emission des Reporters mit ihrer spezifischen Wellenlänge gemessen und somit die Anzahl der DNA-Replikate bestimmt werden.

Für die Proben wurden zunächst MSC für fünf Tage adipogen und osteogen andifferenziert und anschließend über 72 h in DMEM-EM kultiviert. Sie wurden mit Hilfe von Trypsin enzymatisch vom Flaschenboden gelöst, bei 1500 rpm für 5 min und 37 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die RNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des Quiagen RNeasy Kits, welches alle im Folgenden beschriebenen Puffer enthält. Die Inhaltsstoffe der Puffer können dem Protokoll des Herstellers entnommen werden, ihre genaue Zusammensetzung ist jedoch vertraulich. Zu jedem Zellpellet wurden zur Lyse 600 µl Puffer RLT gegeben, das Gemisch resuspendiert und in ein Reagiergefäß überführt, bevor es bei 37 °C für 30 min in einen Schüttelinkubator gegeben wurde. Im Anschluss wurde zu jedem Lysat 600 µl Ethanol (70%ig) dazugegeben. Von diesem Lysat-Ethanol-Gemisch wurden je 600 µl auf eine RNeasy Spin-Säule pipettiert, für 15 sec bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Dies wurde mit den zweiten 600 µl des Gemisches wiederholt. Danach wurden 700 µl RW1 Puffer auf die Säulen gegeben, wie oben beschrieben zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Der Vorgang wurde zwei Mal mit 500 µl Puffer RPE wiederholt, wobei die Säule beim zweiten Mal für 2 min zentrifugiert wurde. Im Anschluss daran wurde die Säule auf ein frisches, autoklaviertes Reagiergefäß gesteckt und 35 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltes, also RNase- und DNase-freies Wasser in die Säule gegeben und für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. So

wurde die RNA von der Säule gelöst und befand sich nun im Reagiergefäß. 1 µl RNase-Inhibitor wurde zur RNA gegeben und diese auf Eis gelagert.

Der RNA-Gehalt jeder Probe wurde nach Verdünnung von je 1 µl der RNA-Lösung in 79 µl DEPC-Wasser photometrisch bestimmt. Daraus wurde die RNA-Konzentration berechnet. Ausgehend von diesem Ergebnis wurden die weiteren Proben so stark mit DEPC-Wasser verdünnt, dass sich jeweils 1500 ng RNA in 30 µl befanden, um auf diese Weise eine Konzentration von 50 ng/µl zu erreichen.

Um die isolierte RNA im nächsten Schritt in komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben, wurde das Enzym Reverse Transkriptase verwendet. Das nötige Reaktionsgemisch wurde mit den in Tabelle 12 genannten Volumina hergestellt. Der verwendete VILO SuperScript Mastermix enthält Taq-DNA-Polymerase, MgCl₂, Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs) und Reaktionspuffer.

*Tabelle 12. Herstellung des Reaktionsgemisches für die Reverse Transkription
DEPC-Wasser: mit Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser*

Reagenz	Volumen
VILO SuperScript Mastermix	4 µl
RNA-Vorlage	2 µl (\pm 100 ng RNA)
DEPC-Wasser	14 µl

Dieses Reaktionsgemisch wurde nun für jede RNA-Probe in vier Wells einer 96-Well PCR-Platte aufgetragen. Die PCR-Platte wurde bei 800 rpm für 3 min zentrifugiert, bevor sie in das Real-Time PCR-Gerät (StepOnePlus Real-Time PCR System, Thermo Fisher Scientific) überführt wurde. Dort erfolgte das Umschreiben der RNA in cDNA, wie in Tabelle 13 beschrieben. Die Proben, die nun die cDNA enthielten, wurden aus den vier Wells, in die sie aufgeteilt worden waren, wieder zusammenpipettiert und so bei -80 °C eingefroren.

*Tabelle 13. Reaktionsprotokoll der Reversen Transkription
RT: Reverse Transkriptase*

Schritt	Vorinkubation	Reverse Transkription	Inaktivierung der RT	Abkühlung
Dauer	10 min	59 min	5 min	10 min
Temperatur	25 °C	42 °C	95 °C	4 °C

Für die Durchführung der eigentlichen Real-Time PCR wurden die cDNA-Proben aufgetaut. Je 2 µl der cDNA Probe wurde mit TaqMan Gene Expression Mastermix, der jeweiligen Sonde, also dem TaqMan Gene Expression Assay, und DEPC-Wasser in ein Well gegeben (vgl. Tabelle 14).

*Tabelle 14. Herstellung des Reaktionsgemisches für die Real-Time PCR
DEPC-Wasser: mit Diethylpyrocarbonat behandeltes Wasser*

Reagenz	Volumen
cDNA-Vorlage	2 µl
TaqMan Gene Expression Mastermix	10 µl
TaqMan Gene Expression Assay	1 µl
DEPC-Wasser	7 µl

Für jede Probe wurde das Reaktionsgemisch neunfach auf eine 96-Well PCR-Platte aufgetragen. Die Platte wurde wiederum für 3 min bei 800 rpm zentrifugiert, bevor sie im entsprechenden Gerät der Real-Time PCR zugeführt wurde.

Die folgenden proteincodierenden Gene wurden auf diese Weise untersucht:

- GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphat-Dehydrogenase) ist ein wichtiges Enzym der Glykolyse und ubiquitär vorhanden [RefSeq, 2014]. Es diente hier als Referenzwert.
- FABP4 (Fatty Acid Binding Protein 4) wird in Adipozyten exprimiert und ist an Aufnahme, Transport und Metabolismus von Fettsäuren beteiligt [RefSeq, 2008b].
- LPL (Lipoproteinlipase) katalysiert die Hydrolyse von Triglyceriden aus Lipoproteinen. Es wird in Muskel- und Fettgewebe exprimiert [RefSeq, 2008c].

- LEP (Leptin) ist ein Protein, welches von weißen Fettzellen sezerniert wird und über verschiedene Signalwege an der Regulation des Fettdepots des Körpers mitwirkt [RefSeq, 2017].
- ALPL (Alkalische Phosphatase) wird von Zellen in verschiedenen Geweben exprimiert und der Knochenmineralisierung zugeschrieben [RefSeq, 2015a].
- BGLP (Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein) wird auch Osteocalcin genannt. Das Protein wird von Osteoblasten gebildet und reguliert das Knochen-Remodeling und den Energie-Metabolismus [RefSeq, 2015b].
- Kollagen 1 ist in verschiedenen Bindegewebe-Arten zu finden, vor allem in Knochen, Kornea, Dermis und Sehnen. Es besteht aus zwei Alpha1- und einer Alpha2-Kette [Dalglish, 2008].
- RUNX2 (Runt-related Transcription Factor 2) spielt eine wichtige Rolle bei der Osteoblasten-Differenzierung sowie der Skelettbildung und beeinflusst die weitere Genexpression in Knochenzellen [RefSeq, 2016].

Die einzelnen Schritte mit Temperatur und Dauer sind in Tabelle 15 beschrieben. Zunächst erfolgt mit Hilfe des Enzyms Uracil-N-Glycosylase (UNG) ein Verdau eventueller PCR-Produkte von vorherigen Versuchen [Pierce et al., 2004].

Anschließend werden die Proben erhitzt, um die UNG zu deaktivieren und die DNA-Polymerase AmpliTaq Gold zu aktivieren. Dann wird die doppelsträngige DNA-Probe durch hohe Temperaturen denaturiert. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, aufgetrennt, sodass diese als Einzelstränge vorliegen. Die darauffolgenden Schritte Hybridisierung und Elongation stellen die eigentliche Polymerase Kettenreaktion dar und werden insgesamt 40 Mal wiederholt.

*Tabelle 15. Reaktionsprotokoll der Real-Time PCR
UNG: Uracil-N-Glycosylase*

Schritt	UNG-Verdau	Enzym-Aktivierung	PCR 40 Zyklen	
Dauer	2 min	10 min	15 sec	1 min
Temperatur	50 °C	95 °C	95 °C	60 °C

Die relative Quantifizierung der Zielgene erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode. Dabei wurden die Werte zunächst in Relation zu GAPDH berechnet, welches als endogener Kontroll- und Referenzwert verwendet wurde. Im nächsten Schritt wurde die Anpassung an einen zweiten Referenzwert, hier die nativen MSC, vorgenommen. Daher werden die Ergebnisse der PCR für die adipogen und osteogen andifferenzierten MSC im Folgenden in Abhängigkeit von nativen MSC angegeben [Livak et al., 2001].

2.5 Quantifizierung der Tumorzellproliferation

Um den Einfluss von MSC auf das Tumorzellwachstum zu quantifizieren, wurden verschiedene Proliferationsassays mit MSC von zehn verschiedenen Patienten durchgeführt. Hierzu wurden die Tumorzellen HLaC78, FaDu und Cal27 in einer 12-Well-Platte ausgesät.

Auf Grundlage von Ergebnissen aus Vorexperimenten wurde angenommen, dass die Cal27-Zellkultur in der Regel etwas langsamer als die anderen beiden wächst. Daher wurden die Cal27 in einer höheren Konzentration als HLaC78 und FaDu ausgesät (Cal27: je $2,5 \times 10^4$ Zellen pro Well, HLaC78 und FaDu je 2×10^4 Zellen pro Well).



Abbildung 5. Beispiel einer 12-Well-Platte im Proliferationsassay
1. Reihe (∅) Negativkontrolle, 2. Reihe (A) adipogen, 3. Reihe (O) osteogen

Nach drei bis vier Stunden wurde unter dem Mikroskop kontrolliert, ob die Zellen adhärirt hatten. Das Medium wurde abgesaugt und die zu untersuchenden Überstände bzw. die Co-Kulturen in Transwells dazugegeben. Dabei fungierte jeweils die erste Reihe als Negativkontrolle und wurde mit 1,5 ml DMEM-EM befüllt. In den darauffolgenden vier Tagen wurde im Abstand von je ca. 24 h von jeder Testreihe ein Well abgelöst. Dazu wurde das Well mit 300 µl PBS gewaschen und die Zellen mit 300 µl Trypsin für 4 min bei 37 °C im Brutschrank abgelöst. Das Trypsin wurde anschließend mit 700 µl DMEM-EM abgestoppt und die Zellen in der Lösung resuspendiert. Aus dieser Lösung wurde mithilfe des CASY Cell Counter die Zellzahl und Vitalität der Tumorzellen bestimmt (vgl. 2.3.2).

Unmittelbar vor dem Befüllen der Wells (t_0) und am vierten und letzten Tag (t_4) wurde eine Probe der Überstände gewonnen und für die spätere Analyse im Dot Blot bzw. ELISA bei -20 °C eingefroren. Ein Medienwechsel erfolgte nach 48 h.

2.5.1 Proliferationsassay der Tumorzellen mit nativen mesenchymalen Stammzellen

Um die Wirkung nativer MSC, also unbehandelter, undifferenzierter mesenchymaler Stammzellen, auf das Wachstum und die Vitalität der Tumorzelllinien zu untersuchen, wurde dieser Proliferationsassay durchgeführt. Dabei wurde der Überstand nativer MSC (nat-Überstand) im Vergleich zur Co-Kultur mit nativen MSC (nat-Co-Kultur) getestet. Der Überstand wurde von der Kultur abpipettiert, bei 2000 rpm 5 min lang zentrifugiert und wiederum nur der Überstand weiterverwendet. So wurde gewährleistet, dass der Überstand frei von Zellen und Debris ist, bevor er zu den Tumorzellen gegeben wurde (t_0). Für die Co-Kultur wurden jeweils halb so viele Tumorzellen je Well verwendet. Von der zu untersuchenden MSC-Reihe wurde die gleiche Zellzahl wie Tumorzellen in einem Transwell ausgesät. So ergab sich nach Einsatz des Transwells in jedem Well die gleiche Gesamt-Zellzahl wie in Wells mit Überstand. Damit konnte von einer vergleichbaren Nährstoffversorgung der Zellen aus dem Medium ausgegangen werden. Das Trans-Well-System ermöglichte durch die Porengröße von 0,4 µm in einer Polyester-Membran eine ständige

Kommunikation der MSC und Tumorzellen über das Medium bei räumlicher Trennung.

2.5.2 Proliferationsassay der Tumorzellen mit Überstand andifferenzierter mesenchymaler Stammzellen

Für einen Vergleich zwischen dem Überstand der andifferenzierten MSC wurden die nativen MSC eine Woche zuvor in mittleren Kulturflaschen (75 cm²) ausgesät und adipogen bzw. osteogen andifferenziert (vgl. 2.4.1). Am fünften Tag wurden die Zellen mit ca. 5 ml PBS gewaschen und in DMEM-EM für drei weitere Tage kultiviert. So wurde sichergestellt, dass der für den Proliferationsassay verwendete Überstand frei von den Zusätzen des Differenzierungsmediums war und lediglich die Wirkung der von den andifferenzierten MSC sezernierten Stoffen auf die Tumorzellen evaluiert wurde. Dieser konditionierte Überstand wurde am Tag der Aussaat des Proliferationsassays von der Zellkultur abgenommen, bei 2000 rpm 5 min lang zentrifugiert und der Überstand abpipettiert. Die MSC-Kultur wurde wieder mit DMEM-EM versorgt.

Nach der Aussaat der Tumorzellen wie oben beschrieben, wurde die zweite Reihe der Wells mit jeweils 1,5 ml des Überstands der adipogen (adipo-Überstand) und die dritte Reihe mit osteogen andifferenzierten Zellen (osteo-Überstand) inkubiert. 48 h nach Aussaat wurde bei den verbleibenden Wells das Medium nach dem gleichen Schema wie zu Beginn erneuert.

2.5.3 Proliferationsassay der Tumorzellen in Co-Kultur mit andifferenzierten mesenchymalen Stammzellen

Im dritten Proliferationsassay sollte die Wirkung der osteogen und adipogen andifferenzierten MSC in Co-Kultur (adipo-Co-Kultur bzw. osteo-Co-Kultur) untersucht werden. Dafür wurden die Stammzellen in Transwells ausgesät, für eine Woche adipogen bzw. osteogen andifferenziert und wiederum für drei Tage in DMEM-EM kultiviert (vgl. 2.4.1 und 2.5.2). Anschließend wurden die Transwells zu den in halber Konzentration ausgesäten, adhärnten Tumorzellen gegeben und mit DMEM-EM versorgt. Der weitere Ablauf erfolgte wie in den bereits beschriebenen Proliferationsassays (vgl. 2.5.1 und 2.5.2).

2.6 Zytokin-Analyse

Um mögliche zelluläre Kommunikationswege besser verstehen zu können, wurde sowohl eine qualitative als auch quantitative Analyse der Zytokine in den Zellüberständen durchgeführt.

2.6.1 Dot Blot Assay als Screening für Zytokine und Wachstumsfaktoren

Zur Übersicht der Zytokine, die hier die Zell-Zell-Interaktion vermitteln können, wurde ein Dot Blot Assay durchgeführt.

Laut Herstellerangaben dient der sogenannte membranbasierte Antikörperassay dem Screening und Vergleich von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und anderen Proteinen [RayBiotech]. Dabei verbindet es die Methoden des Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) und des Western Blots. Ähnlich dem ELISA wird auch hier die Methode des Sandwich Immunoassays verwendet (vgl. 2.6.2). Die Antikörper sind jedoch statt in Wells auf eine Nitrozellulose-Membran aufgebracht. Die Auswertung erfolgt wie im Western Blot mit Chemolumineszenz auf Röntgenfilm (vgl. 2.7.4).

Hier wurde das Human Cytokine Antibody Array C3 Kit nach der zugehörigen Anleitung verwendet. Beispielhaft wurden die Überstände des Proliferationsassay der Tumorzellen Cal27 mit MSC 1050 untersucht. Sie wurden an t_0 bzw. t_4 aus dem Assay gewonnen (vgl. Abbildung 3, S. 27) und bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ konserviert. Unmittelbar vor dem Versuch wurden sie aufgetaut.

Folgende Überstände wurden untersucht:

- native MSC t_0
- adipo-Überstand t_0
- osteo-Überstand t_0
- Cal27 in Kultur mit DMEM-EM t_4
- Cal27 in Kultur mit nativem Überstand t_4
- Cal27 in Kultur mit adipo-Überstand t_4
- Cal27 in Kultur mit osteo-Überstand t_4
- Cal27 in Kultur mit nat-Co-Kultur t_4

Auch alle Lösungen des Kits wurden bei Raumtemperatur (RT) verwendet. Je eine der Membranen wurde mit der beschichteten Seite nach oben in die

entsprechenden Wells gelegt. Alle Wasch- und Inkubationsschritte erfolgten auf der Schüttelplatte. Zu Beginn wurden 2 ml Puffer für 20 min bei RT zum Blocken auf die Membranen gegeben. Anschließend wurde der Puffer abgesaugt, je 1 ml des zu untersuchenden Überstands auf die Membran pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Überstände abgesaugt und fünf Waschschrte für je 5 min durchgeführt. Die ersten drei mit Waschpuffer I, die restlichen zwei mit Waschpuffer II. Darauf folgte die Inkubation mit je 1 ml Detektions-Antikörper-Cocktail bei RT für 1,5 h. Anschließend wurden die fünf Waschschrte wie oben beschrieben wiederholt, bevor je 2 ml Horseradish Peroxidase (HRP)-Streptavidin, also Meerrettichperoxidase gebunden an Streptavidin, für 2 h bei RT zu den Membranen gegeben wurde. Nach fünf Waschschrten wurden je 500 µl der Chemolumineszenz-Mischung auf die Membranen gegeben, diese an Röntgenfilm angelegt und nach 5 min der Anleitung entsprechend entwickelt.

Mit Hilfe des Programms ImageJ [Rasband, 1997-2016] wurde jeweils in verschiedenen Vergrößerungen (400 %, 600 % und 800 %) die Intensität der sechs Dots der Positivkontrollen sowie die zwei der IL-6-Dots gemessen und deren Mittelwerte in Relation gesetzt. Die relative Intensität der Dots ist proportional zur Konzentration des jeweiligen Zytokins im untersuchten Überstand.

Neben IL-6, auf welchem der Fokus bei der Auswertung lag, wurde folgende Zytokin-Konzentrationen verglichen:

Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor (GM-CSF) zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen [Francisco-Cruz et al., 2014] und kann über die Aktivierung des STAT3- und STAT5-Signalwegs anti-apoptotisch auf die Zielzellen wirken [Amable et al., 2014].

Growth-related Oncogen (GRO) steht für GRO- α , GRO- β und GRO- γ . Diese sind Chemokine, chemotaktische Zytokine, die eine wichtige Rolle bei Angiogenese und Wundheilung spielen [Zaja-Milatovic et al., 2008]. Sie vermitteln Chemotaxis von Neutrophilen zu Entzündungsherden, wie auch IL-8 [Rudack et al., 2003], und sind mit Metastasierung assoziiert [Doll et al., 2010]. GRO- α als Untergruppe der GROs ist ein autokriner Wachstumsfaktor, der an Wundheilung, Entzündung, Angiogenese,

Tumorigenese und Metastasierung beteiligt ist. Er wird als Marker für altersassoziierte Pathologien, wie z. B. Tumore, diskutiert [Fimmel et al., 2007].

IL-8, wie schon oben beschrieben, wirkt als Chemokin. Es gibt Hinweise, dass es an der Tumorigenese beteiligt ist [Doll et al., 2010]. Angiogenin nimmt eine wichtige Rolle in der Angiogenese ein [Kim et al., 2007].

2.6.2 ELISA zur IL-6 Bestimmung

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ist ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, mit dessen Hilfe die Konzentration eines Proteins oder einer niedermolekularen Verbindung in Serum, Plasma, Urin, Zellüberständen etc. bestimmt werden kann. Die Methode wurde 1971 von zwei unabhängigen Forschergruppen in Schweden und den Niederlanden ausgehend von der Methode des Radioimmunoassays entwickelt [Engvall et al., 1971; Van Weemen et al., 1971].

Dieses Verfahren wurde hier verwendet, um die IL-6 Konzentration in den Zellüberständen zu bestimmen, die vor Beginn (t_0) und am vierten und letzten Tag (t_4) des Proliferationsassays gewonnen worden waren. Es wurde ein Human IL-6 ELISA Kit von Diaclone mit dem zugehörigen Protokoll verwendet.

Als Proben dienten die Überstände aus den Proliferationsassays der zehn MSC-Linien mit Cal27-Tumorzellen zu t_0 und t_4 (vgl. Abbildung 3, S. 27) abzüglich denen, die bereits im Dot Blot Assay bzw. in Vorversuchen aufgebraucht worden waren.

Daraus ergaben sich folgende Proben – jeweils in Verbindung mit einer MSC-Linie (vgl. Abbildung 3, S. 27):

- Proliferationsassay mit nativem MSC-Überstand und -Co-Kultur
 - nativer Überstand t_0
 - Cal27 nativ t_4
 - Cal27 in nat-Co-Kultur t_4
 - Cal27 mit nat-Überstand t_4
- Proliferationsassay mit Überständen andifferenzierter MSC
 - adipo-Überstand t_0
 - osteo-Überstand t_0
 - Cal27 nativ t_4
 - Cal27 mit adipo-Überstand t_4

- Cal27 mit osteo-Überstand t_4
- Proliferationsassay mit Co-Kultur mit andifferenzierten MSC
 - Überstand der adipo-Co-Kultur t_0
 - Überstand der osteo-Co-Kultur t_0
 - Cal27 nativ t_4
 - Cal27 in adipo-Co-Kultur t_4
 - Cal27 in osteo-Co-Kultur t_4

Bis zur Durchführung des ELISA wurden die Proben bei -20 °C gelagert. Direkt vor Beginn des Versuchs wurden sie bei Raumtemperatur aufgetaut, abzentrifugiert und 1:100 bzw. wenn nicht ausreichend, nachträglich 1:500 mit dem mitgelieferten Standard-Verdünnungspuffer verdünnt. Die Verdünnungsstufe wurde aufgrund von im Vorversuch erhaltenen Konzentrationen gewählt. Es wurden jeweils $100\text{ }\mu\text{l}$ der IL-6-Standard-Verdünnungsreihen, der Kontrollen und der Proben doppelt in Wells der 96-Well-Platte des Kits aufgetragen, welche mit dem Erstantikörper, dem sogenannten Capture Antibody, beschichtet waren. Dieser bindet das gesuchte Antigen aus dem zugegebenen Zellüberstand bzw. den Kontrolllösungen hochspezifisch. Dazu wurden im gleichen Schritt jeweils $50\text{ }\mu\text{l}$ verdünntes biotinyliertes Anti-IL-6, auch Detektions- oder Zweitantikörper genannt, hinzugefügt. Dieser bindet an ein weiteres Epitop des Antigens. Nach 1 h Inkubationszeit bei RT auf der Schüttelplatte erfolgte der Waschschrift: die Wells wurden ausgeleert und drei Mal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden $100\text{ }\mu\text{l}$ verdünntes HRP-Streptavidin, also Meerrettichperoxidase gebunden an Streptavidin, in alle Wells gegeben und für weitere 30 min bei RT auf der Schüttelplatte inkubiert. Jedes Streptavidin-Protein bindet mit sehr hoher Affinität an genau ein Biotin-Molekül. Daher ist die HRP-Konzentration, und damit die Intensität des Farbumschlags, direkt proportional zur IL-6 Konzentration. Nach einem weiteren Waschschrift wie oben beschrieben wurden je $100\text{ }\mu\text{l}$ 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)-Lösung in die Wells hinzugegeben und für 15 min im Dunkeln inkubiert. Die Meerrettichperoxidase aktivierte das TMB, wodurch sich die Lösung blau färbte. Diese progrediente Farbreaktion wurde durch die Zugabe von $100\text{ }\mu\text{l}$ H_2SO_4 -Stop-Lösung abgestoppt. Die Folge war ein Farbumschlag der Lösung ins Gelbe.

Anschließend wurden die Farbtintensitäten im Photometer bei 450 nm gemessen. Die dabei erhaltenen Werte konnten nun in Excel mithilfe der Standardverdünnungskurve in die entsprechende IL-6 Konzentration in pg/ml umgerechnet werden.

2.7 Evaluation der pERK1/2- und pSTAT3-Expression im Western Blot

Die Methode des Western Blots wurde in dieser Arbeit dazu verwendet, den Phosphorylierungsstatus und damit die Aktivierung der ERK1/2-Kinase und des STAT3-Signalwegs durch die Zugabe der verschieden konditionierten Überstände zu Tumorzellen zu untersuchen.

2.7.1 Herstellung der Proben für den Western Blot

Bei den im Western Blot untersuchten Proben handelte es sich um Tumorzelllysate von Cal27, HLaC78 und FaDu, die mit verschiedenen Überständen behandelt wurden. Diese wurden unmittelbar vor den Versuchen aus der Zellkulturflasche entnommen und bei 2000 rpm und 37 °C für 5 min zentrifugiert, um den Zelldebris zu entfernen. Untersucht wurden die Tumorzellen nach Kultur mit den folgenden vier verschieden konditionierten Überständen, im Vergleich zu unbehandelten Tumorzellen als Negativkontrolle.

- nat-Überstand
- nat-Überstand mit 5 µg/ml Anti-IL-6
- adipo-Überstand
- osteo-Überstand
- Negativkontrolle: DMEM-EM

Die Tumorzellen wurden mit PBS gewaschen und für 60 min bei 37 °C und 5 % CO₂ mit den abzentrifugierten Überständen bzw. dem DMEM-EM inkubiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und 4 °C kaltes PBS hinzugegeben. Die weitere Aufarbeitung erfolgte auf Eis. Die Zellen wurden mit Hilfe von Zellschaber mechanisch abgelöst und in dem vorhandenen PBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in vorgekühlte 15 ml Röhrchen gegeben, bei 1500 rpm und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde

verworfen und die Zellpellets in 50 µl Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA)-Pufferlösung mit 0,5 µl Protease/Phosphatase Inhibitor Cocktail gelöst, mit einer feinen Nadel resuspendiert und bei 12.000 rpm und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Die so entstandenen Zelllysate wurden in vorgekühlte Reagiergefäße überführt und bis zur Verwendung auf Eis gelagert.

2.7.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Bicinchoninic Acid (BCA)-Methode. Hierbei werden zweiwertige Kupferionen zu den Zelllysaten gegeben, welche durch die Proteine zu einwertigen Kupferionen reduziert werden. Diese geben zusammen mit der Bicinchoninsäure des Reagenzes der Probe eine violette Färbung, welche sich direkt proportional zum Proteingehalt der Probe verhält [Smith et al., 1985]. Hierfür wurden jeweils 1,5 µl der Proben 1:10 in RIPA-Pufferlösung verdünnt. Als Standard dienten sogenannte Bradford-Standards in den Konzentrationen 0,125 mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,5 mg/ml, 1 mg/ml und 2 mg/ml. Von den Standards und den verdünnten Proben wurden jeweils 5 µl in einer 96-Well-Platte doppelt aufgetragen. Dazu wurden 200 µl des BCA-Assay-Reagenz-Gemisch je Well (10 ml Lösung A + 200 µl Lösung B) gegeben. Nach 25-minütiger Inkubation bei 37 °C wurde die Farbintensität der Proben photometrisch bei 570 nm bestimmt. In Excel wurde die Standardgleichung erstellt, mit deren Hilfe die Umrechnung der gemessenen Extinktionswerte in die Proteinkonzentration der Probe in mg/ml erfolgte. So konnte nun von allen Proben die gleiche Proteinmenge auf das Gel aufgetragen werden.

2.7.3 Elektrophorese und Blotten

Um die Proteine der Proben auftrennen und auf Nitrozellulose übertragen zu können, wurde die Methode der diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE, engl. Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis) nach Lämmli [Laemmli, 1970] verwendet. Für die Herstellung der Gele wurden zunächst jeweils zwei Glasplatten mit Hilfe von Klebeband aneinander befestigt; den Abstand dazwischen sicherten Spacer. Zum Abdichten wurde erwärmter Agar-Agar eingefüllt. Aufgrund des gesuchten Molekulargewichts (pERK1/2: 44/42 kDa, pSTAT3α/β: 86/79 kDa) wurde ein

10%iges Trenngel hergestellt. Zu den Bestandteilen des Trenngels siehe Tabelle 2 unter 2.1.1. In noch flüssigem Zustand wurde das Gel zwischen die Glasplatten gegossen und mit Butanol-Wasser-Gemisch bedeckt.

Nachdem das Trenngel ausgehärtet war, wurde das Butanol-Wasser-Gemisch abgegossen, das Sammelgel (siehe Tabelle 2 unter 2.1.1) wiederum zwischen die Glasplatten gegeben. In das noch flüssige Sammelgel wurde vorsichtig ein kammförmiger Spacer gesteckt und so die Taschen in dem Gel geformt.

Während das Sammelgel aushärtete, wurden die Proben mit 5 µg Natriumdodecylsulfat (SDS)-Probenpuffer (engl. Sodium Dodecyl Sulfate) mit 1 % β-Mercaptoethanol versetzt und für 5 min bei 95 °C gekocht.

Die zwischen den Glasscheiben befindlichen Gele wurden in die Elektrophoresekammer eingespannt und diese mit Lämmli-puffer befüllt. Der kammförmige Spacer wurde vorsichtig aus dem Gel gezogen. In die erste Geltasche wurden 7 µl des Größenmarkers, genannt Prestained Protein Ladder, gegeben. Die weiteren Taschen wurden mit dem berechneten Volumen der Proben befüllt. Anschließend wurde der Strom so angelegt, dass die mit SDS beladenen und dadurch negativ geladenen Proteine nach unten wanderten. Dabei wurde bei einem Versuch mit zwei Gelen zunächst eine Spannung von 35 mA gewählt, welche nach ca. 10 min, wenn die Proben die Grenze zum Trenngel erreicht hatten, auf 40 mA erhöht wurde. So dauerte es ungefähr eine Stunde, bis die Proben im Agar-Agar angekommen waren.

Die Proteine wurden durch elektrophoretischen Transfer im Semi-Dry-Verfahren nach Kyhse-Anderson auf die Nitrozellulose-Membran übertragen [Kyhse-Andersen, 1984; Towbin et al., 1979]. Dazu wurden diese zwischen neun Lagen Whatman-Filterpapiere gelegt, wovon drei Lagen und die Nitrozellulose-Membran in Puffer I, sechs Lagen in Puffer II und drei Lagen sowie das Gel in Puffer III getaucht worden waren. Die Stromstärke zum elektrophoretischen Transfer wurde in Abhängigkeit der Größe der Blotmembran gewählt: Fläche der Whatman-Papierlage in cm² x 0,81 = Stromstärke in mA. Der Strom wurde so angelegt, dass die negativ geladenen Proteine in Richtung der Anode vom Gel auf die Nitrozellulose übergingen. Dieser Vorgang dauerte 1,5 h. Anschließend wurde die Membran kurz in Ponceau-S-Lösung getaucht. Diese färbte Proteine

reversibel rot an. So konnte überprüft werden, ob die Proteine auf die Nitrozellulose-Membran übertragen worden waren. Durch Eintauchen in eine Pufferlösung aus Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween20 (engl. Tris-buffered Saline with Tween20, TBS-T-Pufferlösung) wurde die Färbung sofort wieder ausgewaschen. Die Membran wurde für weitere 5 min bei RT in TBS-Puffer gereinigt. Wie auch alle folgenden Inkubations- und Waschschriffe erfolgte dies auf der Schüttelplatte.

2.7.4 Antikörper-Inkubation und Chemolumineszenz

Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Membranen zunächst mit 5%iger Magermilch in TBS-T-Pufferlösung für 1 h bei 4 °C geblockt. Danach erfolgte der Waschschriffe der Blotmembran. Dazu wurde sie drei Mal für je 5 min bei RT in TBS-T-Pufferlösung auf der Schüttelplatte geschwenkt.

Nun wurden die Membranen über Nacht bei 4 °C mit dem Erst-Antikörper inkubiert. Dieser wurde dazu nach Herstellerangaben in 5%igem BSA in TBS-T-Pufferlösung verdünnt. Am nächsten Morgen wurde der oben beschriebene Waschschriffe wiederholt und anschließend der Zweitantikörper, verdünnt in 5%iger Magermilch in TBS-T-Pufferlösung, zu den Blotmembranen gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Zum Abschluss wurde ein weiterer Waschschriffe durchgeführt.

Für die verstärkte Chemolumineszenz (engl. Enhanced Chemiluminescence, ECL) wurden unmittelbar zuvor die beiden Komponenten des ECL-Substrates gemischt und auf die Membran mit den nun antikörpermarkierten Proteinen gegeben. Diese wurde mit Frischhaltefolie bedeckt in einer Röntgenkassette in den Dunkelraum transportiert. Dort wurde die Kassette geöffnet und ein Röntgenfilm für 5 min angelegt.

Zum Entwickeln des Films wurde dieser zunächst in Rodinal Spezial Entwickler-Lösung, welche 1:15 mit destilliertem Wasser verdünnt worden war, gelegt und, sobald die Banden sichtbar waren, ins Stopp-Bad gegeben. Das Stopp-Bad wurde aus einer Lösung aus Eisessig 1:100 mit destilliertem Wasser hergestellt. Anschließend wurde der Film für 3 min in das Fixier-Bad gegeben. Dieses bestand aus der Fixierlösung Superfix Plus, 1:7 verdünnt mit destilliertem Wasser.

2.7.5 Densitometrische Auswertung der Banden

Mit Hilfe des Grafikprogramms ImageJ [Rasband, 1997-2016] wurden die Banden des Western Blots densitometrisch ausgewertet. Die so erhaltenen Werte wurden jeweils prozentual zur Negativkontrolle, Tumorzellen kultiviert in DMEM-EM, berechnet. Da von jeder Probe die gleiche Proteinmenge aufgetragen wurde, erlaubten diese Daten eine semiquantitative Auswertung und damit Vergleiche zwischen den einzelnen Proben.

2.8 Graphische Darstellung

Zur Erstellung der Graphen wurde das Statistikprogramm Graphpad Prism 6 verwendet. Für Diagramme, die Ergebnisse mehrerer Versuchsreihen zu einem Zeitpunkt darstellen, wurde die Boxplot-Darstellung nach Tukey gewählt. Hierbei wird die 25. und 75. Perzentile als die untere bzw. obere Begrenzungslinie einer Box dargestellt, welche somit dem Interquartilsabstand entspricht. Eine horizontale Linie innerhalb der Box entspricht dem Median. Die T-Linien, genannt Whisker, repräsentieren die Minimal- bzw. Maximalwerte, die innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstand liegen. Alle anderen Werte sind als Ausreißer definiert und mit „°“ gekennzeichnet.

In Diagramme, die zeitliche Verläufe abbilden, wurden die Mediane der einzelnen Zeitpunkte durch Linien verbunden dargestellt und die Interquartilsabstände jeweils durch Whisker angegeben. „°“ zeigt wiederum Ausreißer an. Bei Datensätzen mit zu geringer Probenzahl für eine aussagekräftige statistische Auswertung wurde die Mittelwerte bzw. Mediane exemplarisch in Säulendiagrammen dargestellt.

2.9 Statistische Auswertung

Die Auswertung erfolgte in Absprache mit der statistischen Beratung des Instituts für Klinische Epidemiologie und Biometrie der Universität Würzburg und wurde mit Hilfe von Graphpad Prism 6 durchgeführt. Als signifikant wurden Werte von $p \leq 0,05$ betrachtet und in den Graphen mit einem Sternchen (*) markiert.

Zur statistischen Auswertung wurden der Friedman- und Wilcoxon-Test verwendet. Der Friedman-Test ist ein nichtparametrisches Verfahren, mit dessen

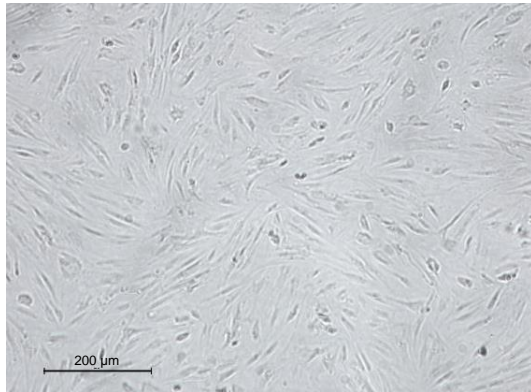
Hilf drei oder mehr gepaarte Versuchsproben auf ihre Signifikanz hin überprüft werden können. Um feststellen zu können, zwischen welchen Proben ein signifikanter Unterschied besteht, ist im Anschluss daran ein weiterer Test nötig. Dazu wurde der Wilcoxon-Test verwendet. Dieser gehört ebenso zu den nichtparametrischen Tests. Mit ihm können jeweils zwei gepaarte Versuchsproben auf ihre Signifikanz getestet werden.

3 Ergebnisse

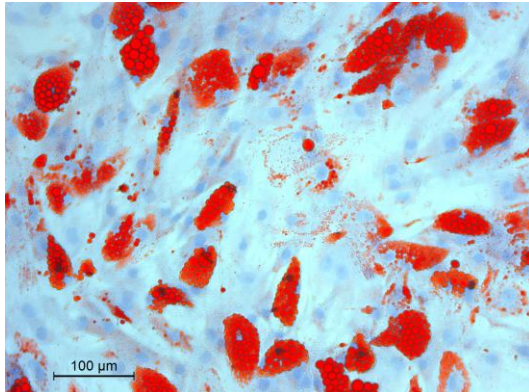
3.1 Ergebnisse der Charakterisierung der mesenchymalen Stammzellen

3.1.1 Nachweis der Differenzierung anhand von histologischen Färbungen

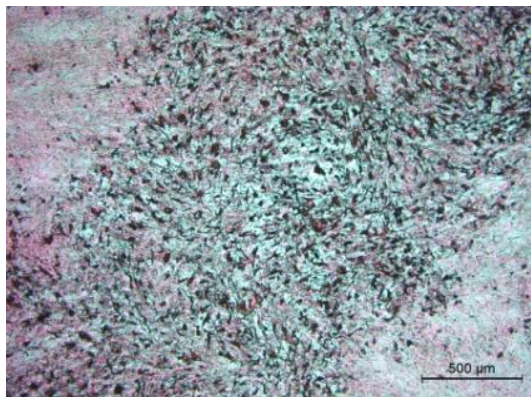
Der Erfolg der Differenzierungen konnte mit Hilfe der Färbungen gezeigt werden.



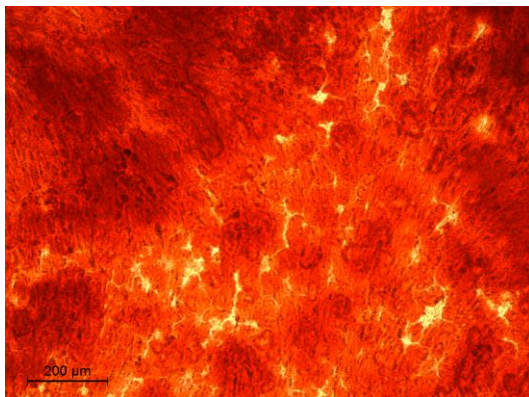
A: native MSC



B: Oil Red O-Färbung



C: Von-Kossa Färbung



D: Alizarin Färbung

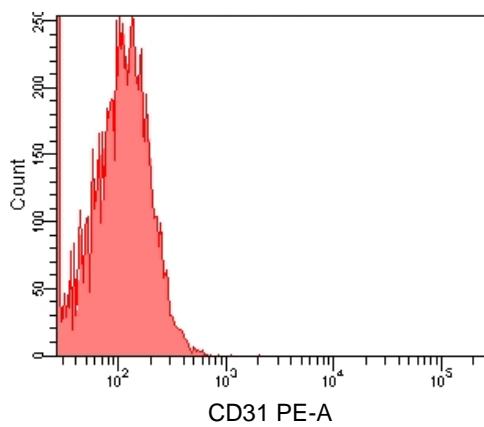
Abbildung 6. Färbungen der MSC zum Nachweis der Differenzierung
A: native MSC nach Kultur in DMEM-EM. B: Oil Red O-Färbung der MSC nach adipogener Differenzierung. Fettvakuolen sind rot angefärbt. C: Von-Kossa-Färbung der MSC nach osteogener Differenzierung. Kalziumablagerungen sind braunschwarz angefärbt. D: Alizarin-Färbung der MSC nach osteogener Differenzierung. Kalziumablagerungen sind orange-rot angefärbt.

Native MSC sind in Abbildung 6, A zu sehen. Die mit adipogenem Differenzierungsmedium behandelten MSC hatten Lipidvakuolen eingelagert. Der histologische Nachweis erfolgte mit Hilfe der Oil Red O-Färbung. Dadurch wurden intrazelluläre Lipidvakuolen rot angefärbt und erschienen im Präparat als Tropfen (vgl. Abbildung 6, B). Analog dazu wurden bei den osteogenen

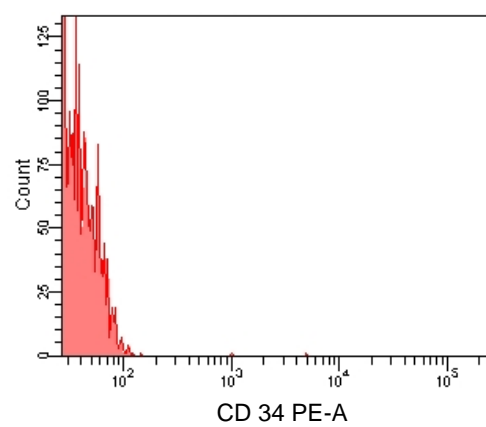
differenzierten MSC Kalziumablagerungen der extrazellulären Matrix in der Alizarin-Färbung (rot-orange) und in der Von-Kossa-Färbung (schwarz) dargestellt (vgl. Abbildung 6, C und D).

3.1.2 Durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenmarker

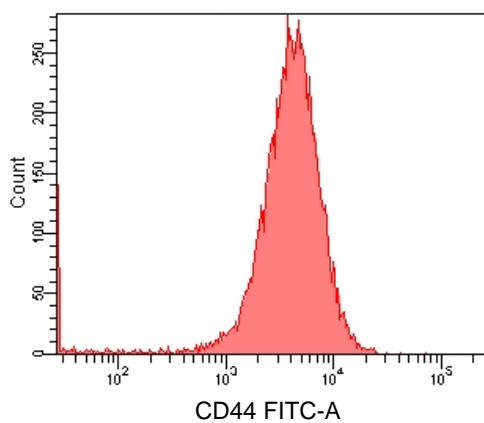
In der Durchflusszytometrie wurden die MSC auf ihre Oberflächenmarker hin untersucht. Dabei zeigte sich, dass an ihrer Oberfläche CD31, CD34 und CD45 nicht oder nur in sehr geringen Mengen gefunden werden konnte, wohingegen CD44, CD73 und CD90 exprimiert wurden (siehe Abbildung 7).



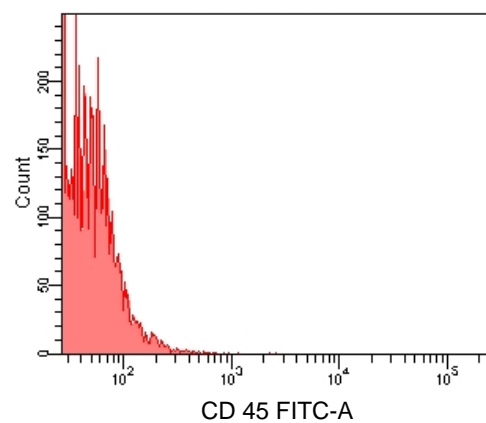
A: MSC negativ für CD31 PE-A



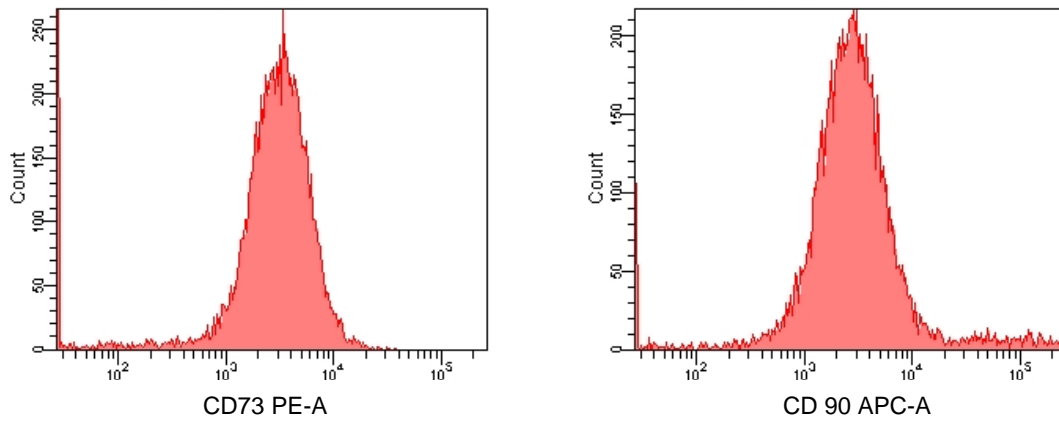
B: MSC negativ für CD34 PE-A



C: MSC positiv für CD44 FITC-A



D: MSC negativ für CD45 FITC-A



E: MSC positiv für CD73 PE-A

F: MSC positiv für CD90 APC-A

Abbildung 7. Histogramme der durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenmarker der MSC

MSC sind positiv für die Oberflächenmarker für CD44, CD73, CD90 (C, E, F) und negativ oder schwach positiv für CD31, CD34, CD45 (A, B, D).

3.1.3 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion der osteogenen und adipogenen Andifferenzierung

Mit Hilfe der Real-Time PCR wurden die für eine Woche andifferenzierten MSC auf die Expression von spezifischen Markergenen untersucht. Dazu wurde das Fatty Acid Binding Protein 4 (FABP4), Leptin (LEP) und Lipoproteinlipase (LPL) für die adipogene Differenzierung analysiert. Für die osteogene Differenzierung wurden die alkalische Phosphatase (ALPL), Osteocalcin (BGLP, engl. Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein), Kollagen I und der Transkriptionsfaktor RUNX2 untersucht. Da die Auswertung nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode erfolgte [Livak et al., 2001], sind die Ergebnisse relativ sowohl in Bezug auf GAPDH als auch auf die nativen MSC angegeben.

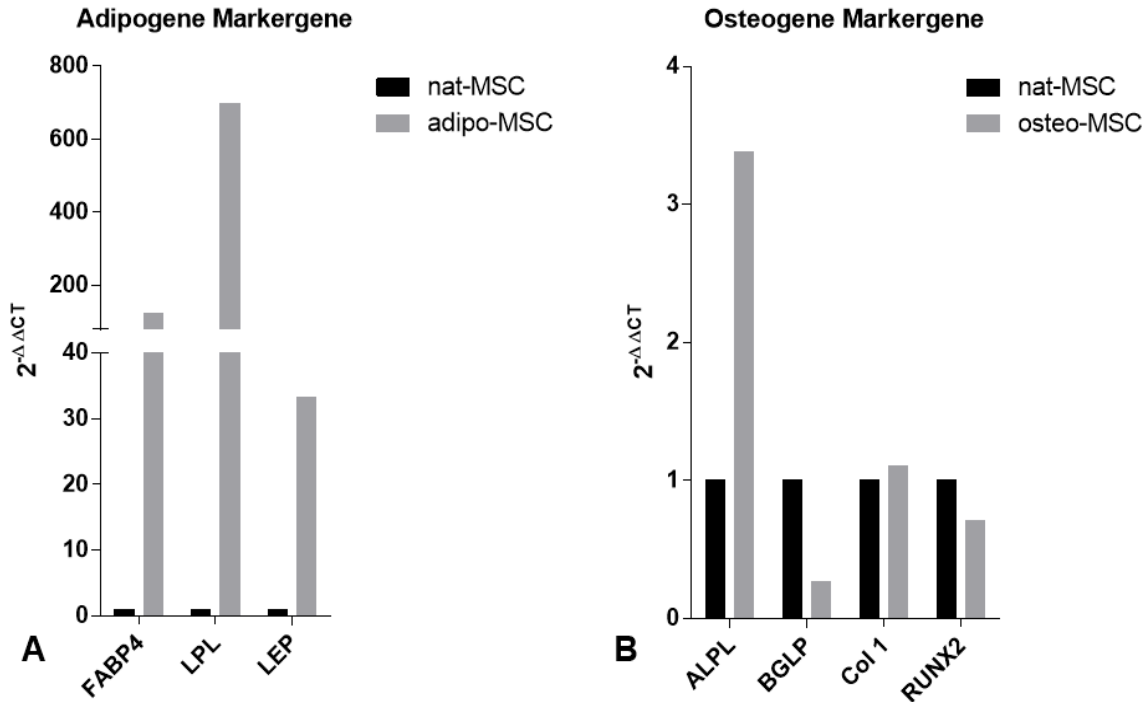


Abbildung 8. Graphische Darstellung der Ergebnisse der Real-Time PCR von adipogenen und osteogenen Markergenen bei andifferenzierten MSC Expression spezifischer Markergene von andifferenzierten MSC im Vergleich zu nativen MSC. Die Auswertung erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode, daher wurden die gemessenen Werte für die nativen MSC jeweils 1 gleichgesetzt. Alle andere Werte zeigen die n-fache Expression des entsprechenden Gens.
 A: Adipogene Markergene, B: Osteogene Markergene
 FABP4: Fatty Acid Binding Protein 4, LPL: Lipoproteinlipase, LEP: Leptin, ALPL: alkalische Phosphatase, BGLP: Bone Gamma-Carboxyglutamate Protein, Col1: Kollagen 1.

Dabei zeigte sich, dass die adipogen andifferenzierten MSC die spezifischen Markerproteine bereits hoch exprimierten (vgl. Abbildung 8, A), während bei den osteogen andifferenzierte MSC lediglich ALPL diskret erhöht war (vgl. Abbildung 8, B).

3.2 Ergebnisse der Proliferationsassays

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Proliferationsassays nach Versuchsaufbau gegliedert dargestellt.

Zur Auswertung der Zellzahlen wurden diese jeweils prozentual zur Anfangszellzahl, welche an t_0 ausgesät worden war, berechnet und so verglichen. Daher wurde die Zellzahl zu t_0 jeweils gleich 100 % gesetzt.

Um die Ergebnisse auf ihre Signifikanz hin zu überprüfen, wurde zunächst jeweils ein Friedman-Test durchgeführt. Falls hierbei ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden konnte, wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Tests die Ergebnisse der einzelnen Proben jeweils als Paare gegeneinander überprüft. Als Signifikanzniveau wurde $p \leq 0,05$ betrachtet.

3.2.1 Ergebnisse des Proliferationsassays mit nativen mesenchymalen Stammzellen

In Abbildung 9 sind die jeweils an t_4 gemessenen Zellzahlen der Proliferationsassays mit nativen MSC, in Co-Kultur (nat-Co-Kultur) im Vergleich zur Kultur mit konditioniertem Überstand der nativen MSC (nat-Überstand), abgebildet. In keinem dieser Proliferationsassays zeigten sich statistisch signifikante Unterschiede.

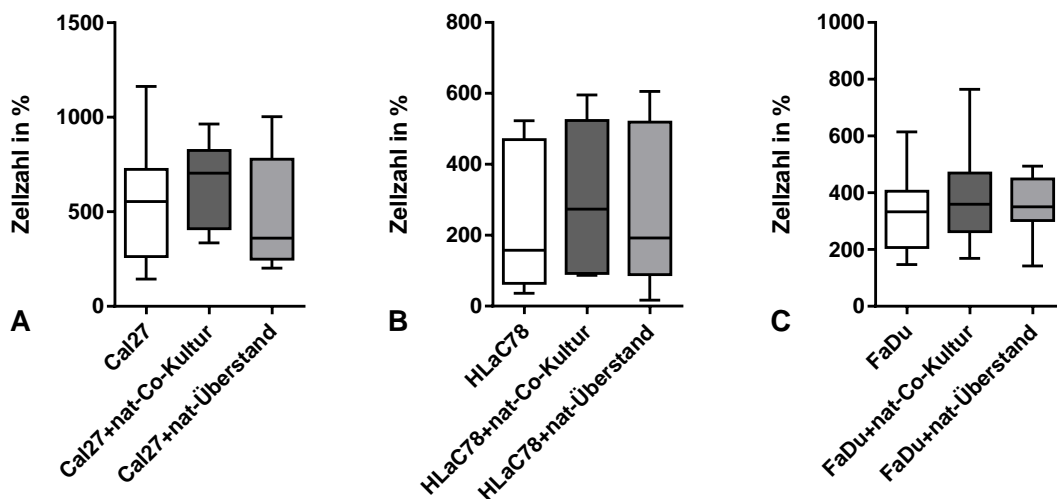


Abbildung 9. Proliferationsassays mit nativen MSC, Zellzahl an t_4 . Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Proben. Zellzahlen werden jeweils prozentual zu Ausgangszellzahlen an t_0 angegeben. Die Darstellung erfolgt als Box-Whisker-Plot nach Tukey.

Bezüglich der Vitalität der Zellen an t_4 ergaben sich signifikant geringere Werte lediglich für die Kultivierung der Cal27-Tumorzellen mit nat-Überstand im Vergleich zu den unbehandelten Cal27 (vgl. Abbildung 10).

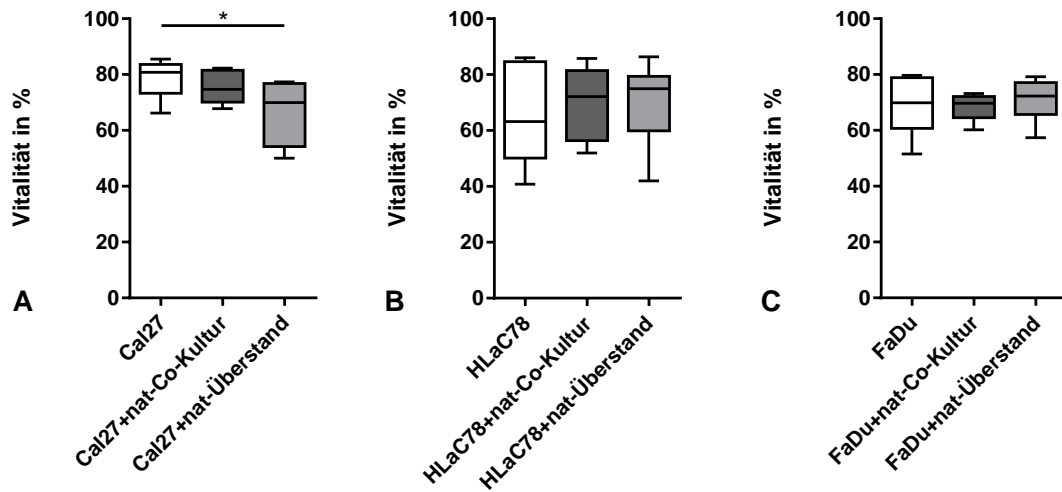


Abbildung 10. Proliferationsassays mit nativen MSC, Vitalität an t_4 . Signifikant war der Unterschied zwischen Cal27 nativ und Cal27 in Kultur mit nat-Überstand (Friedman-Test: $p=0,0179$, Wilcoxon-Test: $p=0,0039$); mit „*“ gekennzeichnet. Die Darstellung erfolgt als Box-Whisker-Plot nach Tukey.

Die Cal27-Tumorzelllinie vermehrte sich über die vier Tage exponentiell. Dabei proliferierten die Zellen in nat-Co-Kultur am stärksten und jene mit nat-Überstand am schwächsten (vgl. Abbildung 11, A).

Bei der HLaC78-Zelllinie blieben die Zellzahlen im Verlauf des Assays niedrig. Die nativen Tumorzellen und die Kultur mit nat-Überstand zeigten ähnlich geringe Wachstumsraten. Die Tumorzellen in nat-Co-Kultur proliferierten stärker (vgl. Abbildung 11, B).

Im Assay der FaDu-Tumorzellen unterschieden sich die Wachstumsraten der Proben nur gering voneinander (vgl. Abbildung 11, C).

Die Vitalität aller Proben sank nach der Aussaat stark ab. Bei der Cal27-Tumorzelllinie erreichten die nativen Proben bis t_4 die höchsten Vitalitätswerte. Die Cal27 mit nat-Überstand zeigten bis zum letzten Tag die geringsten Vitalitätswerte (vgl. Abbildung 11, D). Sowohl bei HLaC78 als auch bei FaDu stagnierte die durchschnittliche Vitalität bei Werten um die 70 %. Während bei HLaC78 noch größere Unterschiede zwischen den Proben sichtbar waren, zeigten die FaDu-Tumorzellen in allen drei Proben weitgehend ähnliche Vitalitätswerte (vgl. Abbildung 11, E bzw. F).

Ergebnisse

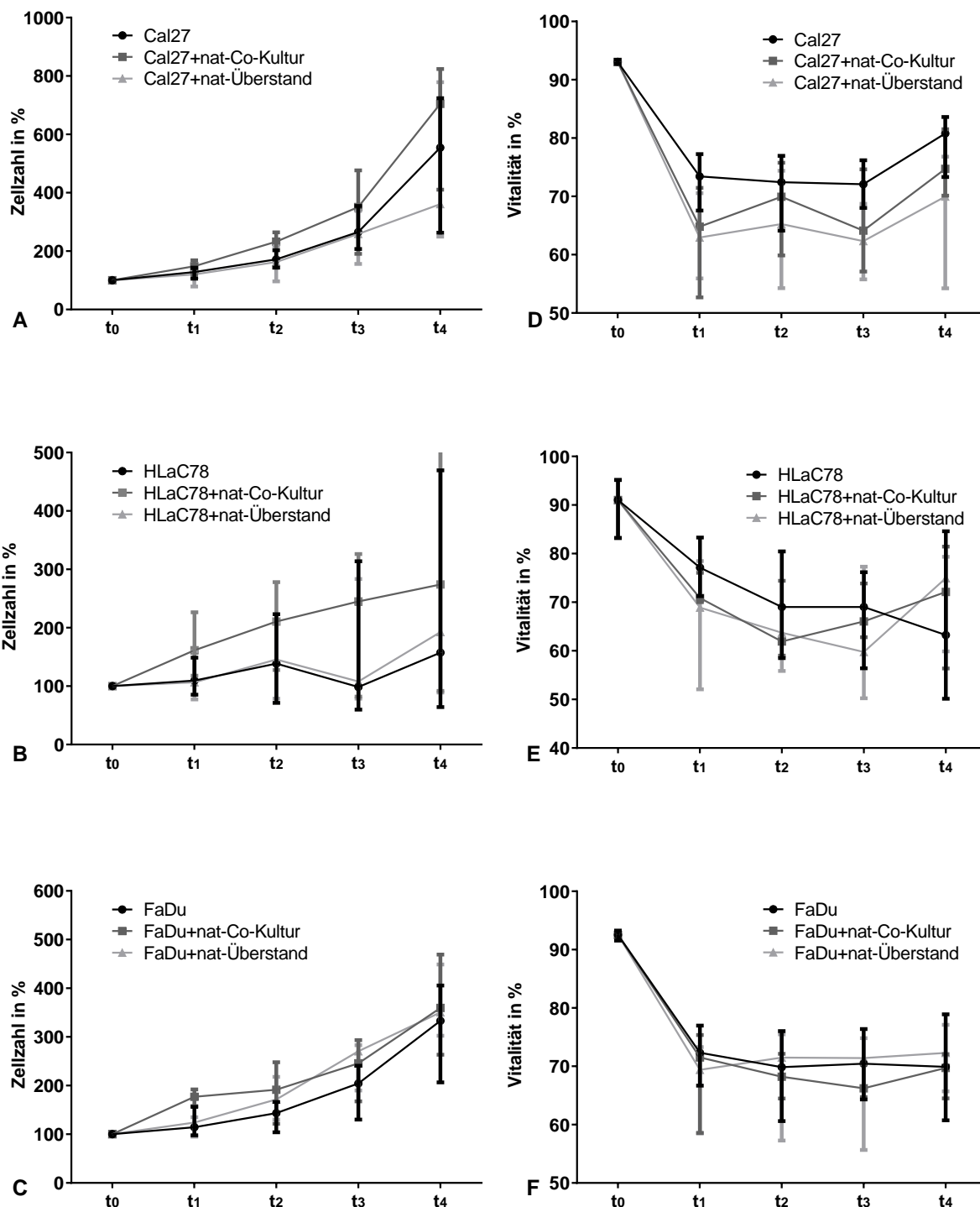


Abbildung 11. Proliferationsassay mit nativen MSC; Zellwachstum und Vitalität t_0 - t_4
 A-C: Zeigen die Entwicklung der Zellzahlen über die Zeit. Die Zellzahlen sind jeweils prozentual zu Ausgangszellzahlen an t_0 angegeben. D-F: Zeigen die Entwicklung der Vitalität der Tumorzellen über die Zeit. Dargestellt sind die Mediane der Messungen, jeweils durch Linien verbunden. Die Whisker zeigen das Minimum und Maximum innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstands.

3.2.2 Ergebnisse des Proliferationsassays mit Überstand andifferenzierter mesenchymaler Stammzellen

Im Proliferationsassay mit dem Überstand von andifferenzierten MSC zeigten die Cal27- und HLaC78-Tumorzellen mit osteo-Überstand ein signifikant geringeres Wachstum als die Tumorzellen, die in DMEM-EM bzw. adipo-Überstand kultiviert worden waren. Für die FaDu-Tumorzelllinie ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (vgl. Abbildung 12).

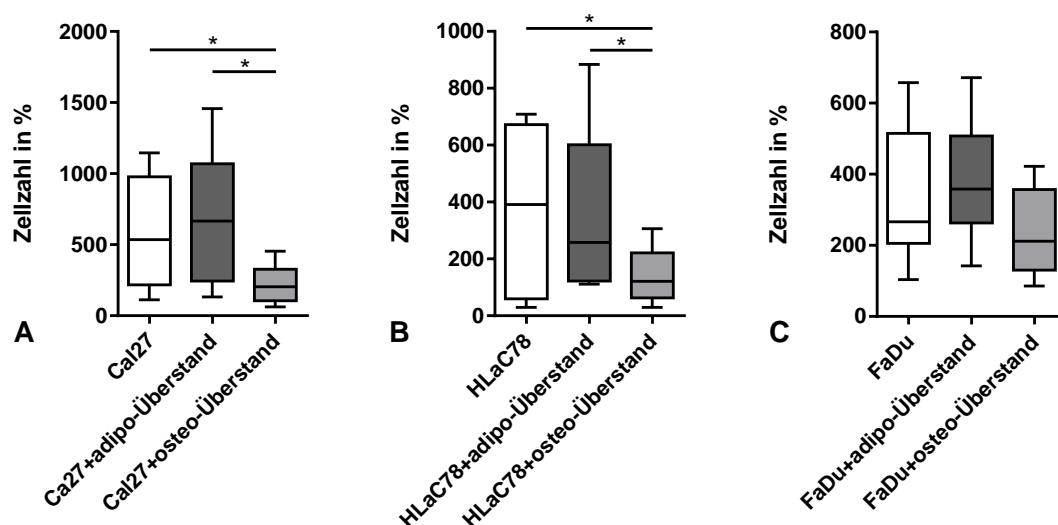


Abbildung 12. Proliferationsassays mit konditionierten Überständen; Zellzahl an t_4 . Signifikante Unterschiede zeigten sich bei Cal27 mit konditionierten Überständen (Friedman-Test: $p=0,0034$): Cal27 nativ und Cal27 mit osteo-Überstand (Wilcoxon-Test: $p=0,0098$), Cal27 mit adipo-Überstand und Cal27 mit osteo-Überstand (Wilcoxon-Test: $p=0,0020$).

Auch für HLaC78 mit konditionierten Überständen konnten signifikante Unterschiede nachgewiesen werden (Friedman-Test: $p=0,0054$): HLaC78 nativ und HLaC78 mit osteo-Überstand (Wilcoxon-Test: $p=0,0195$), HLaC78 mit adipo-Überstand und HLaC78 mit osteo-Überstand (Wilcoxon-Test: $p=0,0039$).

Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen sind mit „*“ gekennzeichnet. Zellzahlen werden jeweils prozentual zu Ausgangszellzahlen an t_0 angegeben. Die Darstellung erfolgt als Box-Whisker-Plot nach Tukey.

Bei der Vitalitätsmessung der Tumorzellen am Endpunkt (t_4) wurde deutlich, dass auch hier alle drei Tumorzelllinien in Kultur mit osteo-Überstand eine signifikant schlechtere Vitalität vorwiesen als die nativen bzw. die Tumorzellen, die unter dem adipo-Überstand gewachsen waren (vgl. Abbildung 13).

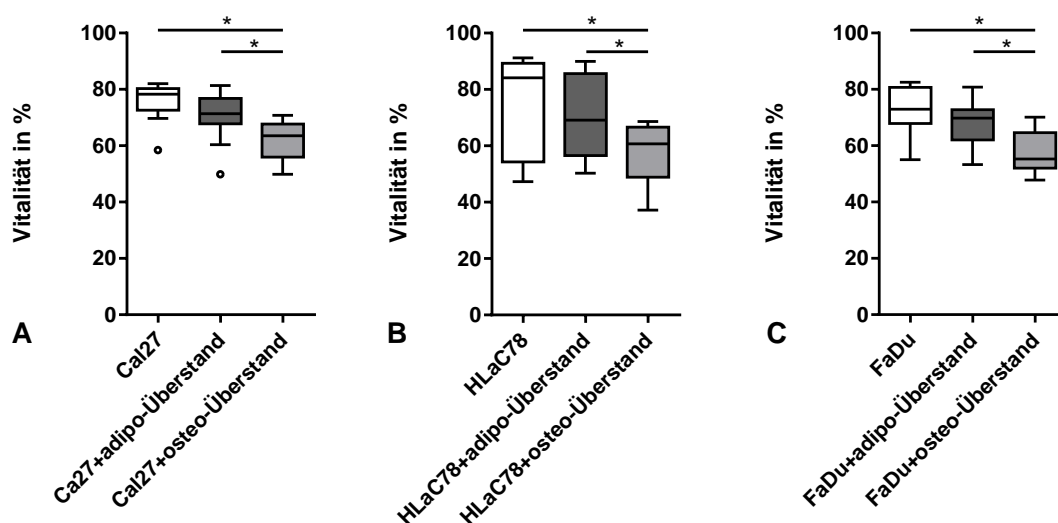


Abbildung 13. Proliferationsassays mit konditionierten Überständen, Vitalität an t_4 . Signifikante Unterschiede zeigten sich für Cal27 mit konditionierten Überständen (Friedman-Test: $p=0,0063$): Cal27 nativ und Cal27 mit osteo-Überstand (Wilcoxon-Test: $p=0,0039$), Cal27 mit adipo-Überstand und Cal27 mit osteo-Überstand (Wilcoxon-Test: $p=0,0371$).

Auch für HLaC78 mit konditionierten Überständen ergaben sich signifikante Unterschiede (Friedman-Test: $p=0,0303$): HLaC78 nativ und HLaC78 mit osteo-Überstand (Wilcoxon-Test: $p=0,0195$), HLaC78 mit adipo-Überstand und HLaC78 mit osteo-Überstand (Wilcoxon-Test: $p=0,0137$),

Ebenso ergaben sich signifikante Unterschiede für FaDu mit konditionierten Überständen (Friedman-Test: $p=0,0002$): FaDu nativ und FaDu mit osteo-Überstand (Wilcoxon-Test: $p=0,0020$), FaDu mit adipo-Überstand und FaDu mit osteo-Überstand (Wilcoxon-Test: $0,0039$).

Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen sind mit „*“ gekennzeichnet. Die Darstellung erfolgt als Box-Whisker-Plot nach Tukey.

Während native Tumorzellen in allen drei Proliferationsassays ähnliche Proliferationsraten wie diejenigen mit adipo-Überstand zeigten, stagnierte das Wachstum der Tumorzellen, die mit osteo-Überstand kultiviert worden waren weitestgehend. Auch die Vitalität war bei allen drei Zellarten unter dem osteo-Überstand wesentlich geringer und lagen bei 50–60 %. Die höchsten Vitalitätswerte zeigten alle drei Tumorzellreihen jeweils in nativem Zustand (vgl. Abbildung 14).

Ergebnisse

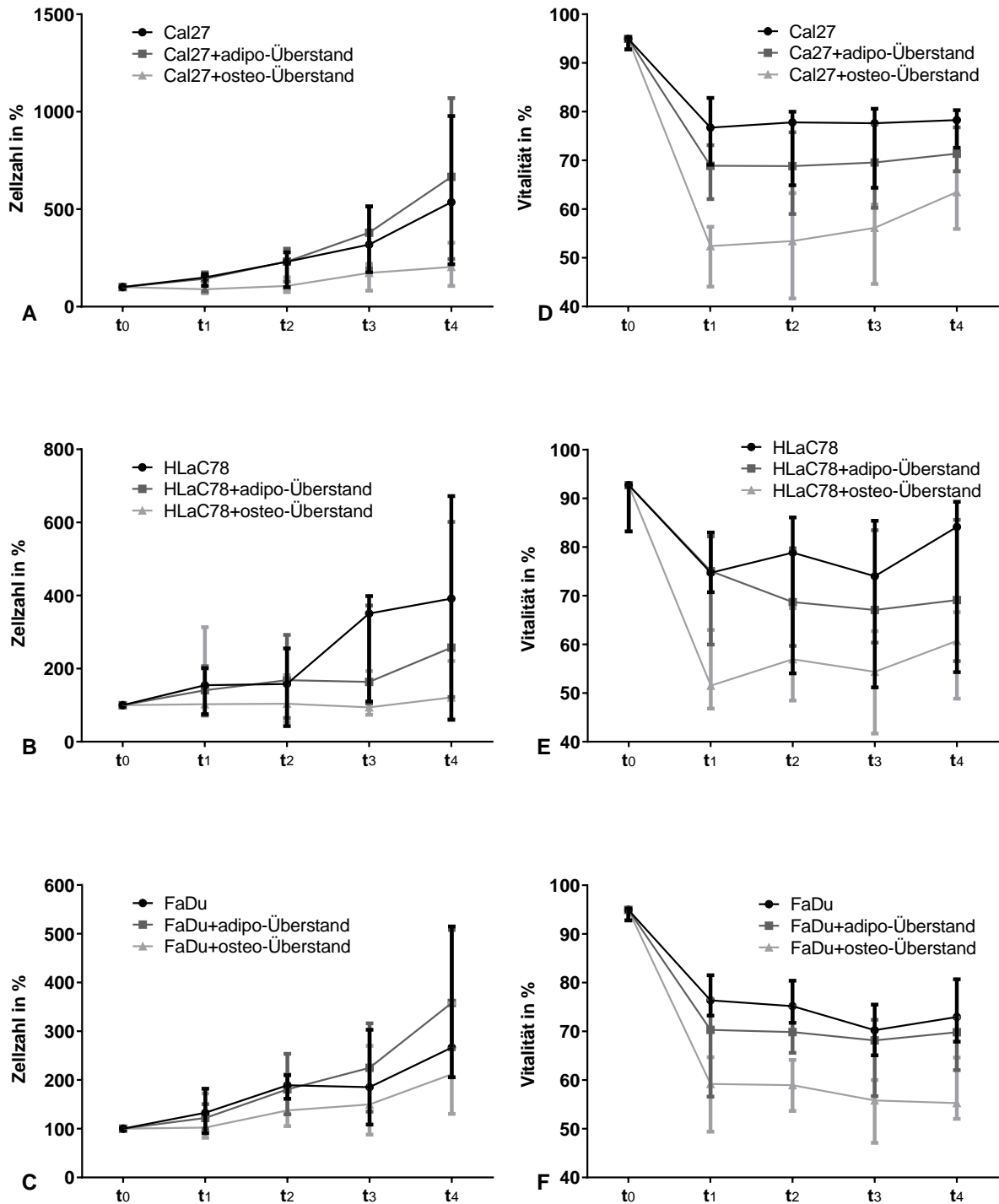


Abbildung 14. Proliferationsassay mit konditioniertem Überstand; Zellwachstum und Vitalität t_0 - t_4

A-C: Zeigen die Entwicklung der Zellzahlen über die Zeit. Die Zellzahlen sind jeweils prozentual zu Ausgangszellzahlen an t_0 angegeben. D-F: Zeigen die Entwicklung der Vitalität der Tumorzellen über die Zeit. Dargestellt sind die Mediane der Messungen, jeweils durch Linien verbunden. Die Whisker zeigen das Minimum und Maximum innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstands.

3.2.3 Ergebnisse des Proliferationsassays in Co-Kultur mit andifferenzierten mesenchymalen Stammzellen

Für Cal27 und HLaC78 zeigten beide Co-Kulturen mit andifferenzierten MSC signifikant stärkere Proliferation als die Tumorzellen, die in DMEM-EM kultiviert worden waren. Zwischen den Co-Kulturen mit adipogen und osteogen andifferenzierten MSC war kein Unterschied nachweisbar. Die Proliferation der FaDu-Zelllinie wurde durch die Co-Kultur nicht beeinflusst (vgl. Abbildung 15).

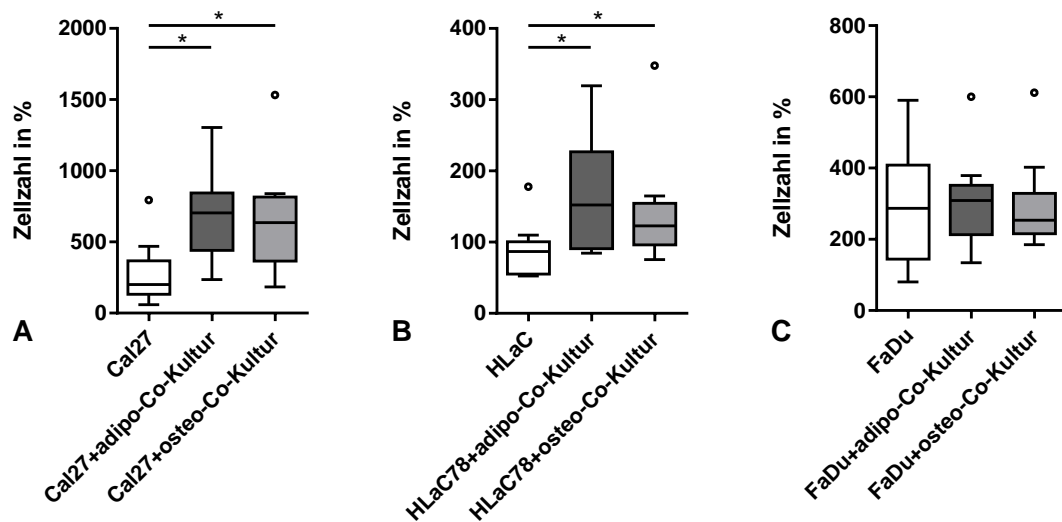


Abbildung 15. Proliferationsassays mit konditionierter Co-Kultur, Zellzahl an t_4 . Signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen Cal27 mit konditionierten Co-Kulturen (Friedman-Test: $p=0,0004$): Cal27 nativ und Cal27 mit adipo-Co-Kultur (Wilcoxon-Test: $p=0,0039$), Cal27 nativ und Cal27 mit osteo-Co-Kultur (Wilcoxon-Test: $p=0,0020$). Auch zwischen HLaC78 mit konditionierten Co-Kulturen ergaben sich signifikante Unterschiede (Friedman-Test: $p=0,0259$): HLaC78 nativ und HLaC78 mit adipo-Co-Kultur (Wilcoxon-Test: $p=0,0039$), HLaC78 nativ und HLaC78 mit osteo-Co-Kultur (Wilcoxon-Test: $p=0,0488$). Signifikante Unterschiede zwischen zwei Gruppen sind mit „*“ gekennzeichnet. Zellzahlen werden jeweils prozentual zu Ausgangszellzahlen an t_0 angegeben. Die Darstellung erfolgt als Box-Whisker-Plot nach Tukey.

Beim Vergleich der Vitalität der Tumorzellen an t_4 zeigte sich lediglich für Cal27 ein signifikanter Unterschied im Friedman-Test, jedoch nicht im Wilcoxon-Test (vgl. Abbildung 16).

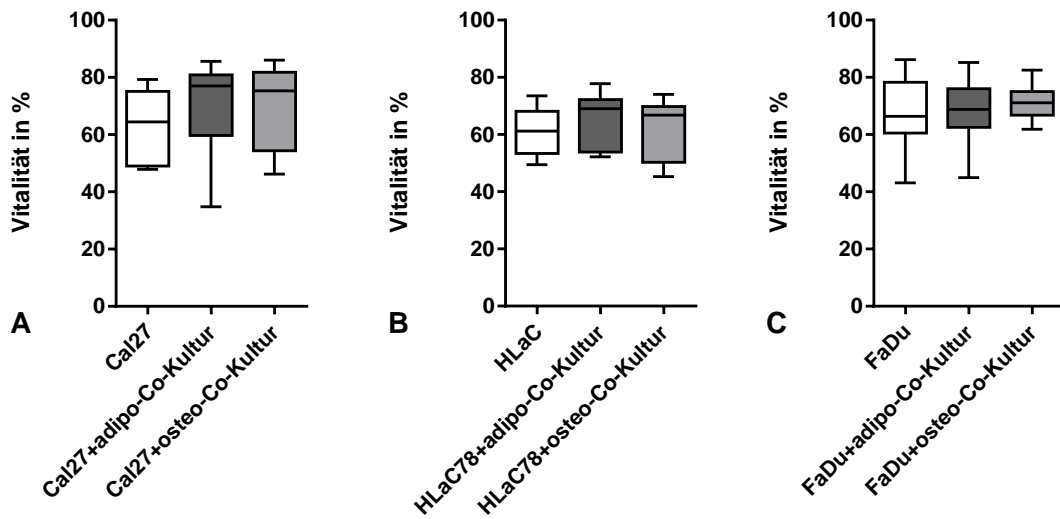


Abbildung 16. Proliferationsassays mit konditionierter Co-Kultur; Vitalität an t_4
 Die untersuchten Gruppen zeigten im Wilcoxon Test keine statistisch signifikanten Unterschiede, nur für Cal27 war der Friedman-Test signifikant ($p=0,0456$).
 Darstellung erfolgt als Box-Whisker-Plot nach Tukey.

In Co-Kultur mit andifferenzierten MSC zeigten vor allem Cal27 und HLaC78-Tumorzellen ein gesteigertes Wachstum im Vergleich zur unbehandelten Tumorzell-Kultur. Bei den FaDu-Tumorzellen glich sich dieser Unterschied bis t_4 weitestgehend aus. Bei der HLaC78-Tumorzelllinie verringerte sich durchschnittlich die Zellzahl bis t_4 . Sowohl bei HLaC78 als auch bei FaDu zeigte sich ein „Knick“ in der Wachstumskurve an t_2 (vgl. Abbildung 17, A–C). Auch für die Entwicklung der Vitalität zeigte sich hier kein klares Bild, sondern deutliche Schwankungen im Verlauf. Die niedrigsten Vitalitätswerte waren bei Cal27 und HLaC78 bei den nativen Tumorzellen zu messen (vgl. Abbildung 17, D–F).

Ergebnisse

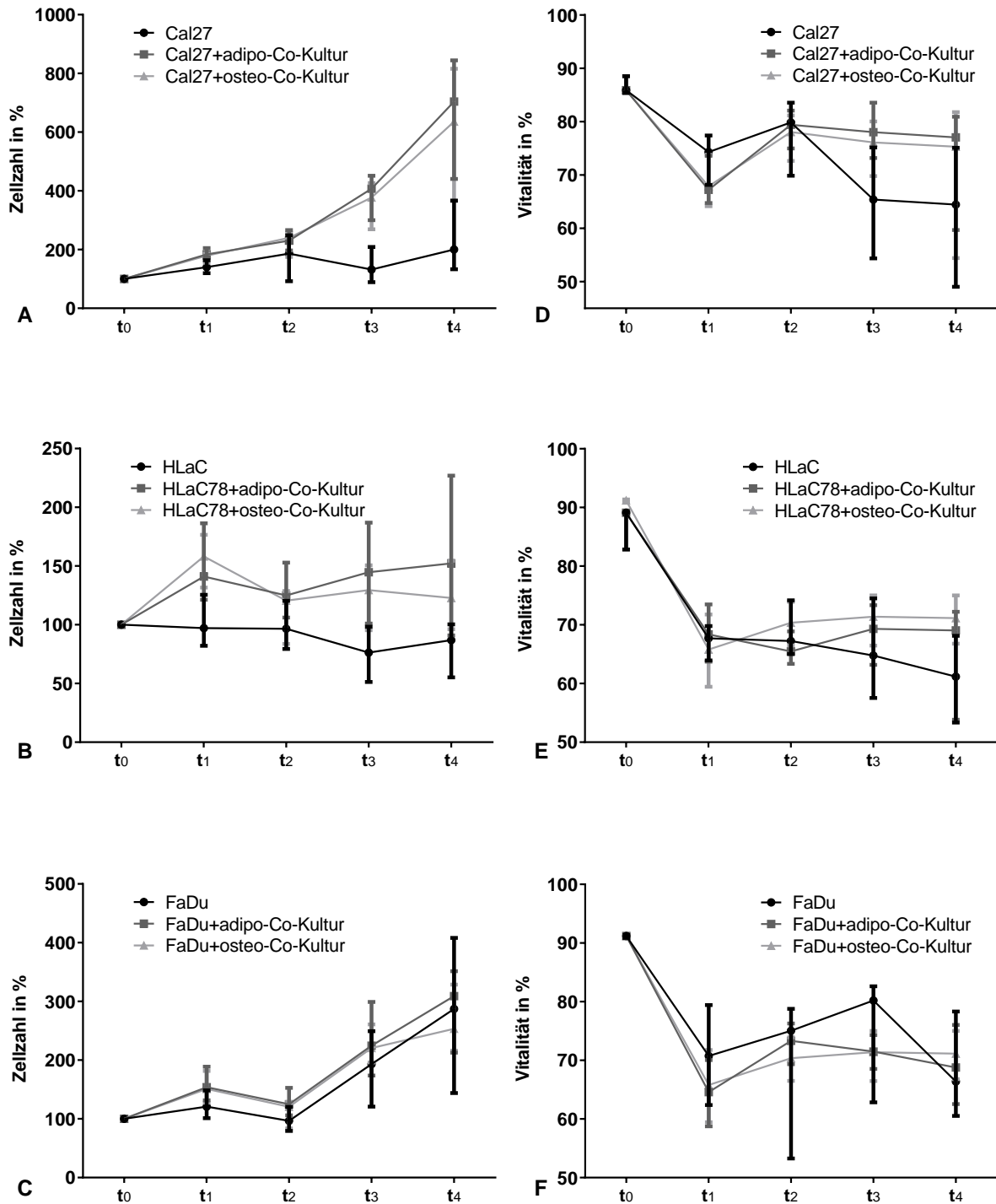


Abbildung 17. Proliferationsassay mit konditionierter Co-Kultur; Zellwachstum und Vitalität t_0 - t_4

A-C: Zeigen die Entwicklung der Zellzahlen über die Zeit. Die Zellzahlen sind jeweils prozentual zu Ausgangszellzahlen an t_0 angegeben. D-F: Zeigen die Entwicklung der Vitalität der Tumorzellen über die Zeit. Dargestellt sind die Mediane der Messungen, jeweils durch Linien verbunden. Die Whisker zeigen das Minimum und Maximum innerhalb des 1,5-fachen Interquartilsabstands.

3.3 Ergebnisse der Zytokin-Analyse

3.3.1 Dot Blot Assay: Überblick über beteiligte Zytokine

Die Betrachtung und Auswertung der Dots in den entwickelten Assays erfolgte jeweils in Relation zur Positivkontrolle. Bereits bei reiner Betrachtung fielen Unterschiede zwischen den Zytokin-Expressionsmuster der Proben auf.

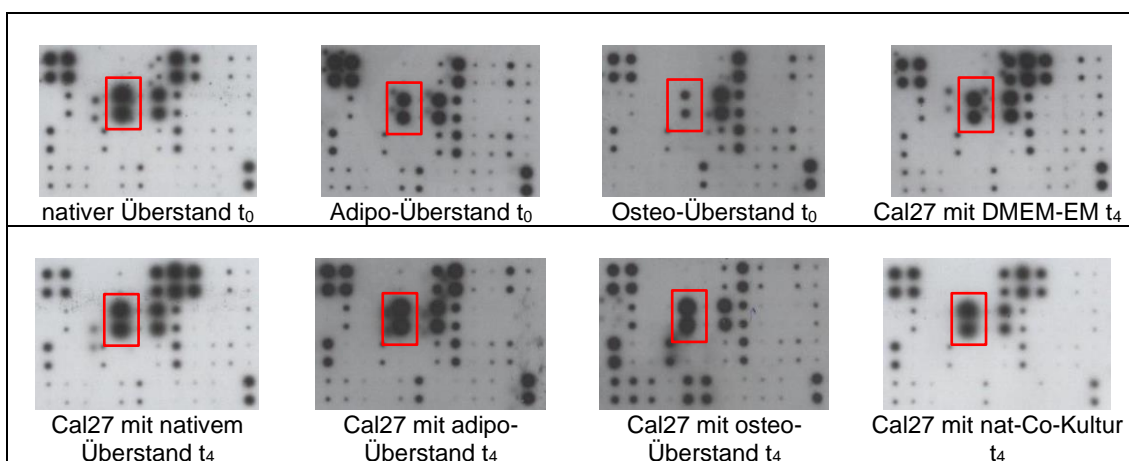


Abbildung 18. Dot Blot Assay

Cal27 im Proliferationsassay mit verschiedenen konditionierten Überständen und in MSC-Co-Kultur zu t_4 im Vergleich zu den andifferenzierten Überständen zu t_0 . IL-6 ist rot hervorgehoben. Für die densitometrische Auswertung siehe Abbildung 20.

+	+	-	-	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- α	I-309	IL-1 α	IL-1 β
+	+	-	-	ENA-78	GCSF	GM-CSF	GRO	GRO- α	I-309	IL-1 α	IL-1 β
IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12	IL-13	IL-15	IFN- γ
IL-2	IL-3	IL-4	IL-5	IL-6	IL-7	IL-8	IL-10	IL-12	IL-13	IL-15	IFN- γ
MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MCD	MIG	MIP-16	RANTES	SCF	SDF-1TA	RC	TGF- β 1
MCP-1	MCP-2	MCP-3	MCSF	MCD	MIG	MIP-16	RANTES	SCF	SDF-1TA	RC	TGF- β 1
TNF- α	TNF- β	EGF	IGF-1	Angiogenin	OncostatinM	Thrombopoietin	VEGF	PDGF-BB	Leptin	-	+
TNF- α	TNF- β	EGF	IGF-1	Angiogenin	OncostatinM	Thrombopoietin	VEGF	PDGF-BB	Leptin	-	+

Abbildung 19. Legende des Dot Blot Assays

Übersicht nach dem Herstellerprotokoll von Human Cytokine Antibody Array C3 Kit von RayBiotech.

Die densitometrische Auswertung der Dots zeigte, dass sich die IL-6 Konzentration in Abhängigkeit vom Überstand bzw. der Co-Kultur, mit der die Tumorzellen kultiviert worden waren, veränderte.

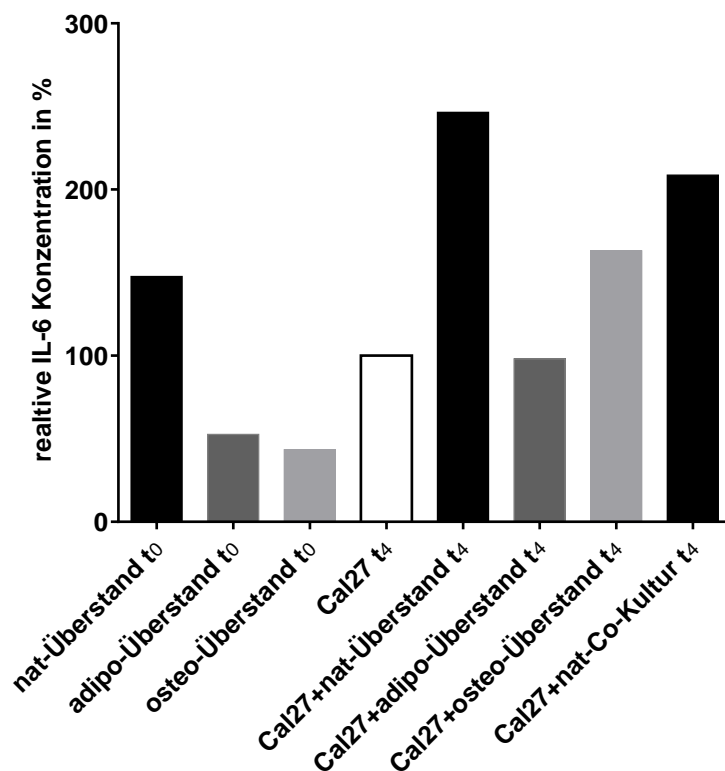


Abbildung 20. Densitometrische IL-6 Konzentration im Dot Blot
Angabe in Prozent zur IL-6 Konzentration in Überstand der nativen Cal27 an t₄.

Zunächst ließ sich feststellen, dass an t₀, also vor Zugabe der MSC-Überstände zu den Tumorzellen, im untersuchten nat-Überstand IL-6 höher konzentriert war als im adipo- und osteo-Überstand (vgl. Abbildung 20).

Nach vier Tagen Kultivierung von Cal27-Tumorzellen mit den verschiedenen konditionierten Überständen bzw. in Co-Kultur zeigte sich, dass die Kultur mit nat-Überstand die höchste Konzentration von IL-6 vorwies (247 % der Konzentration bei Cal27 nativ), gefolgt von der nat-Co-Kultur. Auch die Kultivierung mit osteo-Überstand führte zu einer Steigerung der IL-6 Konzentration im Vergleich zu reinem DMEM-EM; mit adipo-Überstand blieb die IL-6 Konzentration auf einem ähnlichen Niveau wie in der Negativkontrolle, der Cal27 in DMEM-EM.

Sowohl im adipo- also auch osteo-Überstand stieg die IL-6 Konzentration durch die Kultivierung mit Cal27-Tumorzellen bis t_4 . Auch bei anderen Zytokinen waren Veränderungen nachweisbar. Dies gilt sowohl proben- als auch zeitübergreifend (t_0 vs. t_4)

Die Konzentration des Granulocyte-Macrophage Colony-stimulating Factor (GM-CSF) nahm in allen Proben über die Zeit von t_0 bis t_4 zu, außer in der Probe mit osteo-Überstand. Hier konnte an t_4 die geringste Konzentration von GM-CSF im Überstand gemessen werden.

Growth-related Oncogens (GROs) waren in allen Überständen feststellbar; die höchste Konzentration fand sich bei Cal27 mit nat-Überstand an t_4 . Die Konzentration von GRO- α war bei Proben mit nativen Zellen im Vergleich zu denen mit andifferenzierten MSC erhöht. IL-8 war in allen Proben vorhanden, ebenfalls mit leicht unterschiedlicher Intensität. Angiogenin war ausschließlich bei Cal27 mit osteo-Überstand t_4 deutlich als Dot sichtbar.

3.3.2 Auswertung der IL-6 Konzentration in den Überständen durch ELISA

Im ELISA wurden die IL-6 Konzentrationen der Überstände aus dem Proliferationsassay bestimmt. Beispielhaft wurden alle vorhandenen Proben der Zelllinie Cal27 ausgewertet. Die Angabe der Konzentration erfolgt jeweils im Median.

In Abbildung 21, A sind die IL-6 Konzentrationen der Überstände vor Beginn der Proliferationsassays (t_0) dargestellt. In den adipo-Überständen war kein IL-6 nachweisbar (0,0 pg/ml). Sowohl in den nat- als auch in osteo-Überständen zeigte sich eine Streubreite im ähnlichen Rahmen, wobei im Median die Konzentration in den nat-Überständen (7904,44 pg/ml) deutlich höher als in den osteo-Überständen (1108,1 pg/ml) lag.

Am Ende des Proliferationsassays (t_4) mit den konditionierten Überständen waren die höchsten IL-6 Werte im Überstand der Kultur von Cal27 mit nat-Überständen nachweisbar. Diese lagen im Median bei 13221,2 pg/ml. Die beiden Kulturen mit dem Überstand andifferenzierter MSC hatten im Median IL-6 Konzentrationen im ähnlichen Rahmen vorzuweisen (3044,3 pg/ml für die adipo-Überstände, 3622,2 pg/ml für die osteo-Überstände). Die Streubreite der

Ergebnisse der Kultur im osteo-Überstand war jedoch höher als die beim adipo-Überstand (vgl. Abbildung 21, B).

Wie in Abbildung 21, C ersichtlich, waren in den Überständen des Proliferationsassays mit Co-Kultur die höchsten IL-6 Werte in der Probe der osteo-Co-Kultur messbar (9252,2 pg/ml). In der nat-Co-Kultur lagen die IL-6 Konzentrationen im Median bei 1189,2 pg/ml, in der adipo-Co-Kultur bei 2358,1 pg/ml.

Abgesehen von einigen Ausreißern, waren die IL-6 Konzentrationen in den Überständen der Cal27, die bis t_4 in DMEM-EM kultiviert worden waren, sehr gering.

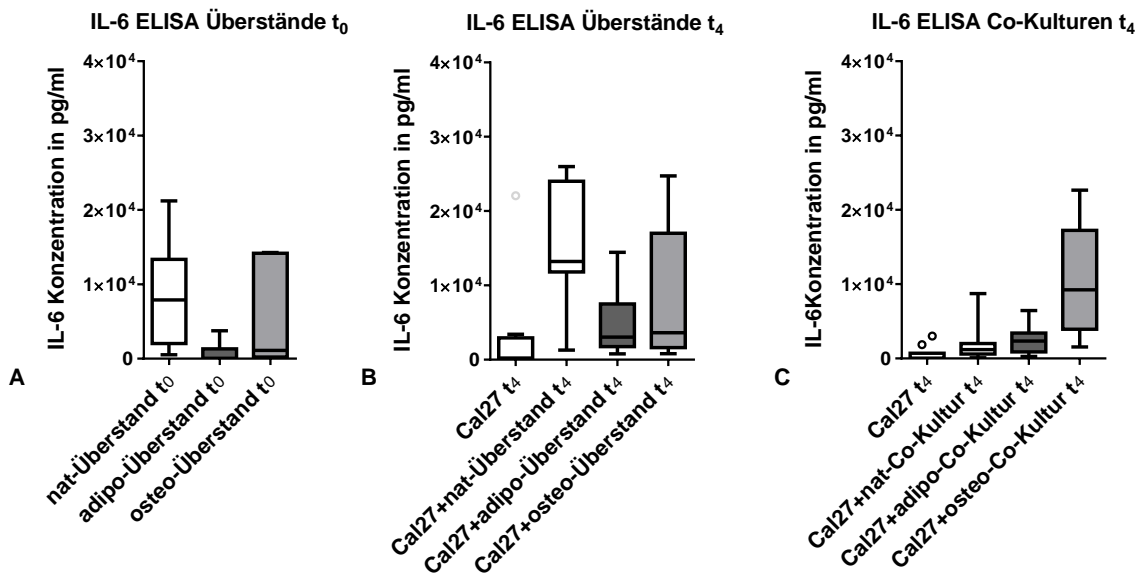


Abbildung 21. IL-6 Konzentrationen der Überstände aus den Proliferationsassays, bestimmt mit ELISA.

Ausreißer sind bezeichnet mit „o“. Darstellung als Box-Whisker-Plot nach Tukey.

3.4 Ergebnisse des Western Blots: Evaluierung proliferationsfördernder Signalwege

Mit Hilfe des Western Blots wurde untersucht, wie die ERK1/2-Kaskade und der STAT3 Signalweg der drei untersuchten Tumorzelllinien auf die Inkubation mit den verschiedenen konditionierten Überständen reagierten. Es wurde jeweils die phosphorylierte, also aktivierte Form der Signalproteine bestimmt. Für pERK1/2 entsprach die obere Bande bei 44 kDa der ERK1/p44 und die untere bei 42 kDa

der ERK2/p42. Auch bei dem pSTAT3-Antikörper repräsentierte die obere Bande bei 86 kDa die phosphorylierte Isoform α und die untere bei 79 kDa die phosphorylierte Isoform β (vgl. Abbildung 22).

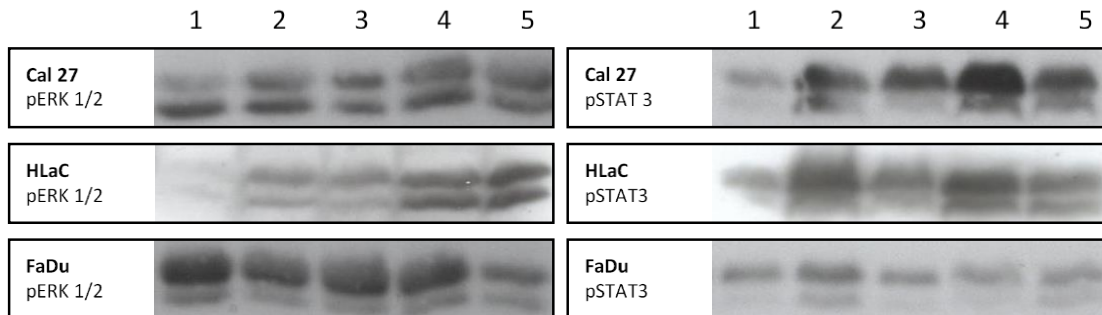


Abbildung 22. Western Blot pERK1/2 und pSTAT3

Reihenfolge jeweils Tumorzellen mit (1) DMEM-EM, (2) Überstand nativer MSC, (3) Überstand nativer MSC+Anti-IL-6, (4) Tumorzellen mit Überstand adipogen andifferenzierter MSC, (5) Tumorzellen mit Überstand osteogen andifferenzierter MSC.

Die Werte der densitometrischen Analyse der Banden wurden in Relation zur Negativkontrolle (Tumorzelle in DMEM-EM) gesetzt und in Prozent angegeben. Bei den Cal27-Tumorzellen (vgl. Abbildung 23) bewirkte die Zugabe von konditionierten Überständen eine verstärkte Phosphorylierung von pERK1, pSTAT3 α und - β im Vergleich zur Negativkontrolle. Bei pERK1 war der höchste Wert durch die Zugabe von osteo-Überstand (250 %), bei pSTAT3 α durch adipo-Überstand (560 %) und bei pSTAT3 β , welches insgesamt am stärksten reagierte, durch adipo-Überstand (710 %) erreicht worden. Die Steigerung konnte durch Zugabe von Anti-IL-6 bei allen, außer pSTAT3 α , verringert werden.

Einzig pERK2 zeigte unter Zugabe der konditionierten Überstände eine geringere Konzentration als die Negativkontrolle; die stärkste Hemmung war bei der Zugabe von nativem Überstand in Kombination mit Anti-IL-6 zu beobachten (60 %).

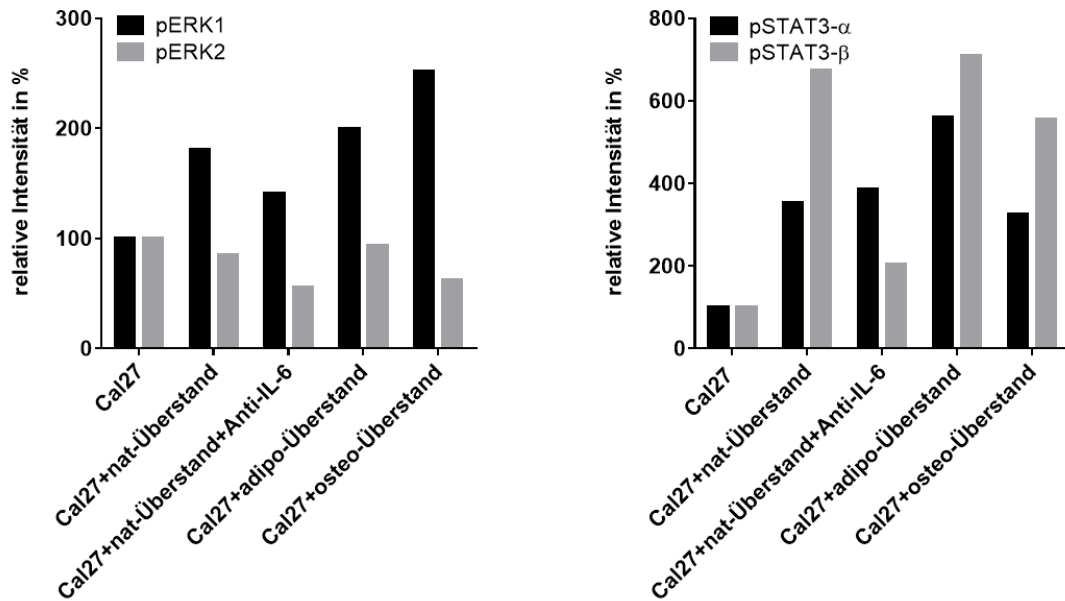


Abbildung 23. Densitometrische Auswertung des Western Blots der Cal27-Tumorzelllinie
Intensität jeweils relativ zur Intensität der Bande bei Cal27 nativ. pERK1 und pERK2 (A) sowie pSTAT3- α und pSTAT3- β (B).

Die HLaC78-Tumorzelllinien (vgl. Abbildung 24) reagierten mit einer Steigerung der Konzentration der untersuchten phosphorylierten Signalproteine. Bei pERK1 und pERK2 wurden die höchsten Werte jeweils durch Zugabe von osteo-Überstand hervorgerufen (390 % bzw. 450 %). Bei pSTAT3 α wurden die Maximalwerte durch nativen MSC-Überstand (380 %) und bei pSTAT3 β durch adipo-Überstand (980 %) erreicht. Als Einziges nicht durch Anti-IL-6-Zugabe gemindert wurde pSTAT3 β . Gegenteilig zeigten sich damit sogar höhere Werte als ohne (500 % ohne vs. 670 % mit Anti-IL-6).

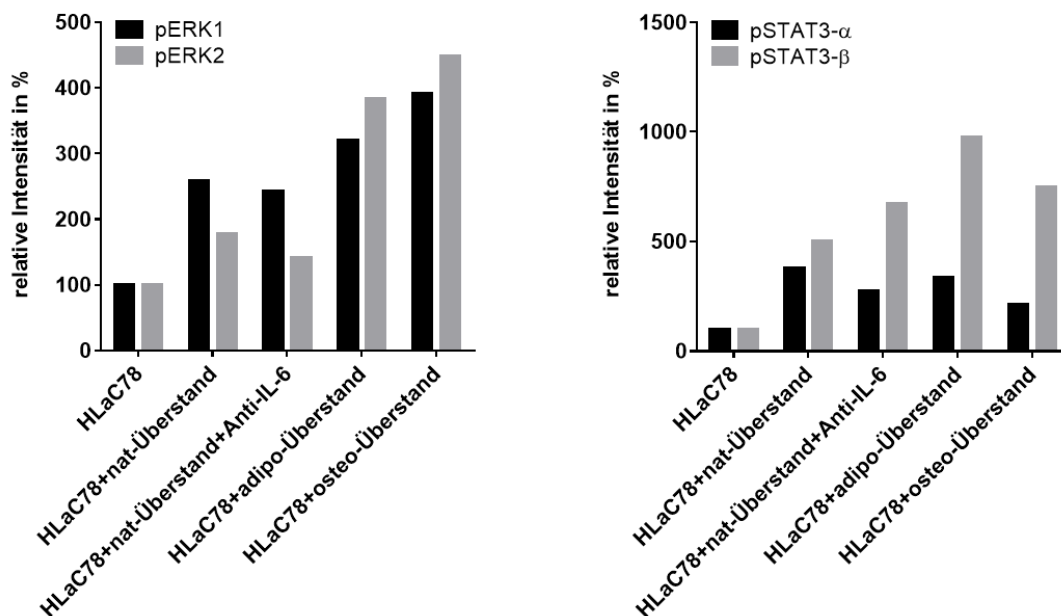


Abbildung 24. Densitometrische Auswertung des Western Blots der HLaC78-Tumorzelllinie
Intensität jeweils relativ zur Intensität der Bande bei HLaC78 nativ. pERK1 und pERK2 (A) sowie pSTAT3- α und pSTAT3- β (B).

Für die FaDu-Tumorzelllinie ergab sich ein gänzlich anderes Bild (vgl. Abbildung 25). Nur vereinzelt reagierten diese Zellen auf die konditionierten Überstände mit einer verstärkten Aktivierung der gemessenen Proteine. Für pERK1 lagen alle Werte unterhalb der Negativkontrolle, unter Anti-IL-6-Zugabe zeigte sich die geringste Hemmung (90 %) mit osteo-Überstand die stärkste (40 %). pERK2 hingegen hatte unter nativem MSC-Überstand in Kombination mit Anti-IL-6 die geringsten Werte (50 %). Eine Steigerung der pSTAT3 α -Werte ergab sich lediglich unter Zugabe von nativem Überstand (160 %). Unter allen weiteren konditionierten Überständen blieben die Werte unverändert. In allen konditionierten Proben hingegen war pSTAT3 β höher als in der Negativkontrolle. Die höchsten Werte waren ebenfalls unter der Zugabe des nativen Überstandes nachweisbar (410 %), welche in Kombination mit Anti-IL-6 wiederum abnahmen (160 %).

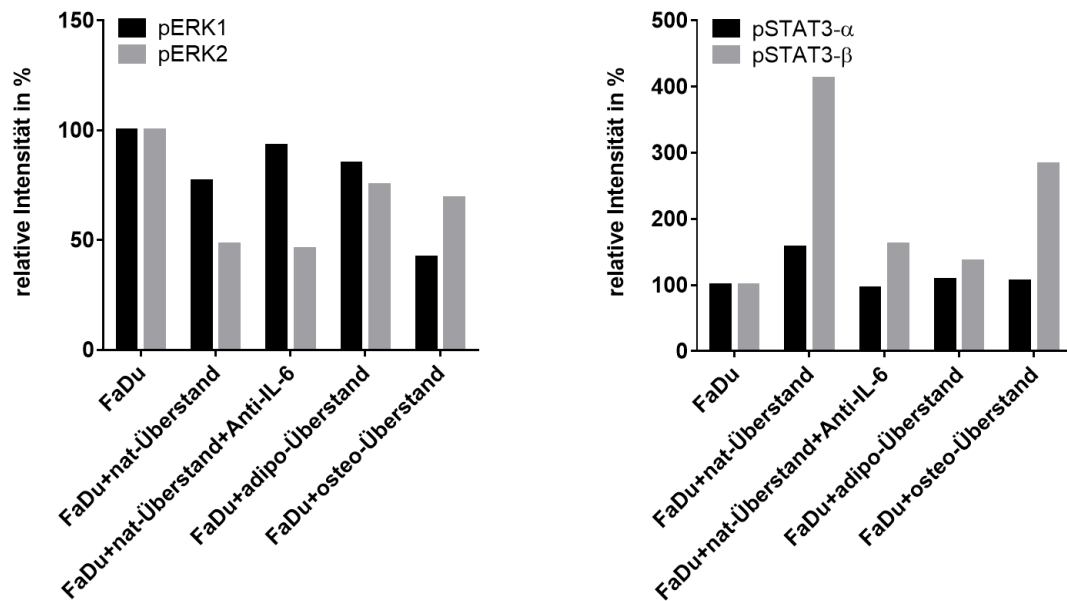


Abbildung 25. Densitometrische Auswertung des Western Blots der FaDu-Tumorzelllinie
Intensität jeweils relativ zur Intensität der Bande bei FaDu nativ. pERK1 und pERK2 (A) sowie pSTAT3- α und pSTAT3- β (B).

3.5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die aus der Spongiosa von Hüftköpfen isolierten MSC wurden auf das Vorhandensein der von der International Society for Cellular Therapy geforderten Minimalkriterien für diese Zellart überprüft. Plastikadhärenz war durch die Art der Zellkultur gegeben. Nach erfolgter Andifferenzierung der MSC ließen sich intrazelluläre Lipidvakuolen in der Oil Red O-Färbung bzw. die Kalziumablagerung in der Alizarin-Färbung und Von-Kossa-Färbung nachweisen. Durchflusszytometrisch zeigten die MSC die Expression der Oberflächenmarker CD44, CD73 und CD90. Zugleich waren sie negativ für die typischen Oberflächenmarker der hämatopoetischen Stammzellen CD31, CD34 und CD45. Somit erfüllten die isolierten MSC die geforderte Kombination von Oberflächenmarkern für mesenchymale Stammzellen.

Die spezifischen Markergene der adipogen andifferenzierten MSC waren in der Real-Time PCR bereits stark exprimiert, während bei den osteogen andifferenzierten MSC lediglich die alkalische Phosphatase diskret erhöht war.

Im Proliferationsassay zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen der Proliferation der nativen Tumorzellen und denen, die in Co-Kultur bzw. mit dem Überstand nativer MSC behandelt worden waren. Die Vitalität war bei Cal27-Tumorzellen mit nat-Überstand geringer als bei den unbehandelten Cal27.

Die Cal27- und HLaC78-Tumorzellen mit osteo-Überstand proliferierten signifikant geringer über die untersuchten fünf Tage als die Tumorzellen, die in adipo-Überstand bzw. unbehandelt kultiviert worden waren. Keine signifikanten Unterschiede ergaben sich in dieser Konstellation für die FaDu-Tumorzelllinie. Die Vitalitätswerte waren bei allen drei Tumorzellenlinien jeweils in Kultur mit osteogenem Überstand am niedrigsten.

In Co-Kultur mit andifferenzierten MSC zeigten Cal27 und HLaC78 ein signifikant stärkeres Wachstum als die unbehandelten Tumorzellen. Für das Wachstum der FaDu-Zelllinie sowie die Vitalität aller Proben ließen sich keine signifikanten Unterschiede nachweisen.

Der Dot Blot Assay zeigte, dass sich die Zytokin-Muster in den Überständen des Proliferationsassays auch zwischen den Proben deutlich unterschieden. Die Konzentration der meisten Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die Entzündung, Proliferation und Migration fördern, wie z. B. IL-6, Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor und Growth-related Oncogens, war erhöht in den Überständen, die aus der Tumorzellkultur mit den konditionierten Überständen gewonnen worden waren.

Auch im ELISA waren die gemessenen IL-6-Konzentrationen in den Kulturen mit MSC-Überständen erhöht. Am höchsten war sie in der Kultur mit nativem MSC-Überstand. Für die MSC-Co-Kultur war eine deutliche Zunahme nur bei den osteogen andifferenzierten MSC zu verzeichnen.

Der Western Blot zeigte eine Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2 (Ausnahme FaDu) und STAT3 durch Kultivierung der Tumorzellen mit MSC-Überstand. Durch die Zugabe von Anti-IL-6 wurde die Phosphorylierung von STAT3 und teilweise auch der ERK1/2 gehemmt. Zwischen den Tumorzelllinien waren auch hier Unterschiede im Ausmaß der Reaktion sichtbar.

4 Diskussion

Die Studienlage bezüglich der Wirkung von mesenchymalen Stammzellen auf Tumorzellen ist nach wie vor widersprüchlich. Ein besseres Verständnis der Interaktion der beiden Zellarten ist dringend notwendig, um die Möglichkeit des Einsatzes von MSC in der Therapie onkologischer Erkrankungen zu evaluieren. In dieser Arbeit wurde unter standardisierten Bedingungen die Wirkung von MSC auf Proliferation und Vitalität von drei verschiedenen *in vitro* etablierten Kopf-Hals-Tumorzelllinien untersucht. Zunächst wurden rein quantitative Proliferationsassays durchgeführt. Anschließend wurde mit Hilfe von Dot Blot Assay, ELISA und Western Blot nach Zytokinen und Signalwegen gesucht, über die eine mögliche Proliferationssteigerung vermittelt werden könnte. Darüber hinaus wurde die Möglichkeit einer Wirkinhibierung durch die Zugabe von Anti-IL-6 getestet.

4.1 Evaluierung der verwendeten Methoden

4.1.1 Andifferenzierung als Möglichkeit der Modifikation der MSC

Battula et al. fanden Hinweise, dass die malignen Zellen einer akuten myeloischen Leukämie (AML) im Gegensatz zu gesunden CD33- oder CD34-positiven Zellen in der Lage sind, die osteogene Differenzierung von MSC zu fördern und die adipogene Differenzierung zu hemmen. Der Verdacht liegt nahe, dass AML-Zellen sich unter anderem auf diese Weise ein Mikromilieu schaffen, welches ihr Wachstum fördert [Battula et al., 2017]. Daher war es von Interesse, zu überprüfen, wie eine beginnende osteogene bzw. adipogene Differenzierung die Wirkung der MSC auf Tumorzellen verändern kann.

Gleichzeitig stellte die Andifferenzierung eine Möglichkeit dar, eine gewisse Homogenisierung der MSC zu erreichen. Dazu wurde die bewährte Methode nach Pittenger et al. verwendet, bei der MSC in speziellen Medien kultiviert werden, welche die jeweilige Differenzierung induzieren [Pittenger et al., 1999]. Nachgewiesen wurde die beginnende Differenzierung durch Real-Time PCR, die erfolgte Differenzierung durch Färbungen.

Weiterhin sollten die MSC unter dem Gesichtspunkt einer potenziellen therapeutischen Verwendung untersucht werden. Für einen Einsatz als Carrier in

der Tumorthherapie müssen folgende Eigenschaften zwingend erfüllt sein: Tumortropismus in Verbindung mit einer proliferationshemmenden oder zumindest neutralen Wirkung der MSC auf den Tumor.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde bereits festgestellt, dass bei adipogen differenzierten MSC der Tumortropismus im Vergleich zu nativen ähnlich ausgeprägt ist. Osteogene Differenzierung ging mit einem abgeschwächten Tumortropismus einher. Bei beiden Differenzierungen zeigte sich eine Hemmung der sonst pro-angiogenetischen Wirkung der nativen MSC [Scherzed et al., 2016].

Es sollte ein geeigneter Zeitpunkt innerhalb der Differenzierung gefunden werden, welcher die beiden Anforderungen möglichst gut vereinen könnte. Als geeignete Methode, um das Fortschreiten der Differenzierung zu beurteilen, gilt die Analyse der Expression spezifisch adipogener bzw. osteogener Gene mit Hilfe der Real-Time PCR. Während es für MSC in adipogener Differenzierung zum Zeitpunkt der Recherche keine passenden Studien gab, fanden sich für die osteogene Differenzierung widersprüchliche Aussagen. Berichtet wurde von einer verstärkten [Byers et al., 1999] wie auch von einer verminderten Expression der spezifischen Gene [Cheng et al., 1996] bis hin zu keinen signifikanten Unterschieden [Frank et al., 2002] über die 21 Tage der Differenzierung hinweg. Zusätzlich wurden in Studien sowohl interindividuelle Variabilität als auch der Einfluss von Zellkulturbedingungen auf die Expression der differenzierungsspezifischen Gene beschrieben [Frank et al., 2002; Phinney et al., 1999].

In einer Arbeit von Molloy et al., welche die Wirkung von MSC in osteogener Differenzierung auf Brustkrebszellen untersuchte, wurde die Zytokin-Sekretion über die 21 Tage der Differenzierung quantifiziert. Dabei konnte zwischen Tag 3 und Tag 14 ein deutlicher Anstieg von pro-tumorigenen Faktoren nachgewiesen werden [Molloy et al., 2009].

Daher erschien der 7. Tag der Differenzierung als ein guter Ausgangspunkt, um den Einfluss dieser Zellen auf Tumorzellen im Hinblick auf einen möglichen Einsatz als Vehikel im Rahmen der sogenannten Targeted Therapy zu testen.

Zum Zweck der besseren Vergleichbarkeit wurde für die adipogen andifferenzierten MSC ebenfalls Tag 7 für alle weiteren Versuche gewählt.

Für eine weitere Optimierung der proliferationshemmenden Wirkung sollten noch weitere Zeitpunkte in der Andifferenzierung sowie die Kombination mit Anti-IL-6-Gabe im Proliferationsassay getestet werden.

4.1.2 Vor- und Nachteile der Zellkultur

Um Wirkweisen von Zellen aufeinander zu untersuchen, sind Versuche mit Zelllinien hilfreich. 1952 gelang Gey et al. die erste Kultur einer humanen Zelllinie: Cervixkarzinomzellen, später bekannt als HeLa [Alberts B et al., 2002]. Seither ist die Zellkultur aus der Forschung nicht mehr wegzudenken. Sie ermöglicht es, zell- und biotechnologische Zusammenhänge gezielt zu untersuchen. Jedoch steht eine Zellenpopulation im Organismus nie für sich allein. Sie ist stets eingebettet in ein komplexes System aus zahlreichen weiteren Zellarten und Extrazellulärmatrix, welches eine einzelne Zellkultur nicht abzubilden vermag [Schmitz, 2011].

Zudem gibt es bei jeder manuell durchgeführten Zellkultur gewisse unbeeinflussbare Störgrößen, wie z. B. der Transport vom Inkubator zur Zellbank und zurück, Manipulation beim Medienwechsel, Verzögerungen durch die Behandlung mehrerer Kulturflaschen, Außentemperatur, Luftfeuchtigkeit etc. Ebenso ist die Verwendung verschiedener Chargen von FCS für das Expansionsmedium bei längeren Versuchsreihen unvermeidlich. Dies geht jedoch mit einer veränderlichen Konzentration der Inhaltsstoffe wie Zytokine und Wachstumsfaktoren im FCS einher [Pacini, 2014; Wagner et al., 2007].

Die Techniken der Zellkultur werden stetig verbessert, sodass mit Hilfe von 3D-Kulturen und Laborautomation die *in vivo* Situation in Zukunft immer genauer nachgebildet werden kann [Schmitz, 2011]. Bis diese Verfahren jedoch allgemein verfügbar sind, bleibt die konventionelle Zellkultur weiterhin eine unverzichtbare Methode, um zellbiologische Zusammenhänge zu untersuchen.

4.1.3 Proliferationsassays zur Quantifizierung des Einflusses der mesenchymalen Stammzellen auf die Proliferation der Tumorzellen

Für die Proliferationsassays wurde versucht, die genannten Störfaktoren soweit möglich zu minimieren, um Tendenzen der Wirkung von MSC auf die verschiedenen Tumorzelllinien zu erkennen. Dazu wurde auf jeder Platte eine

Kontrollprobe mitkultiviert. Diese entsprach der jeweiligen Tumorzelllinie in Kultur mit DMEM-EM ohne weitere Zusätze. Jedoch zeigte sich auch für die Negativkontrolle in einigen Assays eine große Streubreite, die den Einfluss der Störfaktoren verdeutlicht. Da in der ersten Versuchsreihe mit nat-Überstand und nat-Co-Kultur keine signifikanten Unterschiede in der Proliferation zu den unbehandelten Tumorzellen nachweisbar waren, wurde in den folgenden Versuchsreihen die Wirkung von Überständen und Co-Kulturen andifferenzierter MSC verglichen.

Für jede Kombination aus Tumorzelllinie und nativen bzw. andifferenzierten MSC wurden jeweils zwei Systeme getestet. Zum einen wurden die Tumorzellen mit dem Überstand der MSC, zum anderen in Co-Kultur mit Hilfe von Transwells mit einer semipermeablen Polyester-Membran mit Poren (Porendurchmesser: 0,4 µm, Porendichte $4 \times 10^6/\text{cm}^2$) kultiviert. Diese Dichte erlaubt nach Herstellerangaben keine Transmigration von Zellen. So konnte die durch lösliche Faktoren vermittelte Wirkung der MSC auf die Tumorzellen quantifiziert werden. In den mit konditioniertem Überstand behandelten Tumorzelllinien zeigte sich die einseitige Wirkung der Zytokine und Wachstumsfaktoren, die die MSC unabhängig von den Tumorzellen bereits in den Überstand sezerniert hatten. In Co-Kultur hingegen war die Interaktion, d. h. die parakrine Wirkung der Tumorzellen auf die MSC und umgekehrt, eingeschlossen. Es bleibt zu bedenken, dass Überstände einer Momentaufnahme der MSC-Sekretion entsprechen, da Zytokine nicht kontinuierlich ausgeschüttet werden.

Diese beiden Modelle erlauben, wie jedes *in vitro* Modell, lediglich eine begrenzte Aussage, da die Zytokine und Wachstumsfaktoren nur eine Komponente der Kommunikation darstellen. Zum Beispiel darf die durch Zellkontakte vermittelte Interaktion nicht vernachlässigt werden, insbesondere da auf diese Weise bereits tumorinhibierende Wirkung nachgewiesen wurde [Khakoo et al., 2006]. Allerdings erweist sich hierbei die Auswertung der Proliferation als erheblich erschwert. Zur Ermittlung des Tumorzellwachstums nach gemeinsamer Kultivierung mit MSC müsste das Zellgemisch beispielsweise durchflusszytometrisch getrennt werden. Um ein besseres Verständnis für die Interaktion von MSC mit Kopf- und Halstumorzellen zu entwickeln, ist es sinnvoll, verschiedene Systeme zu testen

und sich der Zell-Interaktion auf verschiedenen Ebenen zu nähern. Trotz der genannten Nachteile erfüllten die Proliferationsassays ihren Zweck: Tendenzen und vor allem Ansatzpunkte für weitere Experimente aufzuzeigen.

4.1.4 Analyse der Zytokine und Signalwege

Der Dot Blot Assay wurde mit Überständen aus den Proliferationsassays durchgeführt, um einen exemplarischen Überblick über die vorhandenen Zytokine zu erhalten. Hier war ein Abwägen erforderlich: Da eine viertägige Kultur ohne FCS sowohl das Zellwachstum als auch die Zytokin-Sekretion in unbekanntem Maße verändert hätte, wurde entschieden, die Überstände eines unter standardisierten Bedingungen mit FCS-haltigem Expansionsmedium durchgeführten Proliferationsassays zu verwenden. Aus diesem Grund muss bei der Interpretation der Ergebnisse bedacht werden, dass lediglich ein Vergleich der Werte untereinander zulässig ist, da die Proben durch den FCS-Zusatz eine unbestimmte Menge verschiedener Zytokine enthielten. Retrospektiv musste zudem festgestellt werden, dass die Konzentration einiger Zytokine in den Proben zu hoch war, um eine genaue Aussage treffen zu können. Eine Wiederholung des Tests hätte jedoch weitere Proben verbraucht, welche dann für die Durchführung des ELISAs nicht mehr zur Verfügung gestanden hätten. Dennoch genügte der durchgeführte Dot Blot Assay den aufgeführten Ansprüchen: Er ermöglichte eine Übersicht über die Verteilung der wichtigsten Zytokine in den untersuchten Konstellationen der MSC-Tumorzell-Interaktion.

Im Dot Blot Assay zeigten sich große Unterschiede für die IL-6 Konzentration. Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war bereits bekannt, dass IL-6 eine Schlüsselrolle bei der Wirkung von MSC auf Kopf-Hals-Tumorzellen einnimmt [Scherzad et al., 2015], weshalb im weiteren Verlauf ein Schwerpunkt auf die Untersuchung dieses Zytokin gelegt wurde.

Um genauere Informationen über den IL-6-Gehalt in den Überständen der Proliferationsassays zu erhalten, wurde eine densitometrische Analyse mittels ELISA durchgeführt. Da auch diese Überstände FCS enthalten, müssen auch hier die Ergebnisse, wie bereits im Dot Blot, im Vergleich zur jeweiligen Negativkontrolle interpretiert werden. Die IL-6 Konzentration in den Überständen wies eine große Streubreite auf. Um Korrelationen des IL-6-Gehalts mit Alter und

Geschlecht des MSC-Spenders festzustellen, war die Stichprobe ($n = 10$) zu gering. Jedoch wurde in anderen Studien bereits gezeigt, dass von einem Zusammenhang zwischen diesen genannten endogenen Faktoren der MSC und ihrer Funktionalität und damit auch Zytokin-Expression auszugehen ist. So konnte bspw. in einer Studie mit 53 verschiedenen MSC-Linien in Co-Kultur mit aktivierten T-Zellen eine positive Korrelation zwischen steigendem Alter der MSC-Spender und einer zunehmenden IL-6 Produktion der jeweiligen MSC gezeigt werden [Siegel et al., 2013]. Auch exogene Einflussfaktoren, wie Isolierung, Passagierung etc., wirken sich auf die MSC-Kultur aus [Pacini, 2014]. Trotz der möglichst standardisierten Durchführung aller Versuche und des ähnlichen Alters der Stammzell-Spender (49,1–77,3 Jahre zum Zeitpunkt der Entnahme), war die Spannweite der Ergebnisse groß. Ein Zusammenhang zwischen dem Proliferationsverhalten der Tumorzellen und IL-6 in der jeweiligen Probe war nicht ersichtlich. Hier wurde wiederum deutlich, wie komplex das Zusammenwirken von MSC und Tumorzellen ist und dass ein einzelnes Zytokin wie IL-6 noch keine Rückschlüsse zulässt.

Um die Interaktion zwischen MSC auf einer weiteren Ebene zu untersuchen, wurden Western Blots der phosphorylierten Signalwege STAT3 und ERK1/2 angefertigt. Diesen beiden Signalwegen wird eine zentrale Rolle in der Tumorigenese zugeschrieben [Bollrath et al., 2009; Bromberg et al., 1999; Dhillon et al., 2007],

Obwohl mit Hilfe des Western Blots nur semiquantitative Aussagen möglich sind, ist er eine sehr sensitive Methode für den Nachweis von phosphorylierten Proteinen in Zelllysaten. Diese Signalwege werden von zahlreichen Zytokinen aktiviert und stellen eine direkte Verbindung zur Genexpression her.

Der Western Blot konnte nicht mit Proben aus Co-Kultur durchgeführt werden, da dafür wesentlich größere Zellmengen nötig sind, als im Transwell-System kultiviert werden können. Nach einigen Vorversuchen wurden 60 min als Inkubationszeit gewählt. Durch die Kürze der Zeit sollten die Unterschiede zwischen Co-Kultur und Überstand kompensiert werden. Hierbei ging es vor allem darum, zu zeigen, ob und in welchem Ausmaß sich die beiden Signalwege STAT3 und ERK1/2, durch die Zugabe von konditioniertem Überstand aktivieren

lassen. Zudem ermöglichte es der Western Blot zu testen, ob diese Aktivierung durch Anti-IL-6-Zugabe inhibiert werden kann.

4.2 Hinweise für proliferationshemmende Effekte

In Teilen des Proliferationsassays zeigten die MSC eine hemmende Wirkung auf die Tumorzellen. So war für die Kultivierung von Cal27 mit nativem MSC-Überstand am vierten Tag zwar keine signifikant niedrigere Proliferation nachzuweisen, jedoch eine geringere Vitalität der Tumorzellen. Signifikant geringere Zellzahlen wurden im Proliferationsassay von Cal27 und HLaC78 mit osteo-Überstand erreicht. Dieser Unterschied war signifikant sowohl gegenüber der Negativkontrolle mit Expansionsmedium als auch zur Kultur mit adipo-Überstand. Auch die Vitalität war bei allen drei Tumorzelllinien durch die Kultivierung mit osteo-Überstand signifikant erniedrigt. Die Ergebnisse der Zytokin-Analyse wie auch des Western Blots zeigten jedoch auch für jene Proben hohe IL-6 Werte sowie eine Aktivierung von ERK1/2 und STAT3. Die wachstumshemmende Wirkung des Überstands osteogen andifferenzierter MSC lässt sich daher nicht mit einer verringerten Stimulation dieser Signalwege erklären. Im Rahmen der großen Streubreite der Ergebnisse zeigten einzelne Proben auch in anderen Konstellationen eine geringe Proliferation durch Zugabe konditionierter Überstände bzw. in Co-Kultur. Da die Proben mit nat-Überstand keine signifikante Proliferationshemmung zeigten, kann als mögliche Ursache eine potenziell erniedrigte Konzentration der Nährstoffe im Medium der konditionierten Überstände ausgeschlossen werden.

Kanazawa et al. konnten zeigen, dass IL-6 auf die Proliferation verschiedener HNSCC-Zelllinien teils gegensätzlichen Einfluss ausübte. Es steigerte bei allen drei getesteten Zelllinien das Invasionspotential, doch die Proliferation von zwei der Zelllinien (HSC-2 und SAS) wurde durch IL-6 Zugabe gehemmt. Durch Zugabe von Anti-IL-6 war dieser Effekt rückgängig zu machen. Es gibt Hinweise, dass dies durch Downregulation der sIL-6-Rezeptor-Expression bei hoher IL-6/IL-6-Rezeptorbindung vermittelt wird. Die gesteigerte Invasionstendenz wird als wichtiger Schritt für die Metastasierung des Tumors gewertet und vermutlich u. a. durch ERK1/2-Aktivierung verstärkt [Kanazawa et al., 2007]. Daher können

Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit wie auch der von Kanazawa et al. mit der negativen Korrelation zwischen IL-6 Konzentration im Patientenserum und dem Überleben der Patienten in Einklang gebracht werden [Duffy et al., 2008].

Eine tumorhemmende Wirkung von MSC wurde in der Literatur bereits mehrfach beschrieben und mögliche weitere Mechanismen postuliert.

So fanden z. B. Lu et al. heraus, dass durch Co-Kultur mit murinen MSC in den getesteten Tumorzellen die mRNA-Expression von p21, einem negativen Regulator des Zellzyklus, sowie von Caspase 3, einer Apoptose-assoziierten Protease, erhöht wurde. Dies hatte sowohl einen vermehrten Arrest in der Zellzyklusphase G0/G1 zur Folge als auch eine gesteigerte Apoptoserate [Lu et al., 2008].

Auch für humane MSC, die aus Tonsillen gewonnen worden waren, konnten in Co-Kultur der gleiche Effekt und aktivierte Mechanismen auf HNSCC-Zelllinien (PNUH-12 und SNU-899) nachgewiesen werden [Lim et al., 2012].

Weitere potenzielle Mechanismen, die ein durch MSC vermindertes Tumorwachstum erklären könnten, wurden beschrieben: So konnte unter anderem die Sekretion des Dickkopf-related Protein-1 durch MSC zur Hemmung des Wnt-Signalwegs in den Tumorzellen führen. Neben seiner Rolle in der Embryogenese wurde dem Wnt-Signalweg in der Entstehung und dem Progress von Tumoren eine wichtige Bedeutung zugeschrieben [Qiao et al., 2008a; Qiao et al., 2008b; Zhu et al., 2009]. Otsu et al. postulierten, dass MSC in hohen Konzentrationen auch eine mögliche anti-angiogenetische Wirkung in der Umgebung des Tumors entfalten können [Otsu et al., 2009]. Potenziell immunmodulatorische Eigenschaften der MSC [Ohlsson et al., 2003] müssen ebenfalls mitbedacht und weiter untersucht werden.

Welchen Einfluss der Versuchsaufbau auf die Ergebnisse haben kann, zeigte die Studie von Khakoo et al. Durch direkten Zell-Zell-Kontakt zwischen Kaposi-Sarkom-Zellen und MSC konnte eine Inhibierung der Proteinkinase B, auch bekannt als Akt-Proteinkinase, erreicht werden. Der Kinase, die ein Enzym des PI3K/Akt-Signalweges ist, wird eine wichtige Rolle bei der Progression des Kaposi-Sarkoms zugeschrieben. Die Inhibierung dieser Proteinkinase korrelierte

mit der Tumorsuppression bei den anschließend durchgeführten *in vivo* Versuchen bei Mäusen mit Kaposi-Sarkom [Khakoo et al., 2006].

In der vorliegenden Arbeit unterschieden sich die Ergebnisse des Proliferationsassays mit osteo-Überstand diametral von denen mit osteo-Co-Kultur im Transwell-System. Während durch die Zugabe von osteo-Überstand zumindest für eine Tumorzelllinie eine Proliferationsinhibierung gezeigt werden konnte, wurde durch Co-Kultur mit osteogen andifferenzierten MSC eine Proliferationssteigerung erkennbar. Auf welche Weise die jeweiligen Effekte vermittelt werden ist nach wie vor unklar. Bisher sind nur einige Teilaspekte bekannt, unter anderem die oben genannten. Wie diese untereinander in Zusammenhang stehen, ist weitestgehend unbekannt.

4.3 Hinweise für proliferationssteigernde Effekte

Anders als die Zytokin-Analyse vermuten ließ, zeigte im durchgeführten Proliferationsassay lediglich die Co-Kultur mit andifferenzierten MSC eine signifikant proliferationssteigernde Wirkung auf die Tumorzelllinien Cal27 und HLaC78. Der Unterschied zwischen der adipo- und osteo-Co-Kultur war nicht signifikant. Auch zwischen der Vitalität der Zellen bestand keine signifikante Differenz. Die Beobachtung der Proliferationssteigerung stand im Gegensatz zu den Ergebnissen aus dem Proliferationsassay mit konditionierten Überständen. Der adipo-Überstand zeigte keine signifikante Wirkung, während der osteo-Überstand bei den Tumorzelllinien Cal27 und HLaC78 zu einer Hemmung der Proliferation führte.

Dies ist gut mit der von Liu et al. für das Mammakarzinom beschriebenen positiven Feedbackschleife vereinbar. Sie konnten zeigen, dass das von Tumorzellen sezernierte IL-6 die Produktion des Chemokins C-X-C Motif Ligand (CXCL)7 in MSC induziert. CXCL7 wiederum regt die Tumorzellen zur Sekretion von zahlreichen Zytokinen an, u. a. IL-6 und IL-8 [Liu et al., 2011]. Im Überstand kann diese Interaktion nur limitiert bzw. innerhalb der Tumorzellpopulation stattfinden, während sich diese Wirkung in Co-Kultur durch die positive Rückkopplung potenzieren kann.

IL-6 ist ein Zytokin, das von den verschiedensten Zellen sezerniert wird und unter anderem im Bereich der Immunregulation und Hämatopoese wirkt. Auch HNSCC-Zellen sezernieren IL-6 und unterliegen durch Ausbildung von IL-6-Rezeptoren entsprechenden auto- wie auch parakrinen Regulationen, die wiederum Proliferations- und Invasionsverhalten der Zellen beeinflussen können

[Kanazawa et al., 2007; Kishimoto, 1989].

Klinisch wurde die Bedeutung von IL-6 in diesem Kontext bereits nachgewiesen. In einer prospektiven Kohortenstudie mit 444 Patienten mit HNSCC konnte gezeigt werden, dass die Serum-IL-6-Konzentration vor Behandlungsbeginn mit Rezidiven und Überleben korreliert und daher als Prädiktor dienen kann [Duffy et al., 2008]. Vor diesem Hintergrund wurde IL-6 primär als potenziell tumorfördernd wirkende Substanz betrachtet.

Das im Dot Blot Assay sichtbare Sekretionsmuster protumorigen wirkender Substanzen gab Anhalt, von einer insgesamt überwiegend tumorfördernden Wirkung der MSC in sämtlichen Konstellationen auszugehen. Hier zeigten sich in allen Kombinationen mit nativem sowie konditioniertem MSC-Überstand höhere IL-6 Werte als bei in DMEM-EM kultivierten Tumorzellen. Die einzige Ausnahme stellte die Kultur mit adipo-Überstand dar, hier blieb die IL-6 Konzentration auf gleichem Niveau. Auch im ELISA lag abgesehen von einigen Ausreißern bei Cal27 in Expansionsmedium die geringsten IL-6 Konzentration vor.

Zur Transduktion der Signale von IL-6 bis zur Genexpression wird häufig STAT3 als Transkriptionsfaktor benötigt. Für Zellen des Multiplen Myeloms wurde bereits früh gezeigt, wie essentiell die IL-6-abhängige Aktivierung von STAT3 für Überleben und Wachstum ist [Brocke-Heidrich et al., 2004; Ji et al., 2014]. Im Verlauf konnte dies auch für weitere Tumorentitäten, darunter auch HNSCC, nachgewiesen werden [Ji et al., 2014].

Signale, die Proliferation, Apoptose und Migration betreffen, werden auch über ERK1/2 vermittelt. Dysregulationen hierbei tragen häufig zu Entstehung und Progress einer malignen Erkrankung bei, wie beispielsweise HNSCC [Chang et al., 2014; Dhillon et al., 2007; Kanazawa et al., 2007].

Im Western Blot konnten die phosphorylierten und damit aktivierten Proteine von ERK1/2 und STAT3 besonders in den Proben der Tumorzelllinien Cal27 und HLaC78 mit den verschiedenen konditionierten Überständen in höherer Konzentration als in der Negativkontrolle nachgewiesen werden. Die einzige Ausnahme war pERK2, welches bei Cal27 mit konditionierten Überständen geringer war als in der Probe mit nativen Cal27. Bei der FaDu-Tumorzelllinie zeigte sich lediglich für pSTAT3 eine Steigerung der Konzentration durch Zugabe konditionierter Überstände. Diese waren jedoch im Vergleich zu den anderen beiden Tumorzelllinien deutlich geringer ausgeprägt.

Dies deckt sich mit unveröffentlichten Ergebnissen der Arbeitsgruppe. Mit Hilfe der Real-Time PCR konnte gezeigt werden, dass der Epidermal Growth Factor-Rezeptor (EGFR) sowohl bei Cal27 als auch bei HLaC78 mehr als doppelt so stark exprimiert wird wie bei FaDu. EGFR ist neben IL-6-Rezeptoren ein weiterer wichtiger Signaltransduktor zur Aktivierung von STAT3. Die Bedeutung des EGFR Rezeptors unter anderem auch in der Tumorigenese von HNSCC ist Thema der Forschung [Geiger et al., 2016]. Für die Therapie fortgeschrittener HNSCC wurde bereits der monoklonale Antikörper Cetuximab, ein EGFR-Inhibitor, zugelassen [Blasco et al., 2017].

Durch Zugabe von Anti-IL-6 konnte bei der Mehrzahl der Proben die Expression der phosphorylierten Signalproteine verringert werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die vermutete Aktivierung über IL-6 eine Rolle spielt, die sich jedoch je nach Zelllinie unterscheiden kann.

4.4 Mesenchymale Stammzellen in der Tumorthherapie - Möglichkeiten und Herausforderungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstreichen die Aussagen in der aktuellen Literatur. Es zeigte sich keine eindeutige Tendenz, dass MSC entweder tumorfördernd oder tumorhemmend wirken. Trotz Standardisierung der Isolation und Kultivierung variieren die Eigenschaften der isolierten MSC [Bergfeld et al., 2010; Droujinine et al., 2013; Klopp et al., 2011; Ridge et al., 2017]. Hierzu gibt es zahlreiche Hypothesen. So scheinen MSC bereits durch Charakteristika des Spenders, wie z. B. dessen

Alter, Geschlecht, Grunderkrankungen und Pharmakotherapie beeinflusst zu werden [Chen et al., 2012; Deasy et al., 2007; Lin et al., 2014; Siegel et al., 2013].

Nach aktuellem Stand sind MSC hauptsächlich perivaskulär in sämtlichen Organen und Gewebearten zu finden. Auch hier gibt es Hinweise auf Unterschiede, je nachdem aus welchem Gewebe die MSC isoliert wurden [da Silva Meirelles et al., 2006].

Doch selbst wenn MSC über einen zeitlichen Verlauf von sechs Monaten aus Knochenmark vom hinteren Beckenkamm derselben Spender aspiriert, isoliert und kultiviert wurden, fanden Phinney et al., dass sich die Kulturen bezüglich Wachstum und Differenzierungsfähigkeit unterschieden [Phinney et al., 1999]. Und sogar Nachkommen einer einzigen mesenchymalen Stammzelle zeigten ein voneinander abweichendes Differenzierungsverhalten [Digirolamo et al., 1999].

Es gibt Hinweise, dass durch Isolation und Kultur epigenetische Veränderungen am Genom einzelner MSC hervorgerufen werden und so die Expression von Genen, die unter anderem Schritte der Differenzierung regulieren, modifiziert werden [Shoshani et al., 2014]. Da MSC in Gewebe in geringer Konzentration vorliegen, müssen sie zum Einsatz in Forschung und perspektivisch Therapie nach der Isolation in Kultur vermehrt werden.

MSC weisen in ihrer physiologischen Funktion eine hohe Plastizität auf. Sie benötigen diese, um ihre Rolle in der Embryogenese im Aufbau verschiedener Organe sowie in Heilungs- und Erneuerungsprozessen verschiedener Gewebe im adulten Körper erfüllen zu können. Diese Fähigkeit scheinen sie *in vitro* zu behalten [Zipori, 2006], sodass bereits kleinste Veränderungen bei Temperatur, CO₂-Konzentration, Nährstoffkonzentration im Expansionsmedium usw. bestimmte Subpopulationen verstärkt zum Wachstum angeregt werden, während andere weniger stark proliferieren oder sogar apoptotisch werden [Pacini, 2014; Pevsner-Fischer et al., 2011].

Für den Einsatz als Therapeutikum sind diese bisher unvorhersehbaren Eigenschaften der MSC nicht hinnehmbar. Außerdem war der Beobachtungszeitraum in den meisten bisher durchgeführten Untersuchungen kurz, im Bereich einiger Tage bis Wochen, sodass in Zukunft vermehrt die

Langzeitwirkung eines möglichen Einsatzes von MSC als Therapeutikum untersucht werden muss.

Die Klärung der offenen Fragen sollte auf mehreren Ebenen erfolgen. Klopp et al. schlugen vor, MSC von Patienten mit besonders hohem Tumorrisiko, wie z. B. von starken Rauchern, zu untersuchen. So könnte festgestellt werden, ob sich diese MSC von denen einer Vergleichspopulation ohne diese Risikofaktoren unterscheiden [Klopp et al., 2011]. Es gilt herauszufinden, wie die großen interindividuellen Unterschiede in der Wirkung der MSC erklärt werden können und anhand welcher Faktoren sich diese vorhersagen lassen. Neben der Frage der großen interpersonellen Variabilität muss weiter nach geeigneten und identifizierbaren, homogenen Subpopulationen mit den gewünschten Eigenschaften für die Tumorthherapie innerhalb der heterogenen Gruppe der MSC gesucht werden. Der Nachweis der geforderten Minimalkriterien [Dominici et al., 2006; Horwitz et al., 2005] ist hierfür, wie auch in der Divergenz der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ersichtlich ist, nicht ausreichend.

Daher müssen neue Methoden, wie beispielsweise der Einsatz eines sogenannten Cell-Sorters, evaluiert werden. Dieser ist in der Lage MSC anhand von bestimmten Oberflächenmarkern auszuwählen, sodass die weiteren Experimente mit einem homogeneren Zellgemisch durchgeführt werden könnten [Gang et al., 2007; Psaltis et al., 2010]. So könnten gezielt Subpopulationen kultiviert werden, in denen sich therapeutisch sinnvolle Eigenschaften verstärkt wiederfinden. Dafür ist die Suche von passenden Oberflächenmarkern essenziell. Es gibt Hinweise, dass MSC, die nach Expressierung des Stro-1-Antigens ausgewählt wurden, die Lymphozyten-Proliferation stärker hemmen als die Kontroll-MSC. Dies könnte bei einem möglichen Einsatz der MSC im Rahmen von Transplantationen zur Senkung der Graft-versus-Host-Reaktion von Vorteil sein [Nasef et al., 2009].

Es ist nötig, die Methoden der Zellkultur weiter zu optimieren, um die *in vivo* Situation möglichst naturgetreu abbilden zu können. Störfaktoren müssen weiter minimiert werden, um verlässlichere Ergebnisse zu erzielen. Bereits 1972 entwickelten Knazek et al. die Idee, Zellen entlang von künstlichen Kapillaren, in denen Expansionsmedium zirkulierte, wachsen zu lassen. So könnte eine

gewebeähnliche Struktur entstehen und zugleich die sezernierten Stoffe in Echtzeit und ohne Eingriff in die Zellkultur untersucht werden [Knazek et al., 1972]. Pacini schlug zur Kultivierung von MSC in Bioreaktoren vor, welche in einem geschlossenen System und unter standardisierten Bedingungen die Zellen automatisiert versorgen [Pacini, 2014]. Auch zur Expansion von MSC für den klinischen Einsatz ist diese Art von System relevant, insbesondere wegen des wesentlich geringeren Risikos der Kontamination [Nold et al., 2013]. In der Arbeit von Nold et al. wurde berücksichtigt, dass es für die therapeutische Anwendung von MSC essentiell ist, Alternativen zum FCS in der Zellkultur zu finden, da dessen Verwendung mit zahlreichen Risiken behaftet ist. Patienten könnten sich über das tierische Blutprodukt infizieren, ggf. auch mit Prionen. Zudem kann durch im Serum gelöste Endotoxine eine toxische Reaktion beim MSC-Empfänger ausgelöst werden. Es besteht außerdem ein immunologisches Risiko durch Kontamination mit tierischen Proteinen, Peptiden oder Biomolekülen [Bieback et al., 2009; Herberts et al., 2011; Nold et al., 2013].

Doch selbst in einem geschlossenen 3D-Modell aus Schleimhaut, Matrix- und Tumorzellen, in das MSC integriert würden, könnte nur ein Teilaspekt der Interaktionen abgebildet und untersucht werden. So ist es zum Beispiel noch nicht möglich, die Komplexität des Immunsystems mit darzustellen. Der Einfluss des Immunsystems ist unumstritten und nachvollziehbar durch die immense Anzahl an immunwirksamen Zytokinen, die von MSC und Tumorzellen sezerniert werden (vgl. 3.3.1). Um all diese ineinandergreifenden Systeme zu berücksichtigen, bleiben nach aktuellem Forschungsstand nur *in vivo* Versuche. Waterman et al. gelang es, ihre Ergebnisse aus der *in vitro* Forschung auch an Tiermodellen zu reproduzieren. Ihr Ansatzpunkt sind die sogenannten Toll-Like-Rezeptoren (TLR), welche Gefahrensignale aus der Umgebung wahrnehmen und entsprechende Adaptationsvorgänge sowohl auf zellulärer als auch systemischer Ebene auslösen. TLR sind in der Lage Signalwege wie Akt und ERK zu beeinflussen. Durch Stimulation von Untergruppen des Rezeptors (TLR3 bzw. TLR4) nahmen sie ein Priming der MSC vor und erhielten so zwei Subpopulationen, die sie mit den unbehandelten MSC verglichen. Die TLR3-geprimte MSC zeigten im Folgenden sowohl *in vitro* als *in vivo* tumorhemmende

Eigenschaften, während bei den TLR4-geprimten MSC ebenso wie bei den unbehandelten MSC die tumorfördernde Wirkung überwog [Tomchuck et al., 2008; Waterman et al., 2012; Waterman et al., 2010].

Bis zum flächendeckenden, routinemäßigen Einsatz von MSC in der Therapie von HNSCC scheint es noch ein weiter Weg zu sein. Doch auch einzelne Angriffspunkte im Bereich der Tumorzell-Stammzell-Interaktion sind therapeutisch denkbar, um die Tumorprogression zu hemmen. Beispielsweise wird die adjuvante Gabe von Anti-IL-6 bereits seit einigen Jahren diskutiert [Cullig, 2013]. Inzwischen wurde die Wirkung von hochaffinen, monoklonalen Anti-IL-6-Antikörpern an Mausmodellen mit menschlichem HNSCC-Gewebe mit ersten Erfolgen getestet [Finkel et al., 2016]. Einen weiteren möglichen Ansatz stellt die Inhibierung von JAK2/STAT3 dar, beispielsweise mit Hilfe des Malariamedikaments Dihydroartemisinin (DHA). Dies wurde bereits an Hep-2-, Cal27- und FaDu-Zellen *in vitro* und *in vivo* in Xenograft-Mausmodellen getestet. Darunter konnte u. a. eine Verminderung des Tumorwachstums, der Migration sowie der Resistenzen gegenüber Chemo- bzw. Radiotherapie beobachtet werden. Hier zeigte sich, dass FaDu-Zellen am wenigsten sensibel auf die Apoptose-Induktion durch DHA reagierten [Jia et al., 2016], was sich mit den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen deckt (vgl. 3.4). Der Weg führt hier ebenso wie bei vielen anderen therapeutischen Ansätzen in der Onkologie zur sogenannten personalisierten Medizin. Hierzu sollten die jeweiligen Tumorzellen möglichst genau charakterisiert werden, damit so die Therapie exakt auf den entsprechenden Patienten zugeschnitten werden kann. Welche Rolle der Einsatz von mesenchymalen Stammzellen in Zukunft in der Tumorthherapie spielen wird, ist schwer vorherzusagen. Doch die genannten Fortschritte geben Anlass und Anstoß zur weiteren Forschung.

5 Zusammenfassung

Bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs ist die relative 5-Jahres-Überlebensrate auch unter moderner, häufig sehr nebenwirkungsreicher Therapie weiterhin gering. Daher ist hier die Erforschung neuer Therapieoptionen von großer Bedeutung. Eine Möglichkeit könnten mesenchymale Stammzellen (MSC), beispielsweise aus dem Knochenmark, darstellen, welche derzeit aufgrund ihres Tumortropismus als ein potenzielles Vehikel für eine zielgerichtete Tumorthherapie diskutiert werden. In der Literatur werden jedoch sowohl tumorfördernde als auch -inhibierende Eigenschaften von MSC beschrieben. In dieser Arbeit sollte die Wirkung von MSC auf Proliferation und Vitalität von Tumorzelllinien von Kopf-Hals-Tumoren systematisch untersucht werden. Die Differenzierungsfähigkeit der MSC sollte mit abgebildet und verschiedene Expositionsarten der MSC gegenüber den Tumorzellen getestet werden. Eine Analyse der beteiligten Zytokine und Signalwege sollte durchgeführt werden sowie eine Möglichkeit der Hemmung dieser Signalwege evaluiert werden.

Dazu wurden MSC aus dem Knochenmark von zehn verschiedenen Patienten isoliert und kultiviert. Zum Nachweis der geforderten Minimalkriterien von MSC wurde ihre Differenzierungsfähigkeit durch histologische Färbungen und das Vorhandensein der typischen Oberflächenmarker-Kombination mit Hilfe der Durchflusszytometrie bestätigt. Mittels Real-Time PCR wurde die Expression differenzierungstypischer Gene bei Andifferenzierung bestimmt. In Proliferationsassays mit den Tumorzelllinien Cal27, HLaC78 und FaDu wurde die Wirkung der nativen und andifferenzierten MSC in Co-Kultur bzw. in Kultur mit deren Überstand im Vergleich zur Tumorzell-Monokultur untersucht. Die Analyse beteiligter Zytokine und Wachstumsfaktoren erfolgte mit Dot Blot Assay und IL-6 ELISA. Im Western Blot wurde die Aktivierung der ERK1/2-Kaskade und des STAT3-Signalwegs in Tumorzellen nach Kultivierung mit MSC-Überständen mit und ohne Anti-IL-6-Zugabe im Vergleich zur Monokultur untersucht.

Die isolierten MSC erfüllten alle geforderten Kriterien. Die spezifischen Markergene der adipogen andifferenzierten MSC waren in der Real-Time PCR bereits stark exprimiert, während bei den osteogen andifferenzierten MSC lediglich die alkalische Phosphatase diskret erhöht war. Im Proliferationsassay

mit nativen MSC zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Proliferation der Tumorzellen. Die Vitalität war bei Cal27-Tumorzellen mit Überstand nativer MSC signifikant niedriger als bei den unbehandelten Cal27. Beim Vergleich von Kultur mit Überständen von adipogen und osteogen andifferenzierten MSC mit unbehandelten Tumorzellen proliferierten die Cal27- und HLaC78-Tumorzellen mit Überstand osteogen andifferenzierter MSC signifikant geringer als die Tumorzellen, die in Überstand adipogen andifferenzierter MSC bzw. unbehandelt kultiviert worden waren. Die Vitalitätswerte waren bei allen drei Tumorzellenlinien jeweils in Kultur mit Überstand osteogen andifferenzierter MSC am niedrigsten. In Co-Kultur mit andifferenzierten MSC zeigten Cal27 und HLaC78 ein signifikant stärkeres Wachstum als die unbehandelten Tumorzellen. Der Dot Blot Assay wies erhöhte Konzentrationen von proliferations- und migrationsfördernden Zytokinen und Wachstumsfaktoren bei den Tumorzellkulturen mit konditionierten Überständen nach. Auch im IL-6 ELISA waren die höchsten Werte bei den Kulturen mit konditionierten Überständen messbar. Der Western Blot zeigte eine Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2, mit Ausnahme der FaDu-Zelllinie, und STAT3 durch Kultivierung der Tumorzellen mit MSC-Überstand. Durch die Zugabe von Anti-IL-6 wurde die Phosphorylierung von STAT3 und teilweise der ERK1/2 gehemmt.

Auch in dieser Arbeit waren Hinweise sowohl auf eine mögliche tumorfördernde- als auch tumorhemmende Wirkung der MSC auf Tumorzellen feststellbar. IL-6 stellt bei der Aktivierung der tumorfördernden Signalwege ERK1/2 und STAT3 einen wichtigen, jedoch nicht den einzigen Mediator dar. Sowohl in den vorliegenden Ergebnissen als auch in der Literatur gingen hohe IL-6 nicht bei jeder Zelllinie mit einer hohen Proliferation einher; paradoxe Reaktionen wurden beobachtet. Insgesamt unterschieden sich die MSC verschiedener Patienten und unterschiedlicher Proben in Bezug auf ihre Wirkung auf die Tumorzellen trotz Standardisierung der Methoden deutlich. In zahlreichen Arbeiten mit MSC wird von diesem Phänomen berichtet, welches Gegenstand weiterer Untersuchungen ist. MSC nach bestimmten erwünschten Charakteristika zu selektionieren, ist eine der großen Herausforderungen vor deren therapeutischem Einsatz.

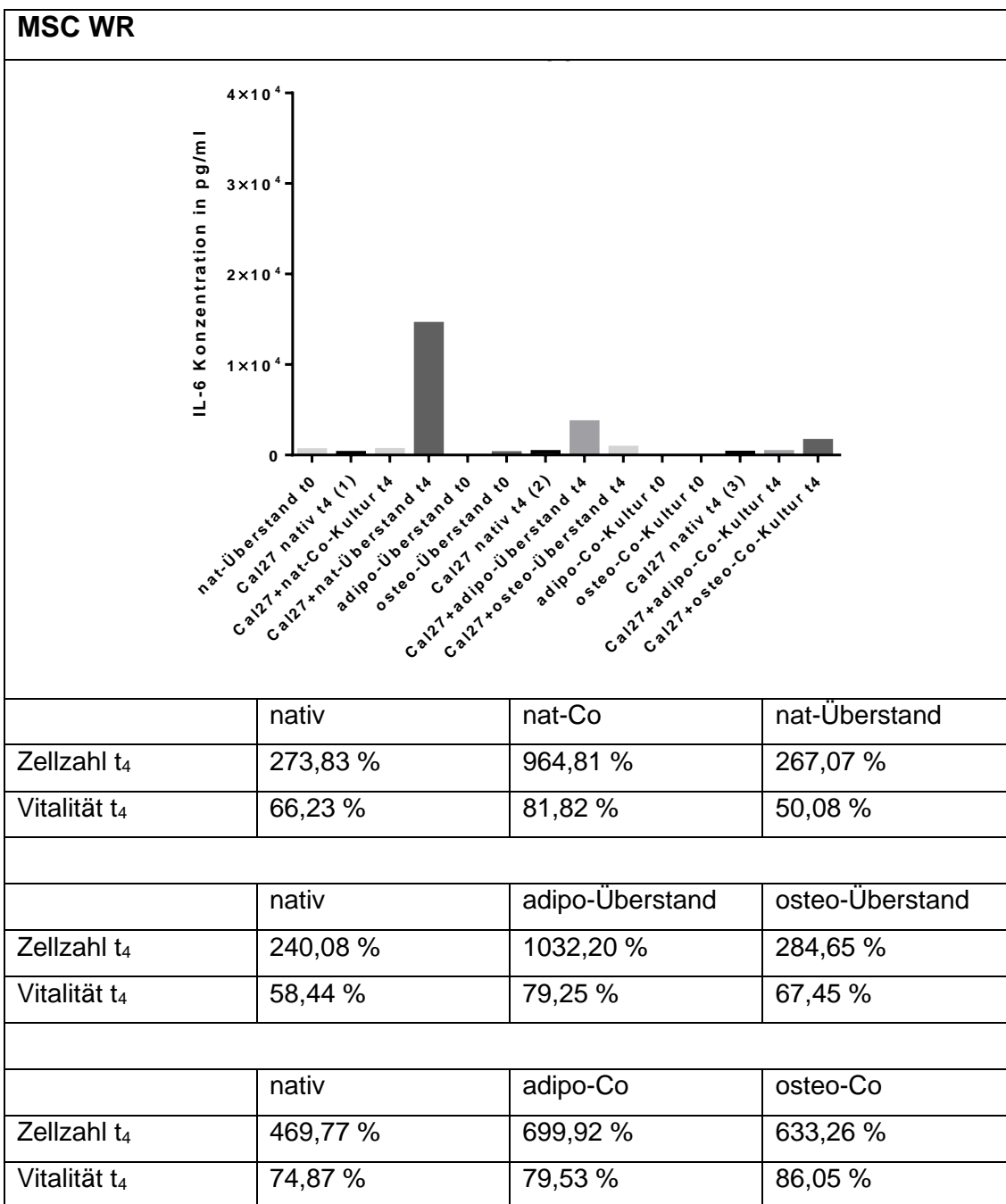
6 Anhang

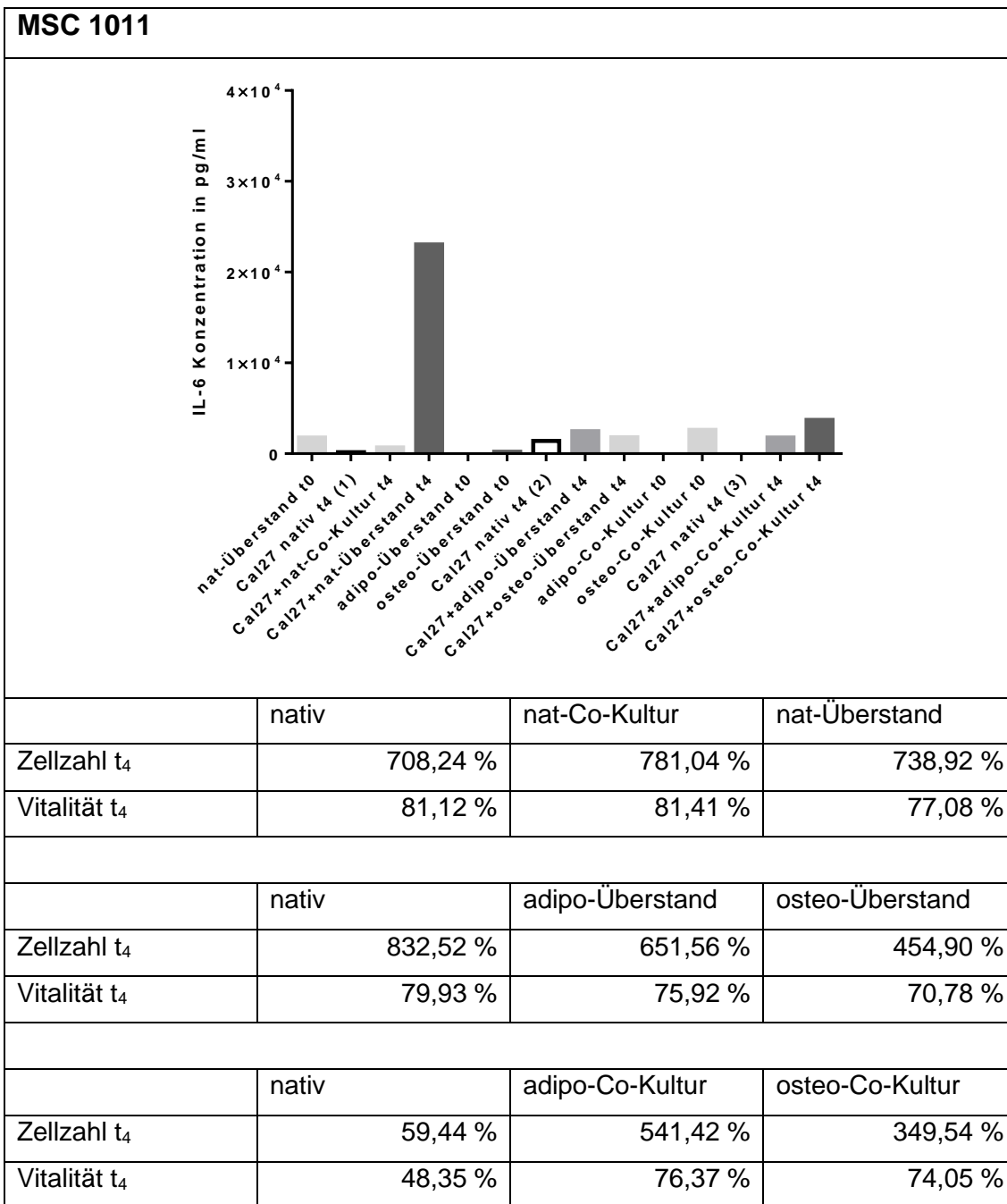
6.1 Zusammenstellung der Ergebnisse des Proliferationsassays und zugehöriger IL-6 Konzentrationen

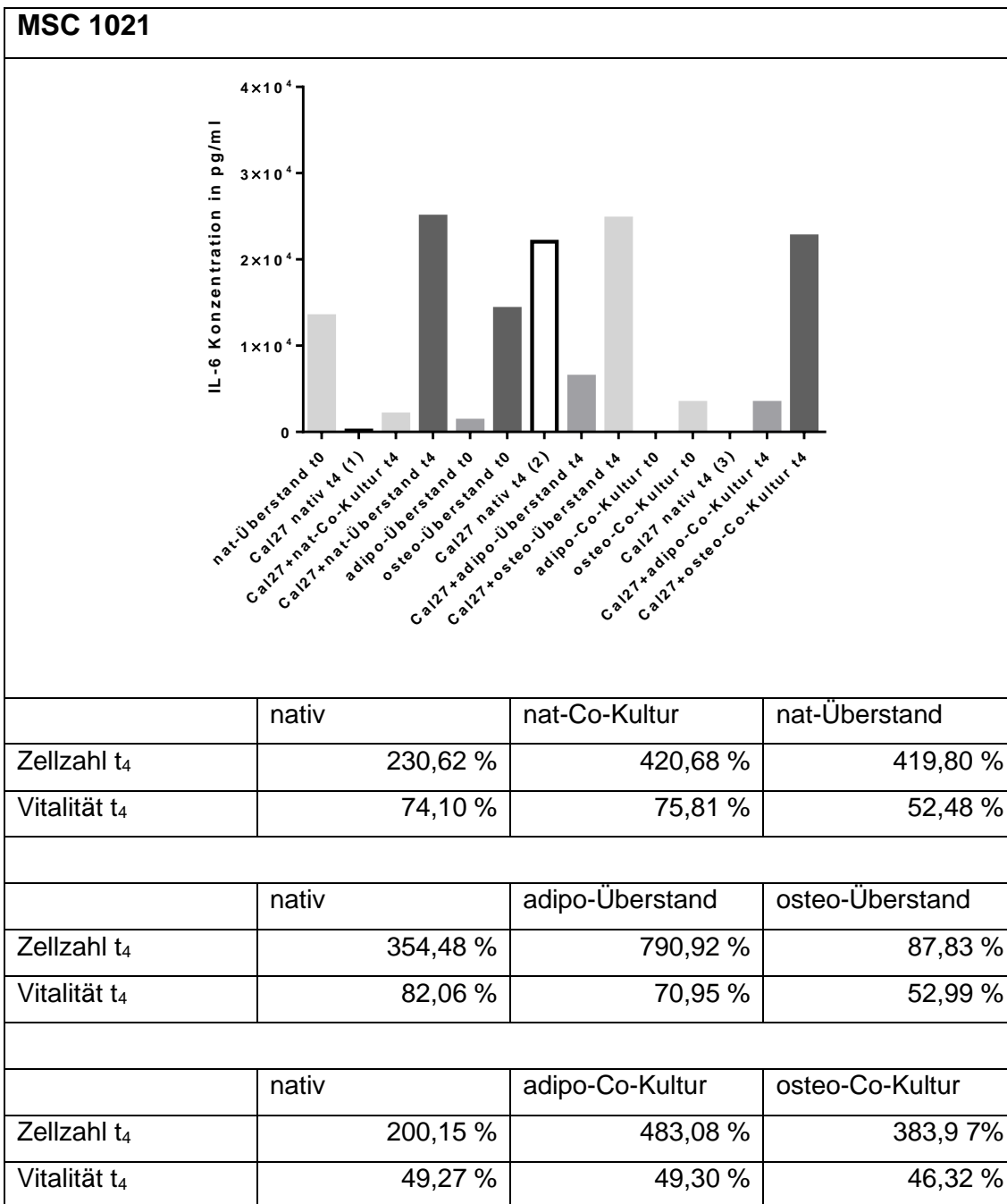
Tabelle 16. Zusammenstellung der Ergebnisse des Proliferationsassays und zugehörigen IL-6 Konzentrationen aus den ELISA für die einzelnen Stammzellenlinien

Die Ergebnisse des Proliferationsassays für jede Stammzelle ist prozentual zur Negativkontrolle angegeben. Mit „x“ bezeichnete Proben wurden für andere Versuche verwendet und standen nicht mehr für den ELISA zur Verfügung.

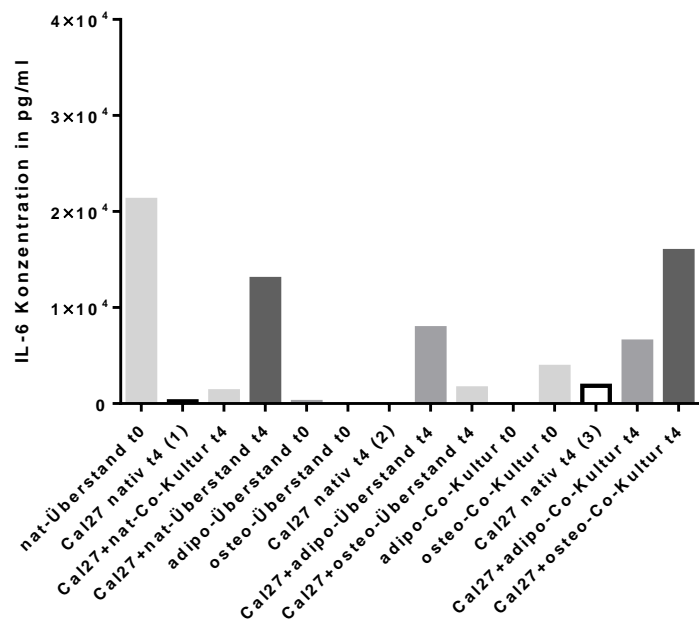
MSC HI			
	nativ	nat-Co-Kultur	nat-Überstand
Zellzahl t ₄		772 %	939 %
Vitalität t ₄		85,58 %	82,31 %
	nativ	adipo-Überstand	osteo-Überstand
Zellzahl t ₄		230,62 %	488,23 %
Vitalität t ₄		81,40 %	81,38 %
	nativ	adipo-Co-Kultur	osteo-Co-Kultur
Zellzahl t ₄		95,06 %	235,98 %
Vitalität t ₄		55,53 %	63,13 %





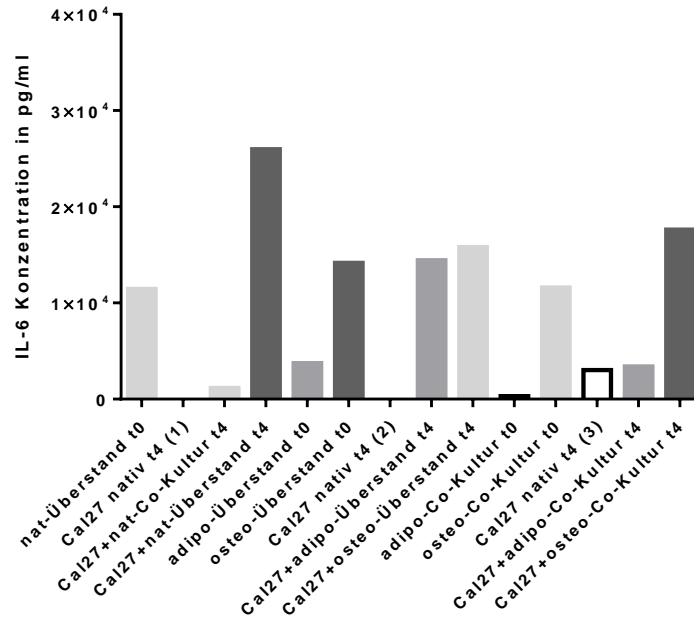


MSC 1034



	nativ	nat-Co-Kultur	nat-Überstand
Zellzahl t ₄		607,36 %	785,51 %
Vitalität t ₄		74,81 %	68,99 %
	nativ	adipo-Überstand	osteo-Überstand
Zellzahl t ₄		717,08 %	680,16 %
Vitalität t ₄		77,73 %	71,67 %
	nativ	adipo-Co-Kultur	osteo-Co-Kultur
Zellzahl t ₄		794,04 %	1304,16 %
Vitalität t ₄		75,78 %	73,94 %

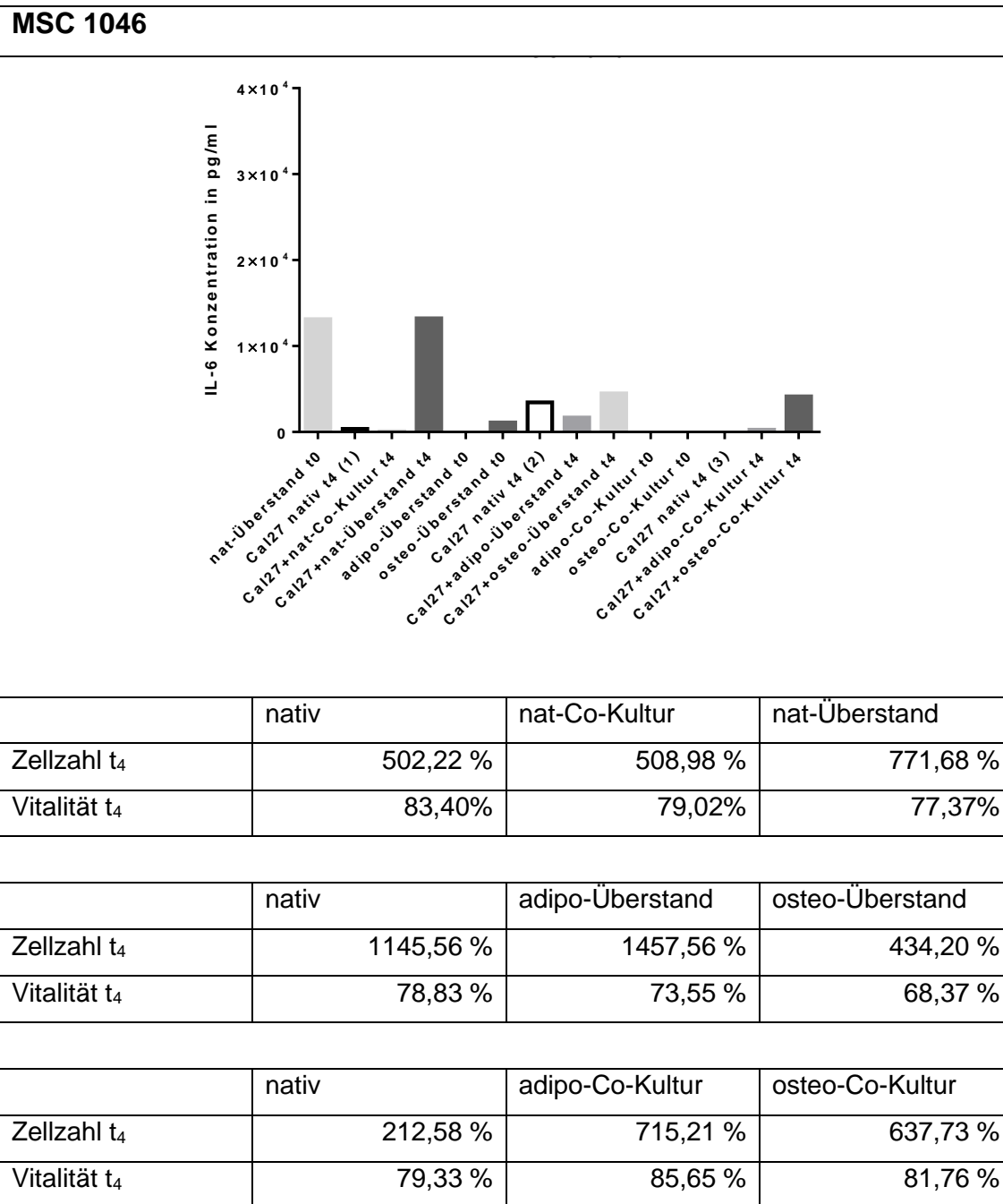
MSC 1041



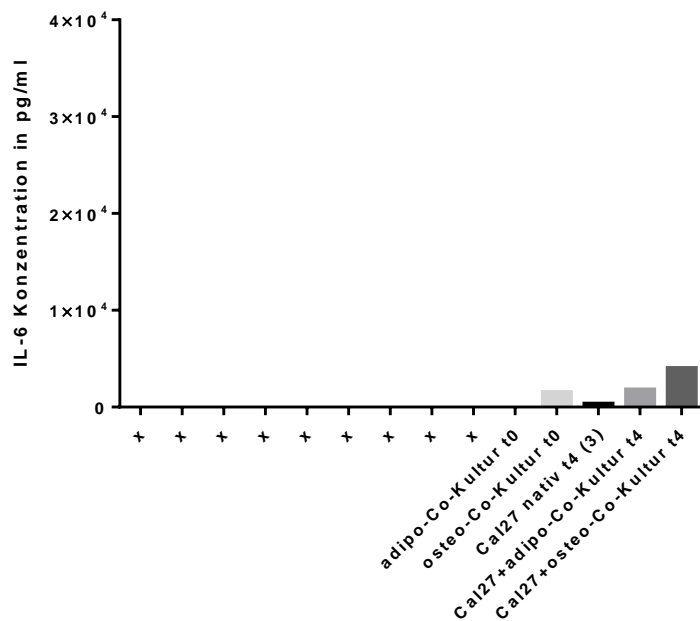
	nativ	nat-Co-Kultur	nat-Überstand
Zellzahl t ₄	144,56 %	380,12 %	256,72 %
Vitalität t ₄	71,02 %	72,51 %	54,81 %

	nativ	adipo-Überstand	osteo-Überstand
Zellzahl t ₄	111,70 %	160,78 %	154,96 %
Vitalität t ₄	73,59 %	60,41 %	63,35 %

	nativ	adipo-Co-Kultur	osteo-Co-Kultur
Zellzahl t ₄	332,54 %	312,10 %	370,34 %
Vitalität t ₄	47,90 %	34,75 %	46,20 %

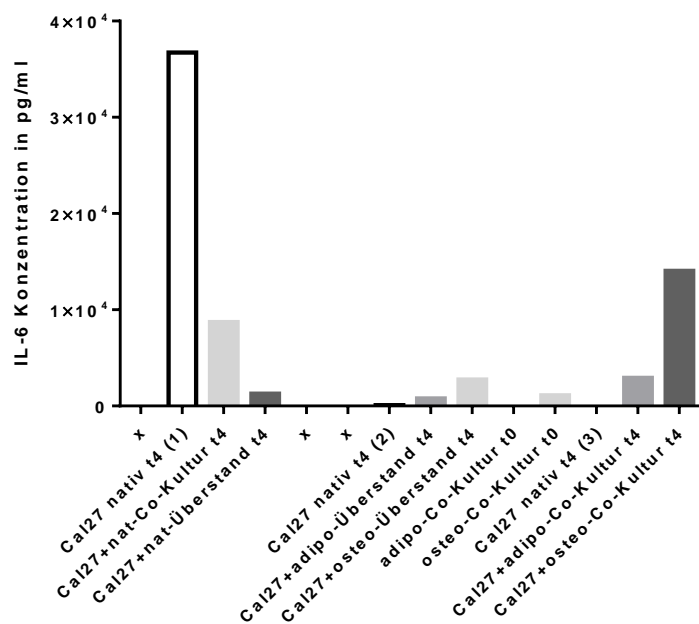


MSC 1050

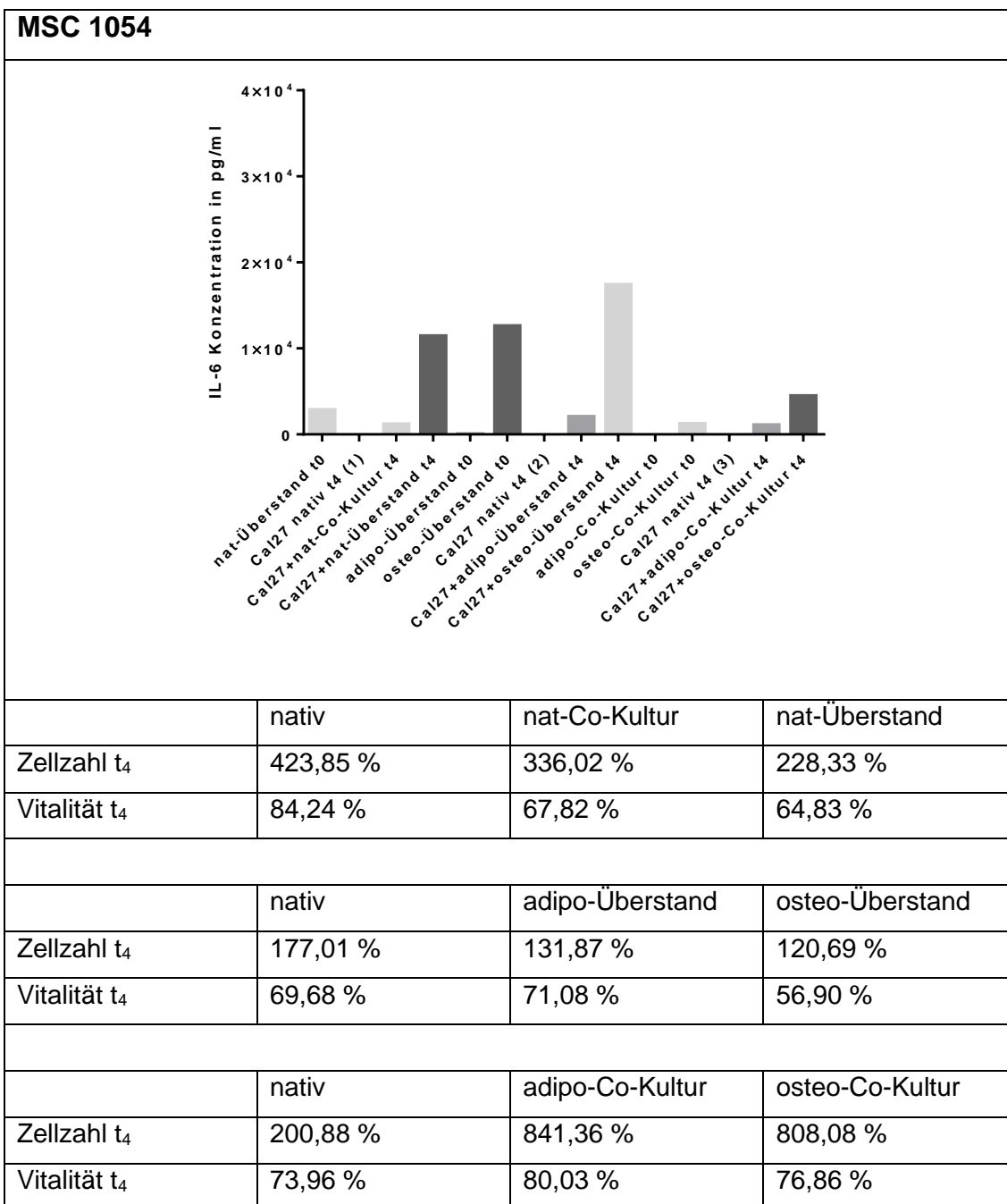


	nativ	nat-Co-Kultur	nat-Überstand
Zellzahl t ₄	659,36 %	743,18 %	798,20 %
Vitalität t ₄	80,44 %	70,51 %	75,02 %
	nativ	adipo-Überstand	osteo-Überstand
Zellzahl t ₄	921,96 %	271,60 %	62,14 %
Vitalität t ₄	77,19 %	49,88 %	57,02 %
	nativ	adipo-Co-Kultur	osteo-Co-Kultur
Zellzahl t ₄	148,20 %	708,03 %	655,82 %
Vitalität t ₄	68,12 %	83,53 %	81,80 %

MSC 1051



	nativ	nat-Co-Kultur	nat-Überstand
Zellzahl t ₄	1162,72 %	665,70 %	301,76 %
Vitalität t ₄	81,96 %	73,61 %	66,53 %
	nativ	adipo-Überstand	osteo-Überstand
Zellzahl t ₄	1144,00 %	1180,92 %	252,67 %
Vitalität t ₄	78,83 %	70,26 %	63,68 %
	nativ	adipo-Co-Kultur	osteo-Co-Kultur
Zellzahl t ₄	145,91 %	852,38 %	839,59 %
Vitalität t ₄	60,79 %	77,70 %	76,52 %



6.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Funktionen von MSC in Tumoren	8
Abbildung 2. IL-6 und wichtige Signalkaskaden	10
Abbildung 3. Versuchsaufbau.....	27
Abbildung 4. Prozess der MSC-Gewinnung	28
Abbildung 5. Beispiel einer 12-Well-Platte im Proliferationsassay.....	41
Abbildung 6. Färbungen der MSC zum Nachweis der Differenzierung	54
Abbildung 7. Histogramme der durchflusszytometrische Analyse der Oberflächen-marker der MSC.....	56

Abbildung 8. Graphische Darstellung der Ergebnisse der Real-Time PCR von adipogenen und osteogenen Markergenen bei andifferenzierten MSC	57
Abbildung 9. Proliferationsassays mit nativen MSC, Zellzahl an t_4	58
Abbildung 10. Proliferationsassays mit nativen MSC, Vitalität an t_4	59
Abbildung 11. Proliferationsassay mit nativen MSC; Zellwachstum und Vitalität t_0-t_4	60
Abbildung 12. Proliferationsassays mit konditionierten Überständen; Zellzahl an t_4	61
Abbildung 13. Proliferationsassays mit konditionierten Überständen, Vitalität an t_4	62
Abbildung 14. Proliferationsassay mit konditioniertem Überstand; Zellwachstum und Vitalität t_0-t_4	63
Abbildung 15. Proliferationsassays mit konditionierter Co-Kultur, Zellzahl an t_4	64
Abbildung 16. Proliferationsassays mit konditionierter Co-Kultur; Vitalität an t_4	65
Abbildung 17. Proliferationsassay mit konditionierter Co-Kultur; Zellwachstum und Vitalität t_0-t_4	66
Abbildung 18. Dot Blot Assay	67
Abbildung 19. Legende des Dot Blot Assays	67
Abbildung 20. Densitometrische IL-6 Konzentration im Dot Blot	68
Abbildung 21. IL-6 Konzentrationen der Überstände aus den Proliferationsassays, bestimmt mit ELISA.	70
Abbildung 22. Western Blot pERK1/2 und pSTAT3	71
Abbildung 23. Densitometrische Auswertung des Western Blots der Cal27-Tumorzelllinie	72
Abbildung 24. Densitometrische Auswertung des Western Blots der HLaC78-Tumorzelllinie	73
Abbildung 25. Densitometrische Auswertung des Western Blots der FaDu-Tumorzelllinie	74

Schriftliche Erlaubnis der Verlage bzw. Autoren zur Verwendung der zitierten Original-Illustrationen als Grundlage der modifizierten Abbildungen vorhanden:

Bergfeld S A und DeClerck Y A (2010). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 29, 249-261. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Droujinine I A, Eckert M A und Zhao W (2013). To grab the stroma by the horns: from biology to cancer therapy with mesenchymal stem cells. *Oncotarget* 4, 651-664.

Heinrich P C, Behrmann I, Haan S, Hermanns H M, Muller-Newen G und Schaper F (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374, 1-20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1223585/pdf/12773095.pdf>

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.	Angesetzte Nährmedien	15
Tabelle 2.	Angesetzte Lösungen und Puffer	15
Tabelle 3.	Verwendete Laborgeräte	17
Tabelle 4.	Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	19
Tabelle 5.	Verwendete Medien und Reagenzien.....	20
Tabelle 6.	Verwendete Antikörper für Durchflusszytometrie.....	24
Tabelle 7.	Verwendete Sonden für Real-Time PCR.....	24
Tabelle 8.	Verwendete Antikörper für Western Blot	25
Tabelle 9.	Verwendete Software	25
Tabelle 10.	Herstellung des adipogenen Differenzierungsmediums	32
Tabelle 11.	Herstellung des osteogenen Differenzierungsmediums	33
Tabelle 12.	Herstellung des Reaktionsgemisches für die Reverse Transkription.....	38
Tabelle 13.	Reaktionsprotokoll der Reversen Transkription	39
Tabelle 14.	Herstellung des Reaktionsgemisches für die Real-Time PCR.....	39
Tabelle 15.	Reaktionsprotokoll der Real-Time PCR.....	40
Tabelle 16.	Zusammenstellung der Ergebnisse des Proliferationsassays und zugehörigen IL-6 Konzentrationen aus den ELISA für die einzelnen Stammzellenlinien	93

6.4 Literaturverzeichnis

- Alberts B, Johnson A und Lewis J (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4. Aufl., Garland Science, New York.
- Amable P, Teixeira M, Carias R, Granjeiro J und Borojevic R (2014). Gene expression and protein secretion during human mesenchymal cell differentiation into adipogenic cells. *BMC Cell Biol* 15, 46.
- Argibay B, Trekker J, Himmelreich U, Beiras A, Topete A, Taboada P, Perez-Mato M, Sobrino T, Rivas J, Campos F und Castillo J (2016). Easy and efficient cell tagging with block copolymers based contrast agents for sensitive MRI detection in vivo. *Cell Transplant* 25, 1787–1800.
- Battula V L, Chen Y, Cabreira Mda G, Ruvolo V, Wang Z, Ma W, Konoplev S, Shpall E, Lyons K, Strunk D, Bueso-Ramos C, Davis R E, Konopleva M und Andreeff M (2013). Connective tissue growth factor regulates adipocyte differentiation of mesenchymal stromal cells and facilitates leukemia bone marrow engraftment. *Blood* 122, 357-366.
- Battula V L, Le P M, Sun J C, Nguyen K, Yuan B, Zhou X, Sonnylal S, McQueen T, Ruvolo V, Michel K A, Ling X, Jacamo R, Shpall E, Wang Z, Rao A, Al-Atrash G, Konopleva M, Davis R E, Harrington M A, Cahill C W, Bueso-Ramos C und Andreeff M (2017). AML-induced osteogenic differentiation in mesenchymal stromal cells supports leukemia growth. *JCI Insight* 2.

- Beckermann B M, Kallifatidis G, Groth A, Frommhold D, Apel A, Mattern J, Salnikov A V, Moldenhauer G, Wagner W, Diehlmann A, Saffrich R, Schubert M, Ho A D, Giese N, Buchler M W, Friess H, Buchler P und Herr I (2008). VEGF expression by mesenchymal stem cells contributes to angiogenesis in pancreatic carcinoma. *Br J Cancer* 99, 622-631.
- Bergfeld S A, Blavier L und DeClerck Y A (2014). Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote survival and drug resistance in tumor cells. *Mol Cancer Ther* 13, 962-975.
- Bergfeld S A und DeClerck Y A (2010). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells and the tumor microenvironment. *Cancer Metastasis Rev* 29, 249-261.
- Bieback K, Hecker A, Kocaomer A, Lannert H, Schallmoser K, Strunk D und Kluter H (2009). Human alternatives to fetal bovine serum for the expansion of mesenchymal stromal cells from bone marrow. *Stem Cells* 27, 2331-2341.
- Blasco M A, Svider P F, Raza S N, Jacobs J R, Folbe A J, Saraf P, Eloy J A, Baredes S und Fribley A M (2017). Systemic therapy for head and neck squamous cell carcinoma: Historical perspectives and recent breakthroughs. *Laryngoscope*.
- Bohrnsen F, Fricke M, Sander C, Leha A, Schliephake H und Kramer F J (2015). Interactions of human MSC with head and neck squamous cell carcinoma cell line PCI-13 reduce markers of epithelia-mesenchymal transition. *Clin Oral Investig* 19, 1121-1128.
- Bollrath J, Pheese T J, von Burstin V A, Putoczki T, Bennecke M, Bateman T, Nebelsiek T, Lundgren-May T, Canli O, Schwitalla S, Matthews V, Schmid R M, Kirchner T, Arkan M C, Ernst M und Greten F R (2009). gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 15, 91-102.
- Boxall S A und Jones E (2012). Markers for Characterization of Bone Marrow Multipotential Stromal Cells. *Stem Cells Int* 2012.
- Brocke-Heidrich K, Kretzschmar A K, Pfeifer G, Henze C, Loffler D, Koczan D, Thiesen H J, Burger R, Gramatzki M und Horn F (2004). Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. *Blood* 103, 242-251.
- Bromberg J F, Wrzeszczynska M H, Devgan G, Zhao Y, Pestell R G, Albanese C und Darnell J E, Jr. (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell* 98, 295-303.
- Brown T, Darnton A, Fortunato L und Rushton L (2012). Occupational cancer in Britain. Respiratory cancer sites: larynx, lung and mesothelioma. *Br J Cancer* 107 Suppl 1, S56-70.
- Busser H, Najjar M, Raicevic G, Pieters K, Velez Pombo R, Philippart P, Meuleman N, Bron D und Lagneaux L (2015). Isolation and

- Characterization of Human Mesenchymal Stromal Cell Subpopulations: Comparison of Bone Marrow and Adipose Tissue. *Stem Cells Dev* 24, 2142-2157.
- Byers R J, Brown J, Brandwood C, Wood P, Staley W, Hainey L, Freemont A J und Hoyland J A (1999). Osteoblastic differentiation and mRNA analysis of STRO-1-positive human bone marrow stromal cells using primary in vitro culture and poly (A) PCR. *J Pathol* 187, 374-381.
- Caplan A I (1991). Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9, 641-650.
- Caplan A I und Dennis J E (2006). Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem* 98, 1076-1084.
- Cavarretta I T, Altanerova V, Matuskova M, Kucerova L, Culig Z und Altaner C (2010). Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells expressing prodrug-converting enzyme inhibit human prostate tumor growth. *Mol Ther* 18, 223-231.
- Chang H, Shi Y, Tuokan T, Chen R und Wang X (2014). Expression of aquaporin 8 and phosphorylation of Erk1/2 in cervical epithelial carcinogenesis: correlation with clinicopathological parameters. *Int J Clin Exp Pathol* 7, 3928-3937.
- Chen H T, Lee M J, Chen C H, Chuang S C, Chang L F, Ho M L, Hung S H, Fu Y C, Wang Y H, Wang H I, Wang G J, Kang L und Chang J K (2012). Proliferation and differentiation potential of human adipose-derived mesenchymal stem cells isolated from elderly patients with osteoporotic fractures. *J Cell Mol Med* 16, 582-593.
- Cheng H, Kastrup C J, Ramanathan R, Siegwart D J, Ma M, Bogatyrev S R, Xu Q, Whitehead K A, Langer R und Anderson D G (2010). Nanoparticulate cellular patches for cell-mediated tumoritropic delivery. *ACS Nano* 4, 625-631.
- Cheng S L, Zhang S F und Avioli L V (1996). Expression of bone matrix proteins during dexamethasone-induced mineralization of human bone marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 61, 182-193.
- Civin C I, Trischmann T, Kadan N S, Davis J, Noga S, Cohen K, Duffy B, Groenewegen I, Wiley J, Law P, Hardwick A, Oldham F und Gee A (1996). Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis. *J Clin Oncol* 14, 2224-2233.
- Coussens L M und Werb Z (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860-867.
- Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C W, Corselli M, Park T S, Andriolo G, Sun B, Zheng B, Zhang L, Norotte C, Teng P N, Traas J, Schugar R, Deasy B M, Badyrak S, Buhring H J, Giacobino J P, Lazzari L, Huard J und Peault B (2008). A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell* 3, 301-313.
- Culig Z (2013). Interleukin-6 as a therapy target in oral squamous carcinoma. *Expert Opin Ther Targets* 17, 53-59.

- da Silva Meirelles L, Caplan A I und Nardi N B (2008). In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 26, 2287-2299.
- da Silva Meirelles L, Chagastelles P C und Nardi N B (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119, 2204-2213.
- Dalgleish R, National Center for Biotechnology Information (2008). COL1A1 collagen type I alpha 1 [Homo sapiens (human)] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1277> [Stand:03.06.2016].
- Danaei G, Vander Hoorn S, Lopez A D, Murray C J und Ezzati M (2005). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet* 366, 1784-1793.
- Darnell J E, Jr. (1997). STATs and gene regulation. *Science* 277, 1630-1635.
- Darnell J E, Jr., Kerr I M und Stark G R (1994). Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science* 264, 1415-1421.
- De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P und Luyten F P (2001). Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum* 44, 1928-1942.
- De Becker A und Riet I V (2016). Homing and migration of mesenchymal stromal cells: How to improve the efficacy of cell therapy? *World J Stem Cells* 8, 73-87.
- Deasy B M, Lu A, Tebbets J C, Feduska J M, Schugar R C, Pollett J B, Sun B, Urish K L, Gharaibeh B M, Cao B, Rubin R T und Huard J (2007). A role for cell sex in stem cell-mediated skeletal muscle regeneration: female cells have higher muscle regeneration efficiency. *J Cell Biol* 177, 73-86.
- Dhillon A S, Hagan S, Rath O und Kolch W (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26, 3279-3290.
- Diaz-Flores L, Gutierrez R, Gonzalez P und Varela H (1991). Inducible perivascular cells contribute to the neochondrogenesis in grafted perichondrium. *Anat Rec* 229, 1-8.
- Diaz-Flores L, Gutierrez R, Lopez-Alonso A, Gonzalez R und Varela H (1992). Pericytes as a supplementary source of osteoblasts in periosteal osteogenesis. *Clin Orthop Relat Res*, 280-286.
- Digirolamo C M, Stokes D, Colter D, Phinney D G, Class R und Prockop D J (1999). Propagation and senescence of human marrow stromal cells in culture: a simple colony-forming assay identifies samples with the greatest potential to propagate and differentiate. *Br J Haematol* 107, 275-281.
- Dittrich W und Gohde W (1971). Flow-through chamber for photometers to measure and count particles in a dispersion medium, Europäisches Patentamt.

- Djouad F, Plence P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noel D und Jorgensen C (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102, 3837-3844.
- Doll D, Keller L, Maak M, Boulesteix A L, Siewert J R, Holzmann B und Janssen K P (2010). Differential expression of the chemokines GRO-2, GRO-3, and interleukin-8 in colon cancer and their impact on metastatic disease and survival. *Int J Colorectal Dis* 25, 573-581.
- Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D und Horwitz E (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Droujinine I A, Eckert M A und Zhao W (2013). To grab the stroma by the horns: from biology to cancer therapy with mesenchymal stem cells. *Oncotarget* 4, 651-664.
- Dubois S G, Floyd E Z, Zvonic S, Kilroy G, Wu X, Carling S, Halvorsen Y D, Ravussin E und Gimble J M (2008). Isolation of human adipose-derived stem cells from biopsies and liposuction specimens. *Methods Mol Biol* 449, 69-79.
- Duffy S A, Taylor J M, Terrell J E, Islam M, Li Y, Fowler K E, Wolf G T und Teknos T N (2008). Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. *Cancer* 113, 750-757.
- Dvorak H F (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med* 315, 1650-1659.
- Engvall E und Perlmann P (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-874.
- Erices A, Conget P und Minguell J J (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109, 235-242.
- Fakhry C, Westra W H, Li S, Cmelak A, Ridge J A, Pinto H, Forastiere A und Gillison M L (2008). Improved Survival of Patients With Human Papillomavirus–Positive Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in a Prospective Clinical Trial. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* 100, 261-269.
- Fimmel S, Devermann L, Herrmann A und Zouboulis C (2007). GRO-alpha: a potential marker for cancer and aging silenced by RNA interference. *Ann N Y Acad Sci* 1119, 176-189.
- Finkel K A, Warner K A, Kerk S, Bradford C R, McLean S A, Prince M E, Zhong H, Hurt E M, Hollingsworth R E, Wicha M S, Tice D A und Nor J E (2016). IL-6 Inhibition With MEDI5117 Decreases The Fraction of Head and Neck Cancer Stem Cells and Prevents Tumor Recurrence. *Neoplasia* 18, 273-281.
- Francisco-Cruz A, Aguilar-Santelises M, Ramos-Espinosa O, Mata-Espinosa D, Marquina-Castillo B, Barrios-Payan J und Hernandez-Pando R (2014).

- Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: not just another haematopoietic growth factor. *Med Oncol* 31, 774.
- Frank O, Heim M, Jakob M, Barbero A, Schafer D, Bendik I, Dick W, Heberer M und Martin I (2002). Real-time quantitative RT-PCR analysis of human bone marrow stromal cells during osteogenic differentiation in vitro. *J Cell Biochem* 85, 737-746.
- Friedenstein A J, Piatetzky S, Il und Petrakova K V (1966). Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *J Embryol Exp Morphol* 16, 381-390.
- Fung N, Faraji F, Kang H und Fakhry C (2017). The role of human papillomavirus on the prognosis and treatment of oropharyngeal carcinoma. *Cancer Metastasis Rev* 36, 449-461.
- Gang E J, Bosnakovski D, Figueiredo C A, Visser J W und Perlingeiro R C (2007). SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood* 109, 1743-1751.
- Geiger J L, Grandis J R und Bauman J E (2016). The STAT3 pathway as a therapeutic target in head and neck cancer: Barriers and innovations. *Oral Oncol* 56, 84-92.
- Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C und Noël D (2010). Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications. *Stem Cell Res Ther* 1, 2.
- Gioanni J, Fischel J L, Lambert J C, Demard F, Mazeau C, Zanghellini E, Ettore F, Formento P, Chauvel P, Lalanne C M und et al. (1988). Two new human tumor cell lines derived from squamous cell carcinomas of the tongue: establishment, characterization and response to cytotoxic treatment. *Eur J Cancer Clin Oncol* 24, 1445-1455.
- GraphPad Software | GraphPad Prism User Guide, Box and whisker graphs. URL: <https://www.graphpad.com/guides/prism/6/user-guide/> [Stand:20.09.2017].
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey P G und Shi S (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13625-13630.
- Hanahan D und Weinberg R A (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Hanahan D und Weinberg R A (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674.
- Hare J M, Traverse J H, Henry T D, Dib N, Strumpf R K, Schulman S P, Gerstenblith G, DeMaria A N, Denktas A E, Gammon R S, Hermiller J B, Jr., Reisman M A, Schaefer G L und Sherman W (2009). A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 54, 2277-2286.
- Heid C A, Stevens J, Livak K J und Williams P M (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6, 986-994.

- Heinrich P C, Behrmann I, Haan S, Hermanns H M, Muller-Newen G und Schaper F (2003). Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374, 1-20.
- Herberts C A, Kwa M S und Hermsen H P (2011). Risk factors in the development of stem cell therapy. *J Transl Med* 9, 29.
- Hodge D R, Hurt E M und Farrar W L (2005). The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer* 41, 2502-2512.
- Hong H S, Lee J, Lee E, Kwon Y S, Lee E, Ahn W, Jiang M H, Kim J C und Son Y (2009). A new role of substance P as an injury-inducible messenger for mobilization of CD29(+) stromal-like cells. *Nat Med* 15, 425-435.
- Horwitz E M, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F C, Deans R J, Krause D S und Keating A (2005). Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393-395.
- Janjanin S, Djouad F, Shanti R M, Baksh D, Gollapudi K, Prgomet D, Rackwitz L, Joshi A S und Tuan R S (2008). Human palatine tonsil: a new potential tissue source of multipotent mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Res Ther* 10, R83.
- Ji W T, Chen H R, Lin C H, Lee J W und Lee C C (2014). Monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1) modulates pro-survival signaling to promote progression of head and neck squamous cell carcinoma. *PLoS One* 9, e88952.
- Jia L, Song Q, Zhou C, Li X, Pi L, Ma X, Li H, Lu X und Shen Y (2016). Dihydroartemisinin as a Putative STAT3 Inhibitor, Suppresses the Growth of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma by Targeting Jak2/STAT3 Signaling. *PLoS One* 11, e0147157.
- Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S, Luttmann S, Stegmaier C, Waldeyer-Sauerland M, Waldmann A, Caspritz S, Christ M, Ernst A, Folkerts J, Hansmann J, Klein S, Kranzhöfer K, Kunz B, Manegold K, Penzkofer A, Tremel K, Weg-Remers S, Wittenberg K, Barnes B, Berzt J, Buttman-Schweiger N, Dahm S, Fiebig J, Haberland J, Kraywinkel K, Wienecke A und Wolf U (2017). Krebs in Deutschland für 2013/2014 (Robert Koch Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Berlin), S. 24-27 und 52-55.
- Kaiser S, Hackanson B, Follo M, Mehlhorn A, Geiger K, Ihorst G und Kapp U (2007). BM cells giving rise to MSC in culture have a heterogeneous CD34 and CD45 phenotype. *Cytotherapy* 9, 439-450.
- Kanazawa T, Nishino H, Hasegawa M, Ohta Y, Iino Y, Ichimura K und Noda Y (2007). Interleukin-6 directly influences proliferation and invasion potential of head and neck cancer cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 264, 815-821.
- Karnoub A E, Dash A B, Vo A P, Sullivan A, Brooks M W, Bell G W, Richardson A L, Polyak K, Tubo R und Weinberg R A (2007). Mesenchymal stem cells

- within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature* 449, 557-563.
- Keating A (2012). Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell* 10, 709-716.
- Kfoury Y und Scadden D T (2015). Mesenchymal cell contributions to the stem cell niche. *Cell Stem Cell* 16, 239-253.
- Khakoo A Y, Pati S, Anderson S A, Reid W, Elshal M F, Rovira, II, Nguyen A T, Malide D, Combs C A, Hall G, Zhang J, Raffeld M, Rogers T B, Stetler-Stevenson W, Frank J A, Reitz M und Finkel T (2006). Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med* 203, 1235-1247.
- Kidd S, Spaeth E, Watson K, Burks J, Lu H, Klopp A, Andreeff M und Marini F C (2012). Origins of the tumor microenvironment: quantitative assessment of adipose-derived and bone marrow-derived stroma. *PLoS One* 7, e30563.
- Kim H M, Kang D K, Kim H Y, Kang S S und Chang S I (2007). Angiogenin-induced protein kinase B/Akt activation is necessary for angiogenesis but is independent of nuclear translocation of angiogenin in HUVE cells. *Biochem Biophys Res Commun* 352, 509-513.
- Kishimoto T (1989). The biology of interleukin-6. *Blood* 74, 1-10.
- Klopp A H, Gupta A, Spaeth E, Andreeff M und Marini F, 3rd (2011). Concise review: Dissecting a discrepancy in the literature: do mesenchymal stem cells support or suppress tumor growth? *Stem Cells* 29, 11-19.
- Klopp A H, Spaeth E L, Dembinski J L, Woodward W A, Munshi A, Meyn R E, Cox J D, Andreeff M und Marini F C (2007). Tumor irradiation increases the recruitment of circulating mesenchymal stem cells into the tumor microenvironment. *Cancer Res* 67, 11687-11695.
- Knazek R A, Gullino P M, Kohler P O und Dedrick R L (1972). Cell culture on artificial capillaries: an approach to tissue growth in vitro. *Science* 178, 65-66.
- Komarova S, Kawakami Y, Stoff-Khalili M A, Curiel D T und Pereboeva L (2006). Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Mol Cancer Ther* 5, 755-766.
- Kurtzberg J, Prockop S, Teira P, Bittencourt H, Lewis V, Chan K W, Horn B, Yu L, Talano J A, Nemecek E, Mills C R und Chaudhury S (2014). Allogeneic human mesenchymal stem cell therapy (remestemcel-L, Prochymal) as a rescue agent for severe refractory acute graft-versus-host disease in pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant* 20, 229-235.
- Kurzweg T, Kimmeyer J, Knecht R, Hoffmann T K, Busch C J, Lorincz B B, Schuler P J und Laban S (2016). Curative treatment of head and neck squamous cell carcinoma: Organ preservation strategies in clinical routine in German-speaking countries. *Hno* 64, 501-507.

- Kyhse-Andersen J (1984). Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* 10, 203-209.
- Laemmli U K (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Li L, Guan Y, Liu H, Hao N, Liu T, Meng X, Fu C, Li Y, Qu Q, Zhang Y, Ji S, Chen L, Chen D und Tang F (2011). Silica nanorattle-doxorubicin-anchored mesenchymal stem cells for tumor-tropic therapy. *ACS Nano* 5, 7462-7470.
- Lim Y S, Lee J C, Lee Y S, Lee B J und Wang S G (2012). Growth Inhibitory Effect of Palatine Tonsil-derived Mesenchymal Stem Cells on Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Cells. *Clin Exp Otorhinolaryngol* 5, 86-93.
- Lin H H, Hwang S M, Wu S J, Hsu L F, Liao Y H, Sheen Y S, Chuang W H und Huang S Y (2014). The osteoblastogenesis potential of adipose mesenchymal stem cells in myeloma patients who had received intensive therapy. *PLoS One* 9, e94395.
- Liu S, Ginestier C, Ou S J, Clouthier S G, Patel S H, Monville F, Korkaya H, Heath A, Dutcher J, Kleer C G, Jung Y, Dontu G, Taichman R und Wicha M S (2011). Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res* 71, 614-624.
- Livak K J und Schmittgen T D (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25, 402-408.
- Loebinger M R, Eddaoudi A, Davies D und Janes S M (2009). Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer. *Cancer Res* 69, 4134-4142.
- Lu H, Kojima K, Battula V L, Korchin B, Shi Y, Chen Y, Spong S, Thomas D A, Kantarjian H, Lock R B, Andreeff M und Konopleva M (2014). Targeting connective tissue growth factor (CTGF) in acute lymphoblastic leukemia preclinical models: anti-CTGF monoclonal antibody attenuates leukemia growth. *Ann Hematol* 93, 485-492.
- Lu Y R, Yuan Y, Wang X J, Wei L L, Chen Y N, Cong C, Li S F, Long D, Tan W D, Mao Y Q, Zhang J, Li Y P und Cheng J Q (2008). The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther* 7, 245-251.
- Lüllmann-Rauch R und Asan E (2015). Taschenlehrbuch Histologie, 5. Aufl., Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart.
- Mader E K, Maeyama Y, Lin Y, Butler G W, Russell H M, Galanis E, Russell S J, Dietz A B und Peng K W (2009). Mesenchymal stem cell carriers protect oncolytic measles viruses from antibody neutralization in an orthotopic ovarian cancer therapy model. *Clin Cancer Res* 15, 7246-7255.

- Mendez-Ferrer S, Michurina T V, Ferraro F, Mazloom A R, Macarthur B D, Lira S A, Scadden D T, Ma'ayan A, Enikolopov G N und Frenette P S (2010). Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466, 829-834.
- Molloy A P, Martin F T, Dwyer R M, Griffin T P, Murphy M, Barry F P, O'Brien T und Kerin M J (2009). Mesenchymal stem cell secretion of chemokines during differentiation into osteoblasts, and their potential role in mediating interactions with breast cancer cells. *Int J Cancer* 124, 326-332.
- Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G und Erlich H (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1, 263-273.
- Nasef A, Zhang Y Z, Mazurier C, Bouchet S, Bensidhoum M, Francois S, Gorin N C, Lopez M, Thierry D, Fouillard L und Chapel A (2009). Selected Stro-1-enriched bone marrow stromal cells display a major suppressive effect on lymphocyte proliferation. *Int J Lab Hematol* 31, 9-19.
- Nauta A J und Fibbe W E (2007). Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood* 110, 3499-3506.
- Nold P, Brendel C, Neubauer A, Bein G und Hackstein H (2013). Good manufacturing practice-compliant animal-free expansion of human bone marrow derived mesenchymal stroma cells in a closed hollow-fiber-based bioreactor. *Biochem Biophys Res Commun* 430, 325-330.
- O'Neill E und Kolch W (2004). Conferring specificity on the ubiquitous Raf/MEK signalling pathway. *Br J Cancer* 90, 283-288.
- Ohlsson L B, Varas L, Kjellman C, Edvardsen K und Lindvall M (2003). Mesenchymal progenitor cell-mediated inhibition of tumor growth in vivo and in vitro in gelatin matrix. *Exp Mol Pathol* 75, 248-255.
- OLS-OMNI-LifeScience (2016). CASY Cell Counter and Analyzer - Meet the Legend in Cell-based Research, OLS OMNI Life Science GmbH & Co. KG. URL: https://www.ols-bio.de/media/pdf/CASY_2017_ebook.pdf.
- Orimo A, Gupta P B, Sgroi D C, Arenzana-Seisdedos F, Delaunay T, Naeem R, Carey V J, Richardson A L und Weinberg R A (2005). Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121, 335-348.
- Otsu K, Das S, Houser S D, Quadri S K, Bhattacharya S und Bhattacharya J (2009). Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood* 113, 4197-4205.
- Owen M (1988). Marrow stromal stem cells. *J Cell Sci Suppl* 10, 63-76.
- Pacini S (2014). Deterministic and stochastic approaches in the clinical application of mesenchymal stromal cells (MSCs). *Front Cell Dev Biol* 2, 50.
- Patki S, Kadam S, Chandra V und Bhonde R (2010). Human breast milk is a rich source of multipotent mesenchymal stem cells. *Hum Cell* 23, 35-40.

- Pevsner-Fischer M, Levin S und Zipori D (2011). The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. *Stem Cell Rev* 7, 560-568.
- Phinney D G, Kopen G, Righter W, Webster S, Tremain N und Prockop D J (1999). Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *J Cell Biochem* 75, 424-436.
- Pierce K E und Wang L J (2004). Effectiveness and limitations of uracil-DNA glycosylases in sensitive real-time PCR assays. *Biotechniques* 36, 44-46, 48.
- Pittenger M F, Mackay A M, Beck S C, Jaiswal R K, Douglas R, Mosca J D, Moorman M A, Simonetti D W, Craig S und Marshak D R (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- Psaltis P J, Paton S, See F, Arthur A, Martin S, Itescu S, Worthley S G, Gronthos S und Zannettino A C (2010). Enrichment for STRO-1 expression enhances the cardiovascular paracrine activity of human bone marrow-derived mesenchymal cell populations. *J Cell Physiol* 223, 530-540.
- Qiao L, Xu Z, Zhao T, Zhao Z, Shi M, Zhao R C, Ye L und Zhang X (2008a). Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model. *Cell Res* 18, 500-507.
- Qiao L, Xu Z L, Zhao T J, Ye L H und Zhang X D (2008b). Dkk-1 secreted by mesenchymal stem cells inhibits growth of breast cancer cells via depression of Wnt signalling. *Cancer Lett* 269, 67-77.
- Quante M, Tu S P, Tomita H, Gonda T, Wang S S, Takashi S, Baik G H, Shibata W, Diprete B, Betz K S, Friedman R, Varro A, Tycko B und Wang T C (2011). Bone marrow-derived myofibroblasts contribute to the mesenchymal stem cell niche and promote tumor growth. *Cancer Cell* 19, 257-272.
- Rangan S R (1972). A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma. *Cancer* 29, 117-121.
- Ranganath S H, Levy O, Inamdhar M S und Karp J M (2012). Harnessing the mesenchymal stem cell secretome for the treatment of cardiovascular disease. *Cell Stem Cell* 10, 244-258.
- Rasband W S (1997-2016). ImageJ 1.48v (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA), S.
- Rattigan Y, Hsu J M, Mishra P J, Glod J und Banerjee D (2010). Interleukin 6 mediated recruitment of mesenchymal stem cells to the hypoxic tumor milieu. *Exp Cell Res* 316, 3417-3424.
- RayBiotech I C-Series: Membrane-Based Antibody Arrays. URL: <http://www.raybiotech.com/c-series-membrane-based-antibody-arrays.html> [Stand:22.07.2018].
- RefSeq, National Center for Biotechnology Information (2008a). CD44 molecule (Indian blood group) [Homo sapiens (human)] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/960> [Stand:22.07.2018].

- RefSeq, National Center for Biotechnology Information (2008b). FABP4 fatty acid binding protein 4 [Homo sapiens (human)] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2167> [Stand:22.07.2018].
- RefSeq, National Center for Biotechnology Information (2008c). LPL lipoprotein lipase [Homo sapiens (human)] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4023> [Stand:22.07.2018].
- RefSeq, National Center for Biotechnology Information (2010). PECAM1 platelet/endothelial cell adhesion molecule 1 [Homo sapiens (human)] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5175> [Stand:22.07.2018].
- RefSeq, National Center for Biotechnology Information (2011). NT5E 5'-nucleotidase ecto [Homo sapiens (human)] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4907> [Stand:22.07.2018].
- RefSeq, National Center for Biotechnology Information (2014). GAPDH glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens (human)] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2597> [Stand:22.07.2018].
- RefSeq, National Center for Biotechnology Information (2015a). ALPL alkaline phosphatase, liver/bone/kidney [Homo sapiens (human)] URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=249 [Stand:22.07.2018].
- RefSeq, National Center for Biotechnology Information (2015b). BGLAP bone gamma-carboxyglutamate protein [Homo sapiens (human)] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/632> [Stand:22.07.2018].
- RefSeq, National Center for Biotechnology Information (2015c). THY1 Thy-1 cell surface antigen [Homo sapiens (human)] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7070> [Stand:22.07.2018].
- RefSeq, National Center for Biotechnology Information (2016). RUNX2 runt related transcription factor 2 [Homo sapiens (human)] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/860> [Stand:22.07.2018].
- RefSeq, National Center for Biotechnology Information (2017). LEP leptin [Homo sapiens (human)] URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3952> [Stand:22.07.2018].
- Ridge S M, Sullivan F J und Glynn S A (2017). Mesenchymal stem cells: key players in cancer progression. *Mol Cancer* 16, 31.
- Roger M, Clavreul A, Venier-Julienne M C, Passirani C, Sindji L, Schiller P, Montero-Menei C und Menei P (2010). Mesenchymal stem cells as cellular vehicles for delivery of nanoparticles to brain tumors. *Biomaterials* 31, 8393-8401.
- Rudack C, Maune S, Eble J und Schroeder J M (2003). The primary role in biologic activity of the neutrophil chemokines IL-8 and GRO-alpha in cultured nasal epithelial cells. *J Interferon Cytokine Res* 23, 113-123.
- Safadi F F, Xu J, Smock S L, Kanaan R A, Selim A H, Odgren P R, Marks S C, Jr., Owen T A und Popoff S N (2003). Expression of connective tissue

- growth factor in bone: its role in osteoblast proliferation and differentiation in vitro and bone formation in vivo. *J Cell Physiol* 196, 51-62.
- Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D und Rose-John S (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta* 1813, 878-888.
- Scheller J und Rose-John S (2006). Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. *Med Microbiol Immunol* 195, 173-183.
- Scherzad A, Steber M, Gehrke T, Rak K, Froelich K, Schendzielorz P, Hagen R, Kleinsasser N und Hackenberg S (2015). Human mesenchymal stem cells enhance cancer cell proliferation via IL-6 secretion and activation of ERK1/2. *Int J Oncol* 47, 391-397.
- Scherzed A, Hackenberg S, Froelich K, Rak K, Schendzielorz P, Gehrke T, Hagen R und Kleinsasser N (2016). The differentiation of hMSCs counteracts their migration capability and pro-angiogenic effects in vitro. *Oncol Rep* 35, 219-226.
- Scherzed A, Hackenberg S, Radeloff A, Froelich K, Rak K, Hagen R und Kleinsasser N (2013). Human mesenchymal stem cells promote cancer motility and cytokine secretion in vitro. *Cells Tissues Organs* 198, 327-337.
- Schmitz S (2011). *Zellkultur*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Shi C (2012). Recent progress toward understanding the physiological function of bone marrow mesenchymal stem cells. *Immunology* 136, 133-138.
- Shih Y R, Kuo T K, Yang A H, Lee O K und Lee C H (2009). Isolation and characterization of stem cells from the human parathyroid gland. *Cell Prolif* 42, 461-470.
- Shoshani O, Ravid O, Massalha H, Aharonov A, Ovadya Y, Pevsner-Fischer M, Leshkowitz D und Zipori D (2014). Cell isolation induces fate changes of bone marrow mesenchymal cells leading to loss or alternatively to acquisition of new differentiation potentials. *Stem Cells* 32, 2008-2020.
- Siegel G, Kluba T, Hermanutz-Klein U, Bieback K, Northoff H und Schafer R (2013). Phenotype, donor age and gender affect function of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *BMC Med* 11, 146.
- Smith P K, Krohn R I, Hermanson G T, Mallia A K, Gartner F H, Provenzano M D, Fujimoto E K, Goeke N M, Olson B J und Klenk D C (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150, 76-85.
- Stuckey D W und Shah K (2014). Stem cell-based therapies for cancer treatment: separating hope from hype. *Nat Rev Cancer* 14, 683-691.
- Takes R P, Wierzbicka M, D'Souza G, Jackowska J, Silver C E, Rodrigo J P, Dikkers F G, Olsen K D, Rinaldo A, Brakenhoff R H und Ferlito A (2015). HPV vaccination to prevent oropharyngeal carcinoma: What can be learned from anogenital vaccination programs? *Oral Oncol* 51, 1057-1060.

- Tan J, Wu W, Xu X, Liao L, Zheng F, Messinger S, Sun X, Chen J, Yang S, Cai J, Gao X, Pileggi A und Ricordi C (2012). Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial. *Jama* 307, 1169-1177.
- Tomchuck S L, Zwezdaryk K J, Coffelt S B, Waterman R S, Danka E S und Scandurro A B (2008). Toll-like receptors on human mesenchymal stem cells drive their migration and immunomodulating responses. *Stem Cells* 26, 99-107.
- Towbin H, Staehelin T und Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350-4354.
- Uccelli A, Moretta L und Pistoia V (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol* 8, 726-736.
- Van Weemen B K und Schuurs A H (1971). Immunoassay using antigen-enzyme conjugates. *FEBS Lett* 15, 232-236.
- Vishwanath R und Mukherjee R (1996). Substance P promotes lymphocyte-endothelial cell adhesion preferentially via LFA-1/ICAM-1 interactions. *J Neuroimmunol* 71, 163-171.
- Waage A, Brandtzaeg P, Halstensen A, Kierulf P und Espevik T (1989). 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* 169, 333-338.
- Wagner W und Ho A D (2007). Mesenchymal stem cell preparations--comparing apples and oranges. *Stem Cell Rev* 3, 239-248.
- Wang H, Cao F, De A, Cao Y, Contag C, Gambhir S S, Wu J C und Chen X (2009). Trafficking mesenchymal stem cell engraftment and differentiation in tumor-bearing mice by bioluminescence imaging. *Stem Cells* 27, 1548-1558.
- Waterman R S, Henkle S L und Betancourt A M (2012). Mesenchymal stem cell 1 (MSC1)-based therapy attenuates tumor growth whereas MSC2-treatment promotes tumor growth and metastasis. *PLoS One* 7, e45590.
- Waterman R S, Tomchuck S L, Henkle S L und Betancourt A M (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 5, e10088.
- Wellbrock C, Karasarides M und Marais R (2004). The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 875-885.
- Wolf J, Rose-John S und Garbers C (2014). Interleukin-6 and its receptors: a highly regulated and dynamic system. *Cytokine* 70, 11-20.
- Yoon S und Seger R (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors* 24, 21-44.

- Zaja-Milatovic S und Richmond A (2008). CXC chemokines and their receptors: a case for a significant biological role in cutaneous wound healing. *Histol Histopathol* 23, 1399-1407.
- Zenner H P, Lehner W und Herrmann I F (1979). Establishment of carcinoma cell lines from larynx and submandibular gland. *Arch Otorhinolaryngol* 225, 269-277.
- Zhang Y, Daquinag A C, Amaya-Manzanares F, Sirin O, Tseng C und Kolonin M G (2012). Stromal progenitor cells from endogenous adipose tissue contribute to pericytes and adipocytes that populate the tumor microenvironment. *Cancer Res* 72, 5198-5208.
- Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, Bian C, Li J, Yan X, Liu Y, Shao C und Zhao R C (2009). Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1. *Leukemia* 23, 925-933.
- Zipori D (2006). The stem state: mesenchymal plasticity as a paradigm. *Curr Stem Cell Res Ther* 1, 95-102.
- Zuk P A, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte D A, Huang J I, Mizuno H, Alfonso Z C, Fraser J K, Benhaim P und Hedrick M H (2002). Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 13, 4279-4295.
- Zuk P A, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell J W, Katz A J, Benhaim P, Lorenz H P und Hedrick M H (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7, 211-228.

6.5 Kongressbeiträge und Publikation mit Inhalten der vorliegenden Arbeit

- Steber M, Scherzad A, Hackenberg S, Kleinsasser N (2015). Andifferenzierte Stammzellen als Vehikel für eine zielgerichtete Tumortherapie? 86. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., Berlin
- Steber M, Scherzad A, Hackenberg S, Hagen R, Kleinsasser N (2015). Untersuchungen zur Wirkung von Stammzellen auf die Proliferation von Tumorzellen. 59. Österreichischer HNO-Kongress der Österreichischen Gesellschaft für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde, Kopf- und Halschirurgie, Innsbruck
- Scherzad A, Steber M, Gehrke T, Rak K, Froelich K, Schendzielorz P, Hagen R, Kleinsasser N und Hackenberg S (2015). Human mesenchymal stem cells enhance cancer cell proliferation via IL-6 secretion and activation of ERK1/2. *Int J Oncol* 47, 391-397.

Danksagung

Ohne Unterstützung wäre die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein herzlichster Dank gilt:

- Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Rudolf Hagen für die Ermöglichung der Dissertation an seiner Klinik
- Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser, MHBA, für die Annahme als Doktorandin und die kompetente Betreuung - auch noch aus Österreich
- Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Agmal Scherzad und Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Stephan Hackenberg für die hervorragende, freundschaftliche Unterstützung bei den kleinen und großen Herausforderungen im Verlauf dieser Arbeit
- allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe, Frau Dr. rer. nat. Marianne Schmidt, Frau Petra Joa, Frau Laura Halbhuber, Frau Christine Polednik, Frau Karin Jung, Frau Margarete Appelmann und ganz besonders Frau Jeanette Roller, Frau Silke Hummel und Herrn Michael Kessler für die fundierte Einarbeitung, stetige Unterstützung, Geduld und Motivation auch durch so manche Durststrecke
- den Spendern der Stammzellen, ohne die keiner dieser Versuche möglich gewesen wäre
- dem Laborteam des König-Ludwig-Hauses für die Isolierung der Stammzellen
- Frau Viktoria Rücker vom Institut für klinische Epidemiologie und Biometrie der Universität Würzburg für die statistische Beratung
- den Mitarbeitern von Pforte und Reinigungsteam für die Rücksicht und netten Worte auch zu manch ungewöhnlicher Zeit
- meiner Familie und Freunden für die vielfältige Unterstützung während des Studiums und der Promotion