

Aus der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
(Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake)
im Zentrum Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Interaktionen von humanen mesenchymalen Stromazellen (hMSC) mit
Plattenepithelkarzinomzellen des Oropharynx in indirekter Kokultur**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades für Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Dr. med. Martin Fricke
aus
Göttingen
Göttingen 2010

D e k a n:

Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. F.-J. Kramer

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	5
Tabellenverzeichnis	7
1 Einleitung.....	8
1.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich	8
1.2 Interaktionen von Tumorzellen und Umgebungsgewebe.....	8
1.3 Die oropharyngeale Plattenepithelkarzinomzelllinie PCI-13	10
1.4 Humane mesenchymale Stromazellen.....	11
1.5 Mediatoren der Tumor-Stroma-Interaktion	12
1.5.1 Wingless-type MMTV integration site family, member 3 (Wnt-3).....	12
1.5.2 β -Catenin.....	14
1.5.3 Matrix-Metalloproteinase 14 (MMP-14)	15
1.5.4 E-Cadherin	17
1.5.5 Cathepsin B.....	19
1.5.6 V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (Ets-1).....	21
1.6 Die indirekte Kokultur von PCI-13 und humanen mesenchymalen Stromazellen (hMSC) als Modell der Tumor-Stroma-Interaktion	24
1.7 Aufgabenstellung	24
2 Material und Methoden	26
2.1 Verwendete Zellen	26
2.1.1 Gewinnung von humanen mesenchymalen Stromazellen.....	26
2.1.1.1 Isolation der mesenchymalen Zellreihe	26
2.1.1.2 Kultur der Knochenmarkstromazellen	27
2.1.1.3 Charakterisierung.....	27
2.1.2 Tumorzellen	28
2.1.3 Kultur der Tumorzellen	28

2.1.4	Kokultur im Membraneinsatz-System.....	29
2.1.5	Trypsinierung der Zellen.....	30
2.1.6	Zellzählung.....	31
2.2	Quantitativer Genexpressionsnachweis.....	32
2.2.1	Isolation von RNA.....	32
2.2.2	DNase-Verdau.....	33
2.2.2.1	DNase-I-Inkubation.....	33
2.2.2.2	Reinigung der Probe (Phenol-Chloroform-Extraktion).....	33
2.2.2.3	RNA-Präzipitation.....	33
2.2.2.4	Reinigen der RNA.....	34
2.2.2.5	Wiederauflösen der RNA.....	34
2.2.3	Quantitäts- und Qualitätskontrolle.....	34
2.2.4	Reverse Transkription der gewonnenen RNA in cDNA.....	35
2.2.5	Primer.....	35
2.2.6	Verifikation der Schmelztemperatur und temperaturabhängigen Spezifität.....	36
2.2.7	Verifikation der konzentrationsabhängigen Spezifität und Ermittlung der Standardkurve.....	38
2.2.8	Quantitative PCR (qPCR).....	38
2.3	Statistische Analyse.....	40
2.3.1	Evaluation der Zellproliferationsunterschiede.....	40
2.3.2	Evaluation der Genexpressionsunterschiede.....	41
2.4	Verwendete Lösungen, Chemikalien und Geräte.....	41
2.4.1	Verwendete Lösungen.....	41
2.4.2	Verwendete Chemikalien.....	42
2.4.3	Verwendete Geräte.....	43
3	Ergebnisse.....	45
3.1	Charakterisierung humaner mesenchymaler Stromazellen.....	45
3.1.1	Patient 4.....	46
3.1.1.1	Patient 4: Leermessung und Isotypkontrollen.....	46

3.1.1.2	<i>Patient 4: Bestimmung der Oberflächenantigene</i>	47
3.1.2	Patient 5 und 6	49
3.1.2.1	<i>Patient 5 und 6: Leermessung und Isotypkontrollen</i>	49
3.1.2.2	<i>Patient 5: Bestimmung der Oberflächenantigene</i>	50
3.1.2.3	<i>Patient 6: Bestimmung der Oberflächenantigene</i>	52
3.1.3	Patient 7	54
3.1.3.1	<i>Patient 7: Leermessung und Isotypkontrollen</i>	54
3.1.3.2	<i>Patient 7: Bestimmung der Oberflächenantigene</i>	55
3.2	<i>Zellproliferation in indirekter Kokultur</i>	58
3.2.1	Proliferation der PCI-13-Zellen	58
3.2.2	Proliferation der humanen mesenchymalen Stromazellen	59
3.2.3	Zusammenfassender Vergleich der Proliferation	60
3.3	<i>Genexpression</i>	61
3.3.1	Genexpression von WNT3	61
3.3.2	Genexpression von MMP14	62
3.3.3	Genexpression von CTNNB1	63
3.3.4	Genexpression von CDH1	64
3.3.5	Genexpression von CTSB	65
3.3.6	Genexpression von ETS1	66
3.3.7	Zusammenfassender Vergleich der Genexpressionsraten.....	67
4	Diskussion	68
4.1	<i>Diskussion der Methoden</i>	68
4.1.1	Durchflusszytometrie (FACS).....	68
4.1.2	Indirekte Kokultur	68
4.1.3	Reverse Transcription Quantitative PCR (RT-qPCR).....	69
4.2	<i>Parakrine Einflüsse humaner mesenchymaler Stromazellen auf die Proliferation von PCI-13-Zellen</i>	70
4.3	<i>Parakrine Einflüsse humaner mesenchymaler Stromazellen auf die Genexpression von PCI-13-Zellen</i>	73
4.3.1	WNT3.....	73

4.3.2	CDH1	74
4.3.3	MMP14.....	75
4.4	<i>Mögliche Auswirkungen der beobachteten Modifikationen der Genexpression auf die Eigenschaften der Tumorzellpopulation</i>	77
5	Zusammenfassung.....	79
6	Literaturverzeichnis	81
	Anhang: Qualitätskontrollen der analysierten RNA (RNA-Elektrophorese)	96

Abbildungsverzeichnis

1 Einleitung

Abbildung 1.1: Der kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg.....	15
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Struktur von MMP-14	17
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Genexpressionssteuerung von Cathepsin B und Matrix-Metalloproteinasen über Ets-1	23

2 Material und Methoden

Abbildung 2.1: Kokultur von PCI-13 und hMSC	29
---	----

3 Ergebnisse

Abbildung 3.1: Übersicht der Reaktivität für Antigene der mesenchymalen und hämatogenen Zellreihe in der Durchflusszytometrie bei Knochenmarkstromazellen.....	45
Abbildung 3.2: Patient 4 – Leermessung SSC/FSC	46
Abbildung 3.3: Patient 4 – Isotypkontrolle FITC.....	46
Abbildung 3.4: Patient 4 – Isotypkontrolle PE.....	47
Abbildung 3.5 Patient 4 – Anti-CD105.....	47
Abbildung 3.6 Patient 4 – Anti-CD90	47
Abbildung 3.7 Patient 4 – Anti-CD73	48
Abbildung 3.8 Patient 4 – Anti-STRO-1	48
Abbildung 3.9 Patient 4 – Anti-CD133.....	48
Abbildung 3.10 Patient 4 – Anti-CD271	48
Abbildung 3.11 Patient 4 – Anti-CD45.....	49
Abbildung 3.12 Patient 5 und 6 – Leermessung SSC/FSC	49
Abbildung 3.13 Patient 5 und 6 – Isotypkontrolle FITC.....	49
Abbildung 3.14 Patient 5 und 6 – Isotypkontrolle PE.....	50
Abbildung 3.15 Patient 5 – Anti-CD105.....	50
Abbildung 3.16 Patient 5 – Anti-CD90	50
Abbildung 3.17 Patient 5 – Anti-CD73.....	51

Abbildung 3.18	Patient 5 – Anti-STRO-1	51
Abbildung 3.19	Patient 5 – Anti-CD133	51
Abbildung 3.20	Patient 5 – Anti-CD271	51
Abbildung 3.21	Patient 5 – Anti-CD45	52
Abbildung 3.22	Patient 6 – Anti-CD105	52
Abbildung 3.23	Patient 6 – Anti-CD90	52
Abbildung 3.24	Patient 6 – Anti-CD73	53
Abbildung 3.25	Patient 6 – Anti-STRO-1	53
Abbildung 3.26	Patient 6 – Anti-CD133	53
Abbildung 3.27	Patient 6 – Anti-CD271	53
Abbildung 3.28	Patient 6 – Anti-CD45	54
Abbildung 3.29	Patient 7 – Leermessung SSC/FSC	54
Abbildung 3.30	Patient 7 – Isotypkontrolle FITC.....	54
Abbildung 3.31	Patient 7 – Isotypkontrolle PE.....	55
Abbildung 3.32	Patient 7 – Anti-CD105.....	55
Abbildung 3.33	Patient 7 – Anti-CD90	55
Abbildung 3.34	Patient 7 – Anti-CD73	56
Abbildung 3.35	Patient 7 – Anti-STRO-1	56
Abbildung 3.36	Patient 7 – Anti-CD133.....	56
Abbildung 3.37	Patient 7 – Anti-CD271	56
Abbildung 3.38	Patient 7 – Anti-CD45	57
Abbildung 3.39	Proliferationsvergleich der PCI-13-Zellen zwischen Kokultur- und Kontrollgruppe	58
Abbildung 3.40	Proliferationsvergleich der humanen mesenchymalen Stammzellen zwischen Kokultur- und Kontrollgruppe.....	59
Abbildung 3.41	Genexpressionsvergleich (relative Quantifizierung) von WNT3 zwischen Kokultur- und Kontrollgruppe	61
Abbildung 3.42	Genexpressionsvergleich (relative Quantifizierung) von MMP14 zwischen Kokultur- und Kontrollgruppe	62
Abbildung 3.43	Genexpressionsvergleich (relative Quantifizierung) von CTNNB1 zwischen Kokultur- und Kontrollgruppe	63
Abbildung 3.44	Genexpressionsvergleich (relative Quantifizierung) von CDH1 zwischen Kokultur- und Kontrollgruppe.....	64

Abbildung 3.45 Genexpressionsvergleich (relative Quantifizierung) von
CTSB zwischen Kokultur- und Kontrollgruppe65

Abbildung 3.46 Genexpressionsvergleich (relative Quantifizierung) von
ETS1 zwischen Kokultur- und Kontrollgruppe66

Tabellenverzeichnis

2 Material und Methoden

Tabelle 2.1: Spenderpatienten für Knochenmarkstromazellen26

Tabelle 2.2: Kulturdauer der Knochenmarkstromazellen bis zur
Semikonfluenz27

Tabelle 2.3: Kulturansätze30

Tabelle 2.4: Reverse Transkription35

Tabelle 2.5: Oligonukleotidsequenzen der verwendeten Primer.....36

Tabelle 2.6: PCR-Programm zur Temperaturetablierung37

Tabelle 2.7: PCR-Programm zur Verifikation der
konzentrationsabhängigen Spezifität38

Tabelle 2.8: Plattendesign zur Durchführung der qPCR-Versuche.....40

Tabelle 2.9: PCR-Programm zur cDNA-Quantifikation40

1 Einleitung

1.1 Plattenepithelkarzinome im Kopf-Hals-Bereich

Karzinome im Kopf-Hals-Bereich sind die am achthäufigsten auftretenden malignen Tumoren des Menschen weltweit mit 390.000 neu registrierten Fällen im Jahr 2000 (STEWART und KLEIHUES 2003). In den USA treten jährlich ungefähr 30.000 neue Kopf-Hals-Tumorerkrankungen mit ca. 8.000 assoziierten Todesfällen auf (JEMAL et al. 2007, JEMAL et al. 2006, JEMAL et al. 2005).

Plattenepithelkarzinome (Head and neck squamous cell carcinomas, HNSCC) bilden dabei mit über 90% aller Kopf-Hals-Karzinome den größten Anteil (METELMANN und KADUK 2007). HNSCC weisen allgemein vorrangig eine Metastasierung in die regionären Lymphknoten auf, bevor es zur Fernmetastasierung in Lunge und Leber kommt (METELMANN und KADUK 2007). Fasst man alle oropharyngealen Lokalisationen neu aufgetretener HNSCC zusammen, so haben sich die 5-Jahres-Überlebensraten bei derartigen Erkrankungen trotz stetiger Weiterentwicklung der multimodalen Therapiekonzepte und chirurgisch-rekonstruktiven Therapiemöglichkeiten in den letzten 40 Jahren kaum verbessert (CARVALHO et al. 2004). Die Erkrankung führt zudem zu einer deutlichen Reduktion der individuellen Lebensqualität (SCHLIEPHAKE und JAMIL 2002).

Ein aktueller Forschungsschwerpunkt liegt daher in der Aufdeckung molekularbiologischer Mechanismen, die bei Entstehung und Progression von Karzinomen im Oropharynxbereich möglicherweise eine entscheidende Rolle spielen und Wege für zukünftige zielgerichtete Therapieverfahren weisen können.

1.2 Interaktionen von Tumorzellen und Umgebungsgewebe

Von besonderem Interesse sind dabei die Interaktionen des Tumorgewebes mit seiner unmittelbaren Umgebung, dem Tumorstroma, durch die wesentliche Tumoreigenschaften wie Invasivität oder Angiogenese (DE WEVER und MAREEL 2003) beeinflusst werden und die damit einen entscheidenden Einfluss auf den Verlauf einer Tumorerkrankung haben. Dem Tumorstroma scheinen wichtige Funktionen bezüglich der Regulation verschiedener Tumorstromawachstums-, Invasions-, und Metastasierungsprozesse zuzukommen (DIREKZE und ALISON 2006).

Hauptbestandteil des Tumorstromas sind Zellen mesenchymalen Ursprungs, wie Fibroblasten und Myofibroblasten, die extrazelluläre Matrix synthetisieren und damit strukturgebend wirken, gleichzeitig aber auch auf unterschiedliche Weise in parakrine Interaktion mit dem benachbarten Tumorgewebe treten (DE WEVER und MAREEL 2003).

In experimentellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Proliferation von humanen Mammakarzinom-Zelllinien (MCF-7/MCF-10) durch Kokultur mit humanen mesenchymalen Stromazellen (hMSC) abnimmt (FIERRO et al. 2004, HOMBAUER und MINGUELL 2000). Ein ähnlicher Effekt lässt sich durch Exposition der Tumorzellen gegenüber VEGF und IL-7 erzielen (FIERRO et al. 2004). In neueren Untersuchungen kommt es bei hepatozellulären Karzinomen *in vitro* und im Tiermodell zu einer Abnahme der Zellproliferation (QIAO et al. 2008). Gleiches gilt in Kultur für Zelllinien der myeloischen Leukämie (ZHU et al. 2009).

Verschiedene „Cross-Talk“-Mechanismen zwischen Tumor- und Tumorstromazellen können über Zytokine, wie z.B. den Wachstumsfaktor TGF- β , erfolgen (DERYNCK et al. 2001), der als Mediator für definierte Signalkaskaden dient. Hier nimmt der Wnt- β -Catenin-Pathway eine Schlüsselrolle ein (NISHITA et al. 2000), da er sowohl im mesenchymalen als auch im epithelialen Gewebe essentielle Funktionen übernimmt (BLANPAIN et al. 2007, DE BOER et al. 2004). Zellen maligner epithelialer Tumoren und stromale mesenchymale Zellen weisen demnach gemeinsame Signaltransduktionswege auf.

Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass es im Verlauf der Tumorentwicklung zum Prozess der epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) kommt. Hierbei verlieren Karzinomzellen ihren epithelialen Phänotyp, entwickeln Motilität und erhalten damit die notwendigen Eigenschaften für Invasivität und Metastasierung (ACLOQUE et al. 2009, YANG J und WEINBERG 2008). Dieser Transitionsvorgang ist jedoch nicht tumorspezifisch, sondern tritt auch physiologischerweise zu verschiedenen Zeitpunkten der Embryogenese auf, erstmalig während der Gastrulation (KIMELMAN 2006, VIEBAHN et al. 1995). Im Fall der Tumorgenese existieren verschiedene Erkenntnisse über die Rolle der EMT während der Tumorinvasion und –metastasierung. Bezüglich des Zellverhaltens zeigen sich Parallelen zur Embryonalentwicklung. So deuten z.B. verschiedene Beobachtungen auf eine Reversibilität der EMT („MET“) nach Metastasierung hin

(FODDE und BRABLETZ 2007, ROSIVATZ et al. 2002, TARIN et al. 2005, THOMPSON et al. 2005, YANG J et al. 2004). Als Marker für die epithelial-mesenchymale Transition gilt der Verlust von Zell-Zell-Kontakten im Tumorgewebe, der mit einer Expressionsreduktion von E-Cadherin als membranständigem Zelladhäsionsmolekül einhergeht (CHANG et al. 2007). Bei oralen Plattenepithelkarzinomzellen wurde eine Korrelation von reduzierter E-Cadherin-Expression mit Tumordifferenzierung, Invasivität und Auftreten von Lymphknotenmetastasen beobachtet (BAGUTTI et al. 1998, KUDO et al. 2004, MATTIJSEN et al. 1993, SHINOHARA et al. 1998, THOMAS und SPEIGHT 2001). Die autokrine und parakrine Interaktion von an der EMT beteiligten Zytokinen und ihren Rezeptoren, entsprechenden Second Messengers und Transkriptionsfaktoren stellt ein komplexes regulatives System dar, das bislang nur ansatzweise erforscht ist. Neben verschiedenen Wachstumsfaktoren wie TGF- β , EGF, HGF, IGF und PDGF stellt Wnt einen wichtigen Liganden dar (CHANG et al. 2007). Intrazellulär kommt es über Komponenten des Wnt-Pathways, insbesondere über β -Catenin, zu einer Interaktion mit dem bereits oben beschriebenen E-Cadherin (SCHMALHOFER et al. 2009).

Für die Entwicklung der Zellinvasivität werden Matrix-Metalloproteinasen, hier insbesondere die membranständige MMP-14 (ROSENTHAL und MATRISIAN 2006), und weitere lytische Enzyme, wie z.B. Cathepsin B, aktiviert (NOMURA und KATUNUMA 2005). Dem Transkriptionsfaktor Ets-1 scheint hier ebenfalls eine wichtige Rolle zuzukommen, da er die Genexpression verschiedener invasivitätssteigernder Enzyme, vor allem von Matrix-Metalloproteinasen, auf Transkriptionsebene reguliert (TAKI et al. 2006).

1.3 Die oropharyngeale Plattenepithelkarzinomzelllinie PCI-13

Zur Evaluation von Charakteristika oropharyngealer Plattenepithelkarzinomzellen im *in-vitro*-Modell der Zellkultur wurden verschiedene Tumorzelllinien sowohl aus Primärtumoren als auch aus Metastasen etabliert, die bereits für vielfältige Untersuchungen herangezogen wurden (LIN et al. 2007). Als immortalisierte Zelllinien stellen sie ein wichtiges Mittel zur präklinischen Erforschung molekularer,

biochemischer, genetischer und immunologischer Eigenschaften von Tumorzellen dar.

Die der Zelllinie PCI-13 zugrundeliegenden Zellen wurde 1989 aus einem Plattenepithelkarzinom (Primärtumor) der oralen Mukosa im Bereich des Trigonum retromandibulare bei einem 50-jährigen männlichen Patienten gewonnen. Das Tumorstadium nach UICC war T₃N₁M₀ (HEO et al. 1989, SNYDERMAN et al. 1994). PCI-13-Zellen wurden als Modellzellen für das Verhalten von oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen bereits mehrfach *in vitro* eingesetzt, unter anderem zur Untersuchung der Interaktion von oralen Tumorzellen mit T-Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (WHITESIDE et al. 1998) oder zur Beurteilung des Einflusses der Expression von humanem Interleukin-Rezeptor Alpha auf die Eigenschaften von Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (KUHN et al. 2003).

1.4 Humane mesenchymale Stromazellen

Das Konzept der humanen mesenchymalen Stromazelle (hMSC) wurde bereits vor 40 Jahren mit der Feststellung entwickelt, dass es bei Aussaat von Knochenmarkstromazellen zu Koloniebildungen mit fibroblastischem Charakter kommt (FRIEDENSTEIN et al. 1970). Der Anteil dieser Kolonien ist, gemessen am Gesamtanteil der mononukleären Knochenmarkzellen, mit 0,01% bis 0,001% recht klein (CASTRO-MALASPINA et al. 1980) und damit deutlich niedriger als der Anteil der hämatopoetischen Stamm- und Progenitorzellen mit Anteilen von ca. 1% (CIVIN et al. 1996). Nachdem es möglich geworden war, über spezifische Marker, vor allem CD73, CD90 und CD105, mesenchymale Stromazellen zu charakterisieren (HAASTERS et al. 2009, PITTENGER et al. 1999), konnten diese für *in-vitro*-Studien unkompliziert isoliert und expandiert werden.

Die Hauptvorkommen der hMSC befinden sich nach derzeitigem Kenntnisstand vor allem im Knochenmark (RALLAPALLI et al. 2009), das zum Zweck der Zellgewinnung z.B. im Bereich des Beckenkamms operativ leicht erreichbar ist. Mesenchymale Stammzellen wurden ebenfalls bereits aus Nabelschnurblut (ERICES et al. 2000), Fettgewebe (ZUK et al. 2001) und weiteren Geweben (BARRY und MURPHY 2004, RALLAPALLI et al. 2009) isoliert.

Populationen mesenchymaler Stromazellen des Knochenmarks besitzen als pluripotente oder multipotente Zellen die Fähigkeit zur Differenzierung in Knochen-, Knorpel-, Muskel-, Sehnen-, Fett- und Stromagewebe und tragen zur Regeneration der jeweiligen Gewebetypen bei (PITTENGER et al. 1999).

Für ihren Einsatz zur endogenen Organregeneration durch Gewebeersatz können hMSC migratorische und invasive Fähigkeiten entwickeln, um sich aus ihrer Stammzellnische zu entfernen und an den Wirkungsort zu gelangen (KORBLING und ESTROV 2003). Sowohl an der Steuerung dieser Eigenschaften als auch an der Regulation der Proliferationsrate ist der Wnt- β -Catenin-Pathway, hier insbesondere über Wnt-3, beteiligt (NETH et al. 2006). Es konnte nachgewiesen werden, dass Gewebshypoxie, die in der Umgebung maligner Tumoren häufig zu finden ist, die Migration von hMSC anregt. Gleichzeitig wird über die Synthese der Matrix-Metalloproteinase MMP-14 die Bildung von Kapillaren unterstützt (ANNABI et al. 2003).

Eine weitere wesentliche Eigenschaft mesenchymaler Stromazellen ist die Fähigkeit, heterotypische Zell-Zell-Kontakte auszubilden und somit auch in Interaktion mit epithelialen Zellen zu treten, wie *in vitro* am Beispiel der Interaktion mit Mammakarzinomzellen gezeigt werden konnte (HOMBAUER und MINGUELL 2000). Interessant ist diese Eigenschaft vor allem zur Erklärung der Bildung von Mikrometastasen maligner Tumoren: Humane mesenchymale Stromazellen scheinen ein attraktiver Zielzelltyp für mikrometastatische Mammakarzinomzellen zu sein (HOMBAUER und MINGUELL 2000). Untermuert wird diese Annahme durch *in vitro*-Ergebnisse, die zeigen, dass Knochenmarkstromazellen von Patienten mit Mammakarzinom in Kokultur ein anderes Interaktionsmuster mit den Tumorzellen aufweisen als die entsprechenden Zellen aus dem Knochenmark gesunder Spender (NICOLA et al. 2003).

1.5 Mediatoren der Tumor-Stroma-Interaktion

1.5.1 Wingless-type MMTV integration site family, member 3 (Wnt-3)

Wnt-3 gehört als Zytokin zur Wnt-Familie der Liganden für den kanonischen Wnt- β -Catenin-Pathway. Die Abkürzung „Wnt“ entstand aus der Kombination von „Wingless“ und „Int-1“, als sich herausstellte, dass es sich bei beiden Homologen um

ein Produkt des gleichen Gens handelte (RIJSEWIJK et al. 1987). Die Bezeichnung „Wingless-type“ stammt von Beobachtungen an der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, bei der Mutationen im Wingless-Gen zu einer flügellosen Variante der Fliegen führen. Unter der ursprünglichen Bezeichnung „Int-1“ wurde ein murines Onkogen geführt (NUSSE et al. 1984).

Wnt bildet den Ausgangspunkt verschiedener Signaltransduktionswege, von denen der kanonische Wnt- β -Catenin-Pathway im Zusammenhang mit wichtigen Regulationsmechanismen der Zelldifferenzierung gegenwärtig die größte Bedeutung besitzt (FODDE und BRABLETZ 2007, REYA und CLEVERS 2005). Bislang bekannte Funktionen des Wnt- β -Catenin-Pathways *in vivo* sind Differenzierungsvorgänge während der Embryonalentwicklung wie z.B. die Festlegung der Körperachse (MARIKAWA 2006). Eine homozygote Mutation von Wnt-3 beim Menschen führt zur Tetra-Amelie (NIEMANN et al. 2004), was darauf hindeutet, dass Wnt-3 bereits in sehr frühen Phasen der embryonalen Extremitätenentwicklung sowie in der kraniofazialen und urogenitalen Morphogenese wichtige Funktionen erfüllt. Verschiedene Einflüsse auf die Karzinogenese wurden ebenfalls bereits beobachtet (MOON et al. 2004, REYA und CLEVERS 2005), wie z.B. die Beteiligung des kanonischen Wnt-Pathways bei der zum Kolonkarzinom führenden Adenomatösen Polyposis Coli, die auf einem hereditären Defekt des APC-Gens beruht (RUBINFELD et al. 1996).

Weitere interessante Aspekte ergeben sich aus der Funktion des Wnt-Pathways in Geweben, die einer ständigen Regeneration über Stamm- und Progenitorzellen unterliegen, wie z.B. Darmepithelien (BATLLE et al. 2002, KORINEK et al. 1998, PINTO et al. 2003), Haarfollikel (DASGUPTA und FUCHS 1999) oder hämatopoetische Zellen (REYA und CLEVERS 2005). Da Wnt dabei die Differenzierung der jeweiligen Stamm- und Progenitorzelllinien durch autokrine und parakrine Wirkung auf seinen Rezeptor unterdrückt, ihren multi- bzw. pluripotenten Charakter bewahrt und sie vor Apoptose schützt, deutet viel darauf hin, dass es auch als wichtiger Faktor in der Entwicklung maligner Tumoren angesehen werden kann (MALANCHI und HUELSEN 2009, MOON et al. 2004, POLAKIS 2007). Wnt scheint hier sogar entscheidende Einflüsse auszuüben: So wurde z.B. bei Mammakarzinom-Zelllinien eine deutlich erhöhte Expression von Wnt-1 und Wnt-3 nachgewiesen (KATOH 2002, KATOH 2003). Dies wurde auch für Plattenepithelkarzinomzellen des

Kopf-Hals-Bereichs festgestellt, bei denen die Aktivierung des Wnt- β -Catenin-Pathways antiapoptotisch und invasivitätsfördernd wirkt (YANG F et al. 2006). Interessanterweise besitzt Wnt auch Einflüsse auf das Migrations- und Invasionsverhalten sowie die Proliferation und Differenzierung humaner mesenchymaler Stromazellen, wodurch sich neue Aspekte im Bereich der Tumor-Stroma-Interaktion und epithelial-mesenchymalen Transformation ergeben (DE BOER et al. 2004, NETH et al. 2007).

1.5.2 β -Catenin

Die Funktion von β -Catenin in epithelialen Zellen gliedert sich in zwei Bereiche, abhängig von seiner Lokalisation: Zum einen ist β -Catenin ein wichtiger Bestandteil der Zell-Zell-Verbindungen über Zonulae adhaerentes. E-Cadherin wird hier über β -Catenin zusammen mit α -Catenin mit dem Actin-Zytoskelett verbunden (SCHMALHOFER et al. 2009). Zum anderen wirkt β -Catenin als wichtigster Second Messenger des kanonischen Wnt- β -Catenin-Pathways (NETH et al. 2007). Befindet sich kein Ligand am Wnt-Rezeptor (Frizzled-Rezeptor+LRP-Korezeptor), so wird das zytosolische β -Catenin über einen „Destruktionskomplex“, bestehend aus Axin, APC-Protein und Glycogen-Synthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) phosphoryliert und damit der Degradation durch Proteasomen zugeführt (KIMELMAN und XU 2006). Kommt es zu einer Aktivierung der Rezeptoren über Wnt (HE et al. 2004), führt dies über mehrere Zwischenschritte zu einer Relokation von Axin aus dem Destruktionskomplex in die Zellmembran. β -Catenin akkumuliert im Zytoplasma und transloziert in den Zellkern, wo es einen Transkriptionsfaktorkomplex mit Proteinen der TCF-/LEF-Familie bildet. Dieser bindet an Promotoren Wnt-abhängiger Gene und aktiviert deren Transkription (CADIGAN und NUSSE 1997). An der Progression maligner Tumoren ist β -Catenin somit zum einen über die Differenzierungssteuerung mittels Wnt-Pathway und zum anderen über die Interaktion mit Zelladhäsionsmolekülen bei der Metastasierung, hier insbesondere mit E-Cadherin im Bereich der Adhaerens-Junctions, beteiligt.

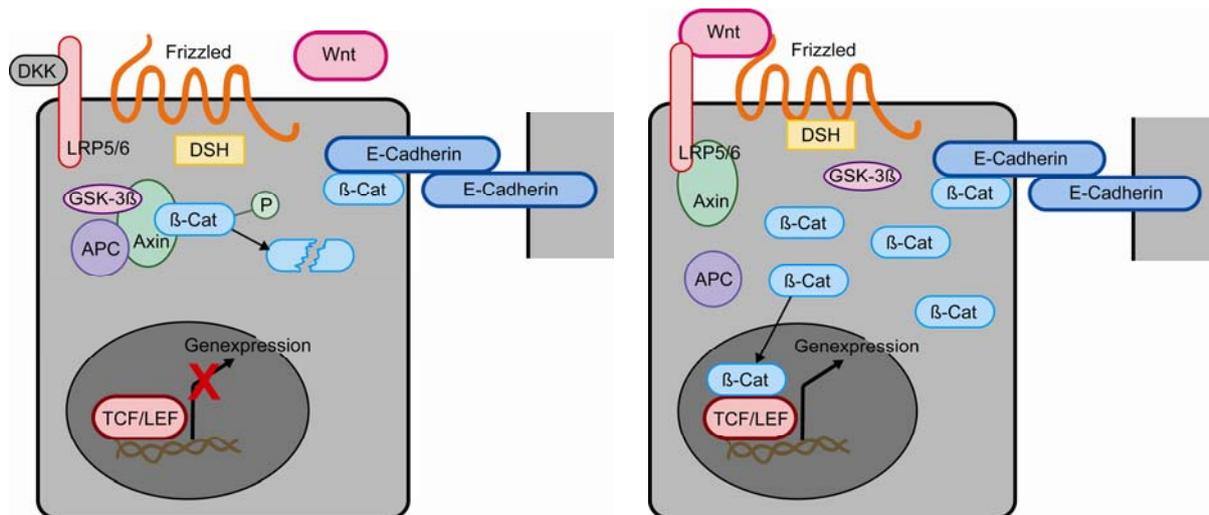


Abb 1.1: Der kanonische Wnt-Signaltransduktionsweg. Links: Bei Abwesenheit aktiver Wnt-Liganden („Off-Status“) wird β -Catenin intrazellulär in einem Komplex aus Axin, APC und GSK-3 β fixiert, phosphoryliert und der Degradation zugeführt. Wnt-Zielgene werden nicht exprimiert. Rechts: Bindet Wnt an den Frizzled-Rezeptor („On-Status“), dann wird β -Catenin vom Degradationskomplex abgekoppelt und gelangt in den Zellkern, wo es an Transkriptionsfaktoren der TCF/LEF-Familie bindet. Wnt-abhängige Gene werden so transkribiert. E-Cadherin ist als β -Catenin-assoziiertes Zell-Zell-Adhäsionsmolekül dargestellt. Abkürzungen: APC: Adenomatöse Polyposis Coli, β -Cat: β -Catenin, DKK: Dickkopf, DSH: Dishevelled, GSK-3 β : Glycogen-Synthase-Kinase-3 β , LRP5/6: Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 5/6, P: Phosphat, TCF/LEF: T-Cell-Factor/Lymphoid Enhancer Factor

1.5.3 Matrix-Metalloproteinase 14 (MMP-14)

Unter anderem gesteuert durch Komponenten des Wnt-Pathways besitzen Matrix-Metalloproteinasen Schlüsselfunktionen im Vorgang der Invasion und Metastasierung bei Tumoren im Kopf-Hals-Bereich, indem sie zur Degradation des umgebenden Stromas beitragen und damit den Weg für Zellmigration und Angiogenese ebnen (ROSENTHAL und MATRISIAN 2006).

MMP-14 (auch: Membrane Type 1-Matrix Metalloproteinase = MT1-MMP) scheint als membranständiges Enzym eine Schlüsselrolle einzunehmen. MMP-14 gehört zur Familie der zinkabhängigen Endopeptidasen und ist in der Lage, die Kollagene I-III neben Gelatin, Fibronectin und Laminin, weiterhin proMMP-2 und proMMP-13, proteolytisch zu spalten.

Die Expression erfolgt sowohl in Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs als auch in den assoziierten Fibroblasten des Tumorstromas (KURAHARA et al. 1999, ROSENTHAL et al. 1999, ROSENTHAL et al. 2004, TOKUMARU et al. 2000). *In vitro* wurde belegt, dass MMP-14 für das invasive Tumorwachstum von

essentieller Notwendigkeit ist, da es durch seine proteolytischen Eigenschaften die Invasion ins Interstitium ermöglicht. Gleichzeitig begünstigt MMP-14 als tumoreigener Wachstumsfaktor die invasionstaugliche Tumorzellmorphologie (HOTARY et al. 2003). Durch die Aktivierung von MMP-2 verfügt MMP-14 über zusätzliche proteolytische Aktivität (ROSENTHAL und MATRISIAN 2006).

Das Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs war eine der ersten Tumorentitäten, in denen die Expression von MMP-14 nachgewiesen wurde (OKADA et al. 1995), sie ist in 75%-100% aller Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome nachweisbar (BIRKEDAL-HANSEN et al. 2000, KURAHARA et al. 1999).

Die Progredienz maligner Tumoren erfordert neben der Proteolyse des Umgebungsgewebes eine Angiogenese im umgebenden Stroma, während der eine Kapillarneubildung aus bereits existierenden Gefäßen erfolgt. MMP-14 erfüllt hier mehrere Schlüsselrollen im Bereich der Endothelzellaktivierung und -migration, der Bildung neuer kapillärer Strukturen und der Rekrutierung von notwendigen Zellen zum Zweck des Gefäßremodelings (GENIS et al. 2006).

Die Expression von MMP-14 wird in Kultur humaner mesenchymaler Stromazellen unter hypoxischen Bedingungen aktiviert (ANNABI et al. 2003). Möglicherweise besitzt die Expression von MMP-14 auch *in vivo* bei Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs einen signifikanten Einfluss auf das Metastasierungsverhalten (WIEGAND et al. 2005).

Auch im Entwicklungsverlauf mesenchymaler Stromazellen, vor allem im Migrationsverhalten, erfüllt MMP-14 wesentliche Aufgaben. So trägt die konstitutive Expression von MMP-14 *in vitro* zur Fähigkeit der Zellen bei, Basalmembranen zu durchwandern (RIES et al. 2007).

Interessante neue Aspekte könnten sich aus der Untersuchung gegenseitiger Einflüsse von Tumorzellen und Tumorstroma über MMP-14 ergeben, da hier ein gemeinsamer Mediator zwischen beiden Zellarten in Wechselwirkung tritt.

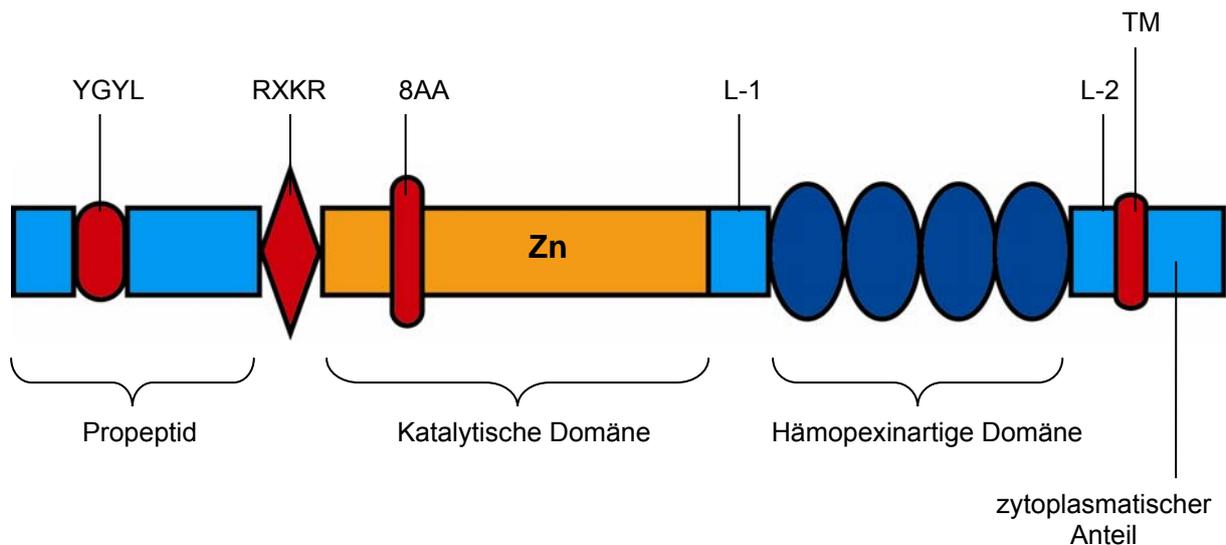


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Struktur von MMP-14 in der inaktiven proMMP-14-Form: Das Protein besteht aus einem Propeptid, einer zinkhaltigen katalytischen Domäne, der Linker-Sequenz 1 (L-1), einer Hämapexin-ähnlichen Domäne aus 4 gleichen Untereinheiten, der Linker-Sequenz 2 (L-2) am N-Terminus und einer Transmembrandomäne (TM) als Verbindungsglied zum zyttoplasmatischen Anteil. Innerhalb der Domänen befinden sich charakteristische Zwischenglieder: YGYL und RXKR (Furin-Sequenz) und die 8-Aminosäuren-Sequenz (8AA). Die Aktivierung der inaktiven Vorstufe proMMP-14 erfolgt durch Abspaltung des Propeptids durch Propeptidkonvertasen.

1.5.4 E-Cadherin

Für die Zell-Zell-Verbindung von epithelialen Zellen mittels Zonulae adhaerentes besitzt E-Cadherin als dominantester Vertreter der Cadherin-Familie von calciumbindenden membranständigen Proteinen eine Schlüsselrolle (GUILFORD 1999). Auf der zytoplasmatischen Seite besteht eine Verbindung zum Actin-Zytoskelett über Catenine, vor allem über das schon beschriebene β -Catenin (OZAWA und KEMLER 1992, OZAWA et al. 1989). In physiologischen Epithelzellschichten wird über das in der basolateralen Membran in Zonulae adhaerentes gelegene E-Cadherin die apikobasale Polarität definiert. Weiterhin vermittelt E-Cadherin über die Verbindung mit β -Catenin nach intrazellulär an das Aktin-Zytoskelett die nötige Stabilität (PEREZ-MORENO und FUCHS 2006, PEREZ-MORENO et al. 2003).

Für die Tumorgenese und Malignitätsentwicklung sind die Funktionen von E-Cadherin bedeutsam. Im Mausmodell wurde für Beta-Zell-Tumoren des Pankreas nachgewiesen, dass der Verlust von E-Cadherin eine der Voraussetzungen für die

Progression von Adenomen zu invasiven Karzinomen darstellt (PERL et al. 1998). Weiterhin wurde bei menschlichen Kolonkarzinomen eine umgekehrte Korrelation zwischen E-Cadherin-Expression und Überlebensrate der Tumorpatienten beobachtet (BIRCHMEIER und BEHRENS 1994). Untersuchungen an Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs zeigen, dass eine Hypermethylierung des E-Cadherin-Gens CDH1 als epigenetische Alteration häufiger bei Patienten ohne starken Nikotinkonsum als Risikofaktor zu beobachten ist (MARSIT et al. 2008). Dies deutet darauf hin, dass die E-Cadherin-Hypermethylierung als prognostischer Faktor gewertet werden könnte. Die reduzierte Expression von E-Cadherin korreliert andererseits mit einer verbesserten Ansprechrate von supraglottischen oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen auf primäre Radiotherapie (ERIKSEN et al. 2005). Die E-Cadherin-Expression von Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx kann weiterhin als Gradingmarker herangezogen werden und korreliert negativ mit dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung (ERIKSEN et al. 2004, RODRIGO et al. 2002).

Aggressive Karzinome zeigen verschiedene Dysregulationen der E-Cadherin-Expression und konsekutive Beeinträchtigungen der Zell-Zell-Adhäsion mittels Zonulae adhaerentes, teilweise verursacht durch genetische Alterationen, epigenetische Inaktivierungen oder verminderte Transkription von CDH1 (SCHMALHOFER et al. 2009). Weiterhin ist sowohl bei oropharyngealen Plattenepithelkarzinomen als auch bei dermalen Fibroblasten eine induktive Wirkung von E-Cadherin auf Matrix-Metalloproteinasen bekannt (BAIR et al. 2001); zusätzlich korreliert eine hohe MMP/E-Cadherin-Rate mit einer schlechten Prognose bei Bronchialkarzinomen (HERBST et al. 2000).

Vor allem in Lymphknotenmetastasen und gering differenzierten Plattenepithelkarzinomen sinkt der Anteil an membranständigem E-Cadherin (ANDREWS et al. 1997, RODRIGO et al. 2002), wodurch sich eine Reduktion der Zell-Zell-Adhäsion und der interzellulären Kommunikation über Gap-Junctions erklären lässt (JONGEN et al. 1991). Die verminderte Expression von E-Cadherin aktiviert darüber hinaus für die Tumorinvasivität wichtige Integrine (VON SCHLIPPE et al. 2000).

Interessant sind Erkenntnisse, nach denen im Rahmen der epithelial-mesenchymalen Transition eine Suppression der E-Cadherin-Expression in den metastasierenden Zellen erfolgt. Im Zielgewebe erfolgt zur Etablierung neuer Zell-Zell-Kontakte eine erneute Expression von E-Cadherin und eine Reversion des Zellphänotyps von mesenchymal nach epithelial (WELLS et al. 2008).

Wenig erforscht sind bislang die Einflüsse mesenchymaler Stromazellen auf die Expression von E-Cadherin bei epithelialen Tumorzellen, die interessante Anhaltspunkte für das Interaktionsmuster des Tumorgewebes mit seiner stromalen Umgebung liefern könnten.

1.5.5 Cathepsin B

Cathepsin B ist eine Cysteinprotease aus der Papain-Familie, die in physiologischen Zellen normalerweise in Lysosomen auftritt und primär mit dem intralysosomalen Proteinstoffwechsel in Verbindung gebracht wurde (MORT und BUTTLE 1997). Als vesikuläres Enzym wird Cathepsin B zunächst als Präprocathepsin B im rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert und cotranslational glykolysiert. Nach weiterer Modifikation und Phosphorylierung wird Procathepsin B als inaktives Enzym in normalen Zellen zu <5% sezerniert und zu >95% nach endolysosomal transportiert, wo es in die ein- oder zweikettige aktive Form Cathepsin B umgewandelt wird (MACH et al. 1992). Abhängig vom umgebenden pH-Wert kann Cathepsin B durch Konformationsänderung entweder als Endo- oder Exopeptidase wirken (ROSHY et al. 2003).

Cathepsin B zeigt bei verschiedenen pathologischen Gewebeprozessen Auffälligkeiten, wie bei Arthritiden (LANG et al. 2000), aber auch bei malignen Tumoren, wo vieles darauf hindeutet, dass es durch seine Sekretion oder Assoziation mit der Zelloberfläche an der Degradation der extrazellulären Matrix beteiligt ist (FROSCH et al. 1999, SLOANE et al. 1994). Die Expression von Cathepsin B wird dabei teils erheblich erhöht (FRÖHLICH et al. 2001, LAH et al. 1992, SLOANE et al. 1994), wobei nachgewiesen werden konnte, dass hohe Expressionsraten bei mehreren Tumorentitäten, wie beispielsweise bei Kolon- oder Ovarialkarzinomen, mit einer schlechten Prognose für den Patienten korrelieren (CAMPO et al. 1994, JOYCE und HANAHAN 2004, SCORILAS et al. 2002).

Gleiches gilt für Mamma- und Prostatakarzinome, bei denen Cathepsin B zusammen mit Cathepsin-L als Marker für die Rezidivwahrscheinlichkeit eingesetzt werden kann (NOMURA und KATUNUMA 2005).

Auch beim Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs konnten signifikant höhere Konzentrationen von Cathepsin B im Tumorgewebe gegenüber den entsprechenden regulären Plattenepithelien nachgewiesen werden (STROJAN et al. 2000).

Die Cathepsin-B-Expression ist nicht immer im gesamten Tumorgewebe erhöht, sondern hauptsächlich in Tumorzellen des invasiv wachsenden Randbereichs, also in Zellen, bei denen Kontakt zur extrazellulären Matrix besteht (DEMCHIK et al. 1999, SAMENI et al. 1995, SINHA et al. 1993). Ob ein Kontakt zu extrazellulären Matrixproteinen, wie z.B. Kollagen I, oder eine Beeinflussung durch von Stromazellen sezernierte Mediatoren für die erhöhte Expression ursächlich ist, konnte bislang nicht abschließend geklärt werden.

In Knockout-Mausmodellen konnte nachgewiesen werden, dass bei Mutation oder eingeschränkter Expression des Cathepsin-B-Gens CTSB bei Pankreastumoren ein deutlich langsames Tumorstadium mit eingeschränkter Angiogenese vorliegt (GOICHEVA et al. 2006). Bei oralen Plattenepithelkarzinomen fördert ein hypoxisches Milieu die Cathepsin-B-Expression *in vitro* ähnlich wie die Expression von MMP-14. Die gesteigerte Cathepsin-B-Expression fördert wiederum die Invasivität der Tumorzellen im Matrigel-Assay (WICKRAMASINGHE et al. 2005a, WICKRAMASINGHE et al. 2005b).

Wenig erforscht sind bislang die Wechselwirkungen von Plattenepithelkarzinomzellen des Oropharynx über Cathepsin B mit ihrer Stromaumgebung und die daraus resultierenden Einflüsse auf ihre Proliferation und Invasivität. Bekannt ist aus *in-vitro*-Daten, dass gingivale Fibroblasten unter proinflammatorischen Stimuli über Interleukine eine erhöhte Cathepsin-B-Expression zeigen (YAMAGUCHI et al. 2008). Wechselseitige Einflüsse von Karzinomzellen des Oropharynx und stromalen Zellen mesenchymalen Ursprungs sind daher sehr wahrscheinlich.

1.5.6 *V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (Ets-1)*

Das Ets-1-Gen wurde zunächst als ein zelluläres Protoonkogen des retroviralen v-ets-Onkogens aus dem aviären Leukämie-Retrovirus E-26 charakterisiert, das eine Erythroleukämie bei Hühnern hervorruft (LEPRINCE et al. 1983, WATSON et al. 1985). In weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass es sich bei Ets-1 um den Prototyp einer neuen Transkriptionsfaktorfamilie, der Ets-Familie, handelt, die inzwischen ca. 30 unterschiedliche Faktoren umfasst (OIKAWA 2004, SHARROCKS 2001). Gemeinsam ist allen, dass sie eine spezifische DNA-bindende Domäne, die Ets-Domäne, besitzen, die aus 80 Aminosäuren mit vier Tryptophan-Repeats besteht (WASYLYK et al. 1993) und die an doppelsträngige DNA mit einer spezifischen Kernsequenz (GGAA/T) und verschiedenen flankierenden Sequenzen bindet (OIKAWA 2004). Die DNA-Bindungsspezifität wird dabei jeweils zum einen durch die flankierenden Sequenzen determiniert, zum anderen durch weitere transkriptionsregulierende Partnermoleküle gesteuert (HOLLENHORST et al. 2004, WASYLYK et al. 1993).

Transkriptionsfaktoren der Ets-Familie werden viele unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Zell- und Gewebetypen zugeschrieben, so unter anderem im Bereich der Proliferationregulation, der Apoptose oder der Steuerung der Matrixdegradation (HAHNE et al. 2008). Innerhalb der Ets-Familie wurde Ets-1 bereits ausführlich untersucht. Die Expression von Ets-1 ist in einer Vielzahl von Zelltypen beobachtet worden, bei denen eine Beteiligung sowohl an physiologischen als auch an pathologischen Prozessen auftritt. Ets-1 erfüllt bereits wichtige Funktionen während der Embryonalentwicklung, unter anderem im Bereich der Angiogenese (WERNERT et al. 1992) oder bei der Steuerung physiologischer invasiver Prozesse, z.B. der Anordnung der Somiten oder der Wanderung von Neuralleistenzellen in das mesenchymale Gewebe, ebenso wie bei der Entwicklung der Nierentubuli aus den Wolffschen Gängen, wo Ets-1 hauptsächlich in benachbarten mesenchymalen Zellen exprimiert wird (HAHNE et al. 2008).

In malignen Tumoren kann Ets-1 in drei Zelltypen exprimiert werden: in den Tumorzellen selbst, in Endothelzellen und in Fibroblasten des Tumorstromas, die in der unmittelbaren Tumorumgebung angesiedelt sind (WERNERT 1997). Dabei werden verschiedene regulative Funktionen vor allem bei der Expression von für die

Tumorinvasivität wichtigen proteolytisch aktiven Enzymen übernommen. Bekannt ist, dass die Expression von MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 und uPA (Urokinase-Type Plasminogen Activator, der über Plasmin die proteolytische Aktivierung der vorangehenden Matrix-Metalloproteinasen aktiviert) über Ets-1 reguliert wird (BAILLAT et al. 2002, HAHNE et al. 2008, ITO et al. 2004, NAKAMURA et al. 2004, YAN und SLOANE 2003). Ebenso erfolgt eine Aktivierung der Expression von Cathepsin-B, das nachfolgend durch posttranskriptionale Modifikationen sowohl in membranständigen als auch in sezernierten Varianten auftreten kann (YAN und SLOANE 2003).

Interessant ist wiederum die Tatsache, dass über Ets-1 aktivierte Signalkaskaden sowohl in den epithelialen Tumorzellen als auch in den mesenchymalen Stromazellen Funktionen erfüllen. So hat *in vitro* auch die stromale Expression von Ets-1 Einflüsse auf die Invasivität maligner Tumorzellen (WERNERT et al. 1994). Auch während des Vorgangs der epithelial-mesenchymalen Transformation von Plattenepithelkarzinomzellen kommt es zu einem Anstieg der Ets-1-Expression mit konsekutiver Aktivierung entsprechender Promotoren (TAKI et al. 2006).

Auch bei Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs scheint Ets-1 wichtige Funktionen bei der Regulation der Invasivität und des Metastasierungsverhaltens zu steuern (HORVATH et al. 2005, PANDE et al. 1999) und steht daher im Focus der Untersuchungen von Tumor-Stroma-Interaktionen bei dieser Tumorentität.

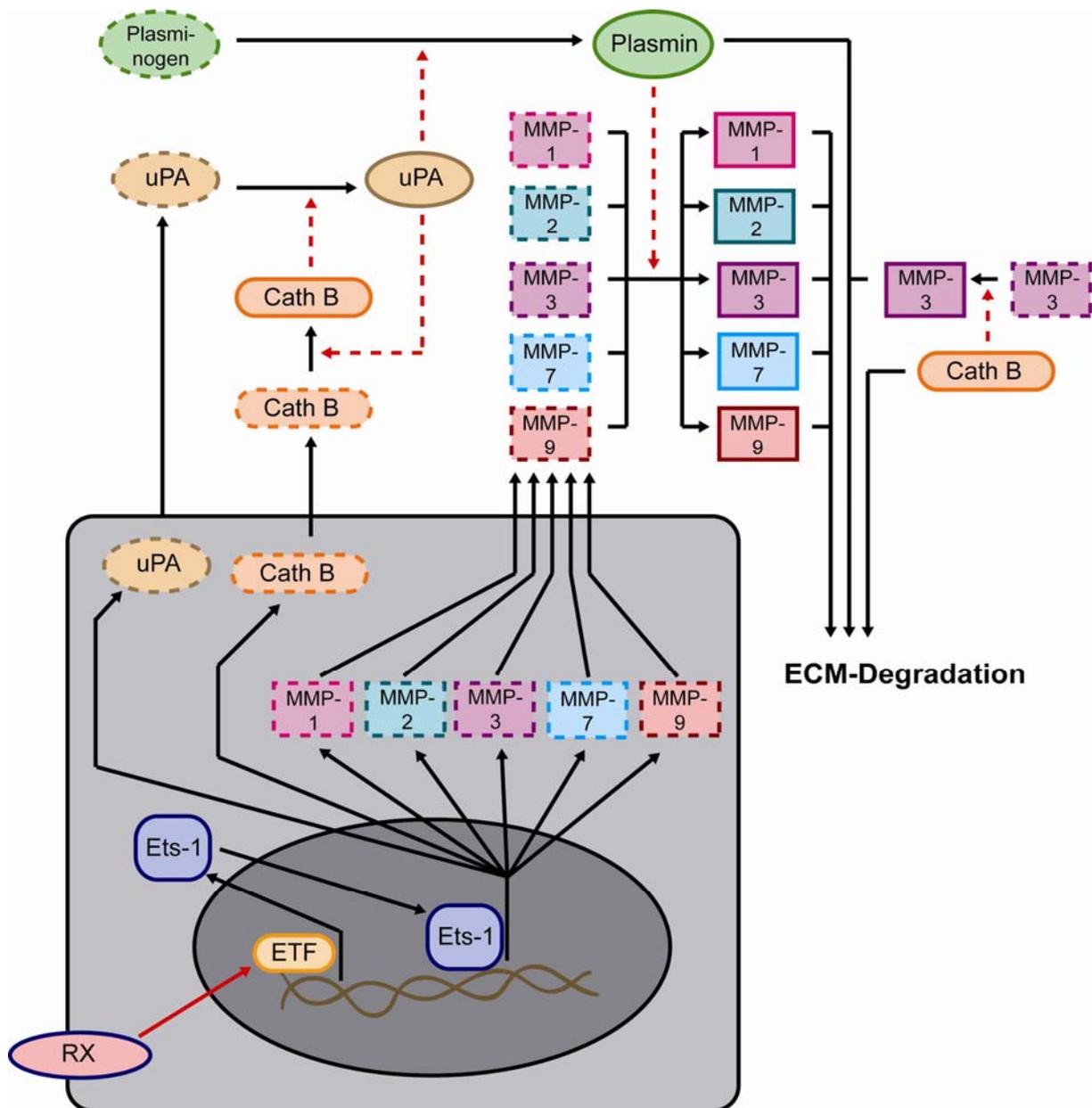


Abb 1.3: Schematische Darstellung der Genexpressionssteuerung von Cathepsin B und Matrix-Metalloproteinasen über Ets-1. Über einen bislang nicht näher benannten Rezeptor (RX) erfolgt die Aktivierung der Genexpression von Ets-1 mittels entsprechender Transkriptionsfaktoren (ETF). Ets-1 wandert seinerseits in den Zellkern und steuert als Transkriptionsfaktor die Genexpression der inaktiven Vorformen von Urokinase-Type Plasminogen Activator (uPa), Cathepsin B (Cath B) sowie MMP-1, -2, -3, -7 und -9 (gestrichelte Umrandung). Nach Permeation der Zellmembran in den Extrazellularraum kommt es zur Modifikation in die entsprechenden aktiven Formen (durchgezogene Umrandung). Katalytische Prozesse sind durch rot-gestrichelte Pfeile markiert. Alle hier gezeigten und durch Ets-1 expressionsregulierten Enzyme tragen direkt oder indirekt zur Degradation der extrazellulären Matrix (ECM) bei und sind daher im Prozess der Tumorinvasion von besonderer Bedeutung.

1.6 Die indirekte Kokultur von PCI-13 und humanen mesenchymalen Stromazellen (hMSC) als Modell der Tumor-Stroma-Interaktion

Um Interaktionen mesenchymaler Stromazellen mit Zellen maligner Tumoren *in vitro* zu untersuchen, bietet die Kokultur der zu evaluierenden Zelltypen wesentliche Vorteile. Als modellhafte Simulation der Interaktionen über Zytokine gewährleistet die indirekte Kokultur im Transwell-System, dass beide Zellreihen während der Proliferation über das Medium kommunizieren und Mediatoren austauschen können. Insbesondere parakrine Einflüsse über Zytokine und deren regulative Eigenschaften auf die biologische Aktivität können so unkompliziert evaluiert werden.

Von besonderem Interesse sind die Einflüsse der humanen mesenchymalen Stromazellen als Modellzellen für das Tumorstroma auf Plattenepithelkarzinomzellen des Oropharynx, um noch unklare Mechanismen der Proliferations- und Expressionsregulation näher zu untersuchen. Humane Plattenepithelkarzinomzellen des Oropharynx wurden bereits indirekt mit Mastzellen kokultiviert und deren Einflüsse auf verschiedene Mediatoren der Apoptoseregulation untersucht, wobei sich Änderungen der Proliferation und biologischen Aktivität gezeigt haben (CH'NG et al. 2006). Ähnliche Untersuchungen wurden in indirekter Kokultur von humanen mesenchymalen Stromazellen mit natürlichen Killerzellen (SOTIROPOULOU et al. 2006) und mit Mammakarzinomzellen (FIERRO et al. 2004) durchgeführt. Die dazu notwendige indirekte Kokultur stellt inzwischen ein etabliertes, weitgehend standardisiertes und vergleichbares Verfahren zur Schaffung von interagierenden Zellpopulationen unter definierten Bedingungen für die nachfolgende zytologische und molekularbiologische Analyse dar.

1.7 Aufgabenstellung

Aus dem Dargestellten geht hervor, dass Plattenepithelkarzinomzellen auf vielfältige Weise mit dem umgebenden Tumorstroma interagieren. Insbesondere von den oben genannten Mediatoren Wnt-3, β -Catenin, MMP-14, E-Cadherin, Cathepsin B und Ets-1 ist bekannt, dass ihre Genexpression grundlegende Eigenschaften maligner Tumoren beeinflussen kann. Entscheidend ist dabei, dass Tumorzellen eng mit dem sie umgebenden Tumorstroma mesenchymalen Ursprungs kommunizieren und in beiden Zelltypen gemeinsame Signalkaskaden und -transduktionswege existieren.

Um die Bedeutung der Tumor-Stroma-Interaktion bei Plattenepithelkarzinomzellen des Oropharynx zu evaluieren und ihren möglichen prognostischen Einfluss zu erforschen, führten wir ein Kokultorexperiment mit der humanen oropharyngealen Plattenepithelkarzinomzelllinie PCI-13 und humanen mesenchymalen Stromazellen (hMSC) durch. Es erfolgte ein Vergleich der indirekten Kokultur von PCI-13 und hMSC mit Einzelkulturen der jeweiligen Zelltypen als Kontrollgruppen. Wir analysierten die Zellproliferation nach 4, 7 und 14 Tagen in den Versuchs- und Kontrollgruppen. Weiterhin führten wir an Tag 4, 7 und 14 eine RNA-Isolation aus den PCI-13-Zellen der Versuchs- und Kontrollgruppe mit nachfolgender reverser Transkription in cDNA durch. Nachfolgend wurde mittels quantitativer PCR eine relative Quantifizierung der Genexpression von Wnt-3, β -Catenin, MMP-14, E-Cadherin, Cathepsin B und Ets-1 durchgeführt.

Folgende Fragen sollen in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

1. Gibt es Unterschiede in der Proliferation der humanen oropharyngealen Plattenepithelkarzinomzelllinie PCI-13 bei indirekter Kokultur mit humanen mesenchymalen Stromazellen im Vergleich zur alleinigen Kultur?
2. Beeinflusst die humane oropharyngeale Plattenepithelkarzinomzelllinie PCI-13 die Proliferation humaner mesenchymaler Stromazellen in der indirekten Kokultur?
3. Beeinflussen humane mesenchymale Stromazellen in der indirekten Kokultur die Genexpression der Mediatoren Wnt-3, β -Catenin, MMP-14, E-Cadherin, Cathepsin B und Ets-1 bei oropharyngealen Plattenepithelkarzinomzellen der Zelllinie PCI-13?

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Zellen

2.1.1 Gewinnung von humanen mesenchymalen Stromazellen

Die verwendeten Zellen wurden aus Beckenkammaspiraten von 7 männlichen Patienten mit einem Durchschnittsalter von 30,57 Jahren gewonnen (s. Tabelle 2.1), bei denen auf Grund verschiedener Indikationen autologe Beckenkammtransplantationen im Rahmen von mund-, kiefer- und gesichtschirurgischen Eingriffen durchgeführt wurden. Eine Einverständniserklärung der Patienten so wie ein Votum der Ethikkommission der Universität Göttingen lag vor (Az. 15/10/01).

Die entnommenen Zellaspirate wurden unmittelbar nach der Entnahme mit 5000 i.E. Heparin pro ml Aspirat versetzt und unverzüglich der weiteren Aufbereitung zugeführt.

Patientennummer	Alter
1	8
2	14
3	29
4	11
5	58
6	42
7	52

Tabelle 2.1: Spenderpatienten für Knochenmarkstromazellen

2.1.1.1 Isolation der mesenchymalen Zellreihe

Die Isolation der mesenchymalen Zellen erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation (Lymphoprep®). Hierzu wurde die heparinversetzte Zellsuspension zunächst 1:1 mit 0,9% NaCl-Lösung verdünnt und anschließend 6 ml der Lösung in ein mit 3 ml Lymphoprep gefülltes Zentrifugenröhrchen gefüllt, wobei eine Mischung der Phasen vermieden wurde. Es wurde im Anschluss für 20 Minuten bei 800·g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Abschluss der Zentrifugation

erfolgte ein vorsichtiges Abbremsen der Zentrifuge. Die sich zwischen lymphozytärer und erythrozytärer Bande abgrenzende helle mesenchymale Bande wurde mit Hilfe einer Pasteurpipette abgezogen und anschließend wiederum mit 0,9% NaCl-Lösung verdünnt. Nach erneuter Zentrifugation zur Aufreinigung und Pelletierung der gewonnenen Zellen (sanfte Zentrifugation bei 300-g für 5-10 min bis zur Pelletbildung) erfolgte die Aussaat in Kulturschalen mit 3 ml Embryonal-Stem-Cell-Medium (ESC-Medium).

2.1.1.2 Kultur der Knochenmarkstromazellen

Die Kultur erfolgte in ESC-Medium bei 37°C unter Begasung mit 5% CO₂. Es wurden tägliche Kontrollen des Zellwachstums und der Zellmorphologie durchgeführt. Eine Adhärenz in der Kulturschale ließ sich in allen Fällen innerhalb von 24 h beobachten. Nach ca. 8-27 Tagen ergab sich eine Semikonfluenz der Zellkultur (s. Tabelle 2.2), so dass bei ausreichender Zellzahl die Trypsinierung (s.u.) und Passagierung zum Einsatz in die Kokultur (Passage 2) erfolgen konnte.

Patientennummer	Dauer bis Semikonfluenz [Tage]
1	10
2	21
3	20
4	27
5	8
6	13
7	12

Tabelle 2.2: Kulturdauer der Knochenmarkstromazellen bis zur Semikonfluenz

2.1.1.3 Charakterisierung

Nach erfolgreicher Anzuchtphase erfolgte eine Charakterisierung der Stromazellen auf mesenchymalen Zellcharakter mittels Durchflusszytometrie (fluorescence activated cell sorting, FACS). Hierzu wurden mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) bzw. Phycoerythrin (PE) konjugierte monoklonale Maus-Antikörper gegen die mesenchymalen Marker CD105, CD90, CD73 und STRO-1 sowie die Marker der

hämatoenen Reihe CD133, CD271 und CD45 verwendet. Die Analyse wurde in einem Durchflusszytometer vom Typ Becton-Dickinson „FACS-Scan“ durchgeführt. Die anschließende Auswertung erfolgte mit der frei verfügbaren Software WinDMI. Zur zusammenfassenden grafischen Darstellung wurde die Software „Statistica“ benutzt.

2.1.2 Tumorzellen

Als Tumorzelllinie für die Kokultur mit den gewonnenen mesenchymalen Stromazellen dienten Zellen der etablierten humanen Plattenepithelkarzinomzelllinie PCI-13 (HEO et al. 1989). Das Intervall zwischen Biopsie und erster Passage in Kultur betrug 2 Monate.

2.1.3 Kultur der Tumorzellen

Die Anzucht erfolgte nach Auftauen aus der Kryokonservierung in auf Dulbecco's modified Eagle Medium basierendem Medium (im folgenden DMEM genannt, s.u.) unter Begasung mit 5% CO₂:

- 6 ml DMEM (37° C) in T25-Kulturflaschen vorlegen
- Gefrorene Zellen im Wasserbad bei 37°C schnell bis zu ca. 90% auftauen und den Inhalt des Kryoröhrchens in T25-Kulturflasche überführen
- Anzucht der Zellen über 5-6 Stunden oder über Nacht, dann Mediumwechsel (jeweils 5 ml DMEM)

Es erfolgten tägliche Kontrollen des Zellwachstums und der Zellmorphologie. Eine Adhärenz der Tumorzellen in der Kulturschale ließ sich in allen Fällen innerhalb von 24 h beobachten. Der Einsatz in die Kokultur (Passage 2) erfolgte auch hier nach Beobachtung eines morphologisch unauffälligen Zellwachstums und Erreichen einer ausreichenden Zellmenge.

2.1.4 Kokultur im Membraneinsatz-System

Die Kokultur erfolgte in 6-Well-Kulturplatten mit Membran-Kokultureinsätzen (ThinCerts) unter Verwendung von modifiziertem DMEM mit 10% FCS (s.u.) als gemeinsames Medium. Dabei wurden die Plattenepithelkarzinomzellen jeweils auf dem Schalenboden als Monolayer kultiviert, während die Kultur der mesenchymalen Stromazellen ebenfalls als Monolayer innerhalb der Membraneinsätze erfolgte. Die freie Zirkulation des Mediums wurde dabei durch die semipermeable Membran des Bodens der Einsätze gewährleistet. Es wurden insgesamt 21 Dreifachansätze gemäß Tabelle 2.3 in Kultur gebracht. Um technische Störeinflüsse auf den Kulturverlauf zu vermeiden, wurden die Versuchsgruppen und jeweiligen Kontrollgruppen auf der selben 6-Well-Platte angesetzt, so dass sich pro Versuchsansatz jeweils eine Kokultur („Kokultur PCI-13+hMSC“) und zwei Kontrollgruppen ergaben („Einzelkultur hMSC“, „Einzelkultur PCI-13“). Die Kontrollgruppe „Einzelkultur hMSC“ wurde in Membran-Kokultureinsätzen bei gleichem Medium ohne auf dem Schalenboden befindliche PCI-13-Zellen kultiviert. Umgekehrt wurde bei der Kontrollgruppe „Einzelkultur PCI-13“ die Kultur auf dem Schalenboden, ebenfalls bei gleichem Medium, mit vorhandenem leerem Membraneinsatz durchgeführt.

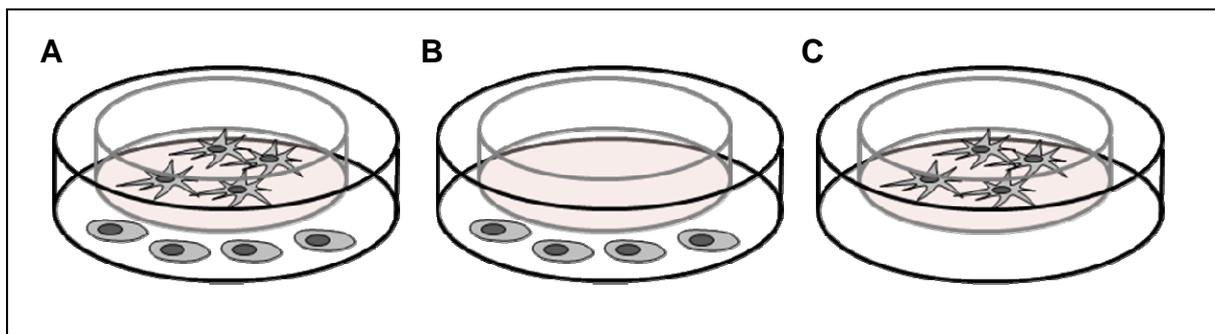


Abb. 2.1: Kokultur von PCI-13 und hMSC. A: Versuchsgruppe, Kultur von PCI-13 auf dem Boden der Kulturschale (schwarz) und hMSC im Membraneinsatz (grau). B: Kontrollgruppe 1, Kultur von PCI-13 auf dem Schalenboden unter leerem Membraneinsatz. C: Kontrollgruppe 2, Kultur von hMSC im Membraneinsatz über leerem Schalenboden.

Nr.	Patient	Kulturdauer (Tage)	Art der Kulturansätze
1	1	4	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
2	1	7	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
3	1	14	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
4	2	4	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
5	2	7	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
6	2	14	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
7	3	4	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
8	3	7	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
9	3	14	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
10	4	4	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
11	4	7	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
12	4	14	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
13	5	4	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
14	5	7	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
15	5	14	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
16	6	4	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
17	6	7	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
18	6	14	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
19	7	4	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
20	7	7	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC
21	7	14	Kokultur PCI-13+hMSC, Einzelkulturen PCI13/hMSC

Tabelle 2.3: Kulturansätze (Versuchs- und Kontrollgruppen), je als Dreifachansatz auf einer 6-Well-Platte. Bei Patient 1 (Vorversuch) erfolgte eine Untersuchung der Zellproliferation, jedoch keine Genexpressionsanalyse.

2.1.5 Trypsinierung der Zellen

Nach Ablauf der jeweiligen Kulturdauer wurden die Zellen der Versuchs- und Kontrollgruppen zunächst durch Trypsinierung aus den Kulturgefäßen isoliert:

- Absaugen des Kulturmediums aus dem Kulturgefäß
- Spülung mit 10 ml PBS, anschließend Absaugen
- Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA, kurz schwenken
- Inkubation für 5 min bei 37°C / Begasung mit 5% CO₂
- Abstoppen mit 8 ml DMEM+10% FCS
- Abnahme von 100 µl Zellsuspension zur Zellzählung (s.u.)
- Pelletierung der übrigen Zellsuspension durch Zentrifugation für 5 min bei 300 rpm
- Entfernung des Überstands
- Aufnahme des Zellpellets in 1 ml FCS

- Zugabe von anteilig 15% DMSO kurz vor dem Einfrieren
- Kryokonservierung bei -80°C.

2.1.6 Zellzählung

Die automatisierte Zellzählung erfolgte nach dem Widerstandsmessprinzip (Gerät CASY 1 Model TT, Messkapillare 150 µm, Fa. Schärfe System).

Hierbei wurden die Zellen nach Suspension in isotoner Elektrolytlösung durch eine Messkapillare definierter Geometrie gesaugt, an die über Platinelektroden eine elektrische Spannung angelegt war. Bei Eindringen einer Zelle in die Messkapillare entstand durch Widerstandsänderung ein elektrischer Puls. Die Anzahl der gemessenen Pulse entsprach der Zellzahl der Probe.

Die Zellzählungen erfolgten jeweils bei der Trypsinierung der Kulturansätze nach Ablauf der jeweiligen Kulturdauer von 4, 7 und 14 Tagen.

Ablauf der Messungen:

- Entnahme von 100 µl Zellsuspension nach Abstoppen der Trypsinierung mit DMEM+10% FCS (s.o.)
- Zugabe der Zellsuspension zu 10 ml CASYTon-Lösung in CASY-Probenbecher, Probenbecher verschließen und mehrmals schwenken
- Probenbecher unter Messkapillare des CASY-Geräts geben
- 3-fache Messung der Zellzahl
- Reinigung der Messkapillare mit reinem CASYTon nach Abschluss der Messungen.

2.2 Quantitativer Genexpressionsnachweis

2.2.1 Isolation von RNA

Die RNA-Isolation aus den Zellkulturen erfolgte mit Hilfe des RNeasy[®]-Mini-Kits (Fa. Qiagen, Hilden) nach folgendem Protokoll:

- Lysieren der Zellen durch Zugabe von 350 μ l (bei $<5 \times 10^6$ Zellen) bzw. 600 μ l (bei $>5 \times 10^6$ Zellen) RLT-Puffer mit β -Mercaptoethanol 100:1 zum Zellpellet, Mischung durch Vortex und Pipettieren
- Pipettieren des Lysats auf eine „QIAshredder Spin Column“ in einem 2-ml-Probengefäß
- Zentrifugieren für 2 min. bei 13200 U/min
- Zugabe von 350 μ l 70 % Ethanol, Mischung durch Pipettieren (nicht zentrifugieren!)
- Pipettieren der Probe, inkl. eventueller Präzipitate, auf eine „RNeasy Spin Column“ (im Folgenden „Säule“ genannt) in einem 2-ml-Probengefäß, vorsichtig schließen
- Zentrifugieren für 15 s bei >10000 U/min
- Verwerfen des Durchflusses
- Zugabe von 700 μ l Puffer RW1 auf die Säule, vorsichtig schließen.
- Zentrifugieren für 15 s bei >10000 U/min
- Verwerfen des Durchflusses, dabei beachten, dass die Säule nicht kontaminiert wird
- Zugabe von 500 μ l Puffer RPE auf die Säule. Deckel vorsichtig schließen und für 15 s bei >10000 U/min zentrifugieren (Waschen der Säule)
- Verwerfen des Durchflusses
- Erneute Zugabe von 500 μ l Puffer RPE, Deckel vorsichtig schließen und für 2 min bei >10000 U/min zentrifugieren
- Verwerfen des Durchflusses
- Wechsel der Säule in ein neues 2-ml-Reaktionsgefäß, erneute Zentrifugation für 1 min bei voller Geschwindigkeit
- Wechsel der Säule in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß

- Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser, Zentrifugation für 1 min bei >10000 U/min (Eluation der RNA aus der Säule)
- Wiederholung des Zentrifugationsschritts mit dem gewonnenen Eluat zum Erreichen einer höheren RNA-Konzentration
- Photometrische Quantifizierung der gewonnenen RNA (s.u.).

2.2.2 DNase-Verdau

Zur Entfernung von DNA-Kontamination aus den RNA-Proben erfolgte ein Verdau mit DNase I. Hierzu wurden die RNA-Proben nach folgendem Protokoll behandelt:

2.2.2.1 DNase-I-Inkubation

Zugabe pro RNA-Probe von

5 µl Inkubationspuffer

1 µl DNase I (10U/µl)

0,5 µl RNase OUT (40U/µl)

Auffüllen mit RNase-freiem Wasser bis zu einer Gesamtmenge von 50 µl.

2.2.2.2 Reinigung der Probe (Phenol-Chloroform-Extraktion)

Zugabe zur RNA-Probe von:

- 150 µl RNase-freiem Wasser
- 200 µl (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol).

Zentrifugieren der Probe bei 13000 U/min bei Raumtemperatur für 2 Minuten.

Nach Zentrifugierung Abpipettieren der wässrigen (oberen) Phase mit enthaltener RNA und Transfer in ein 2-ml-Probengefäß.

2.2.2.3 RNA-Präzipitation

- Messung des Volumens der wässrigen Phase
- Zugabe von 1/10 des gemessenen Volumens der wässrigen Phase an 3 M Natriumacetat mit pH 4,8 (entsprechend einer Endkonzentration von 300 mM)

- Zugabe der Menge des gemessenen Volumens der wässrigen Phase an Isopropylalkohol
- Gute Durchmischung (Vortex, kurz anzentrifugieren)
- Inkubation der Proben bei -20 °C für 30 Minuten
- Zentrifugation der Probe bei 13000 U/min bei 4 °C für 30 Minuten

2.2.2.4 Reinigen der RNA

- Abnehmen des Überstands
- Reinigen des RNA-Pellets mit 1 ml 75% Ethanol
- Zentrifugieren der Probe bei 13000 U/min für 5 min bei 4 °C
- Wiederholung dieser Schritte

2.2.2.5 Wiederauflösen der RNA

- Abnehmen des Überstands und Trocknen des RNA-Pellets bei 37°C im Thermoblock
- Resuspendieren des RNA-Pellets mit 50 µl RNase-freiem Wasser und Mischen durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren
- Auflösen der RNA durch 10-minütiges Schütteln bei 42 °C im Thermoblock
- Abnehmen von 2 µl der Probe zur Quantitäts- (Photometermessung, s.u.) und Qualitätskontrolle (RNA-Elektrophorese, s.u.)
- Einfrieren und Lagern der RNA-Proben bei -80 °C

2.2.3 Quantitäts- und Qualitätskontrolle

Es erfolgte eine Quantifizierung der isolierten RNA mittels photometrischer Messung (Gerät: Eppendorf Biophotometer bei einer Wellenlänge von 260 nm) vor und nach DNase-Verdau. Dazu wurden die RNA-Proben jeweils 1:100 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Weiterhin erfolgte nach DNase-Verdau eine Qualitätskontrolle der gewonnenen RNA-Proben durch RNA-Elektrophorese unter Verwendung des Geräts „Agilent 2100 Bioanalyzer“. Die Messungen wurden nach vom Hersteller vorgegebenem Protokoll durchgeführt.

2.2.4 Reverse Transkription der gewonnenen RNA in cDNA

Nach erfolgreicher Qualitätskontrolle erfolgte die reverse Transkription der isolierten RNA unter Verwendung des „iScript cDNA Synthesis Kit“ der Firma Biorad nach folgendem Ansatz:

4 µl 5x iScript Reaction Mix
 1 µl iScript reverse Transkriptase
 200 ng RNA-Probe, in sterilem/nukleasefreiem Wasser gelöst
 Auf 20 µl Gesamtvolumen mit sterilem und nukleasefreiem Wasser auffüllen

Die Reaktion wurde im Thermocycler (Mastercycler Gradient) nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Zyklenanzahl	Temperatur	Zeit
1	25°C	5 min
1	42°C	30 min
1	85°C	5 min
1	4°C	halten

Tabelle 2.4: Reverse Transkription

Die gewonnene cDNA wurde im Anschluss bei -20°C kryokonserviert.

2.2.5 Primer

Die Lokalisation der Primer für die nachzuweisenden cDNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe der Software „Primer3“ innerhalb der Genomdatenbank des NCBI. Die Produktgröße wurde auf maximal 250 bp limitiert, die Schmelztemperatur auf 60°C festgelegt. Bei der Lokalisationsauswahl wurde des weiteren auf Nähe zur 3'-untranslatierten Region des zu bestimmenden Transkripts sowie möglichst das Überspannen von Exon-Exon-Grenzen geachtet. Das Risiko der Bildung von Substrukturen zwischen den jeweiligen Primern oder innerhalb eines Primers bzw. dessen Amplifikationsproduktes konnten mittels der Software „mfold“ (ZUKER 2003) minimiert werden. Weiterhin erfolgte eine Spezifitätsüberprüfung jedes einzelnen

Primers mit Hilfe der „Basic-Local-Alignment-Search-Tool-“ („BLAST-“) Software des NCBI. Hergestellt wurden die Oligonukleotide durch die Firma Metabion, die Lieferung erfolgte in unmodifizierter lyophilisierter Form. Die Proben wurden zur Herstellung einer 100 µM Stammlösung in sterilem und DNA-freiem H₂O gelöst, die Lösung wurde für die Durchführung der Versuche auf 10 µM verdünnt.

Gen	Primerausrichtung und -sequenz	Produktlänge [bp]
WNT3	fwd 5'-GGCTGTGACTCGCATCATAA-3' rev 5'-CAGCAGGTCTTCACCTCACA-3'	245
MMP14	fwd 5'-GAGCTCAGGGCAGTGGATAG-3' rev 5'-GGTAGCCCGGTTCTACCTTC-3'	172
CTNNB1	fwd 5'-GAAACGGCTTTCAGTTGAGC-3' rev 5'-CTGGCCATATCCACCAGAGT-3'	166
CDH1	fwd 5'-CGGAGAAGAGGACCAGGACT-3' rev 5'-GGTCAGTATCAGCCGCTTTC-3'	185
CTSB	fwd 5'-AGAATGGCACACCCTACTGG-3' rev 5'-TGCATTTCTACCCCGATCTC-3'	212
ETS1	fwd 5'-ACAAGCCTGTCATTCCTGCT-3' rev 5'-TTCCTCTTTCCCATCTCCT-3'	187
GAPDH	fwd 5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3' rev 5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'	185

Tabelle 2.5: Oligonukleotidsequenzen der verwendeten Primer (fwd=forward, rev=reverse, bp=Basenpaare)

2.2.6 Verifikation der Schmelztemperatur und temperaturabhängigen Spezifität

Bei allen Primerpaaren erfolgte eine Verifikation der errechneten Schmelztemperatur mittels Durchführung einer quantitativen PCR (Gerät: Biorad MyIQ®). Für alle Primeretablierungen wurde dieselbe DNA-Poolprobe aus PCI-13-Zellen verwendet. Für die Überprüfung mittels eines Temperaturgradienten wurden die Proben als Triplets eingesetzt.

Materialien für 1 Reaktionsgefäß der 96-Well-Platte:

12,5 µl iQ SYBR Green Supermix

0,4 µl Primer (fwd)

0,4 µl Primer (rev)

10,7 µl DNA-freies steriles Wasser

1 µl cDNA (Poolprobe)

Insgesamt 25 µl Probenvolumen

PCR-Programm zur Temperaturetablierung:

Zyklenanzahl	Temperatur	Zeit	Bemerkung
1	98°C	30 s	
40	94°C	1 s	
	56,8-62,1°C	15 s	Temperaturgradient über Probentriplet
	72°C	1 s	
1	94°C	15 s	
1	56,8-62,1°C	30 s	
85	50-92°C	10 s	Bei jeder Wiederholung Temperaturerhöhung um 0,5°C

Tabelle 2.6: PCR-Programm zur Temperaturetablierung

Anhand der Schmelzkurve wurde die temperaturabhängige Spezifität jedes Primerpaars analysiert. Das Optimum lag bei allen Reaktionen bei den errechneten 60°C. Im Anschluss erfolgte zusätzlich eine Elektrophorese des Amplifikationsprodukts auf einem 1,5% Agarosegel und ein Vergleich mit der errechneten Produktlänge. Nebenprodukte konnten für alle verwendeten Primerpaare ausgeschlossen werden.

2.2.7 Verifikation der konzentrationsabhängigen Spezifität und Ermittlung der Standardkurve

Für alle verwendeten Primerpaare wurde die konzentrationsabhängige Spezifität mittels Durchführung einer weiteren quantitativen PCR verifiziert. Der Versuchsansatz für ein Reaktionsgefäß entsprach dabei dem bereits für die Temperaturetablierung verwendeten; weiterhin wurde DNA-Material aus der selben PCI-13-Poolprobe verwendet. Es wurde eine vierstufige Konzentrationsreihe von 1:1 bis 1:1000 durch Verdünnung der Poolprobe mit sterilem und DNA-freiem Wasser hergestellt.

PCR-Programm zur Verifikation der konzentrationsabhängigen Spezifität:

Zyklenanzahl	Temperatur	Zeit	Bemerkung
1	98°C	30 s	
45	94°C	1 s	
	60°C	15 s	Fluoreszenzmessung
	72°C	10 s	
1	94°C	15 s	
1	60°C	30 s	
75	55-92°C	10 s	Bei jeder Wiederholung Temperaturerhöhung um 0,5°C

Tabelle 2.7: PCR-Programm zur Verifikation der konzentrationsabhängigen Spezifität

In der Schmelzkurvenanalyse zeigte sich für alle verwendeten Primerpaare eine gute Spezifität bis zu einer Konzentration der DNA-Poolprobe von 1:1000. Die Amplifikationsprodukte wurden wiederum zusätzlich mittels Gelelektrophorese (1,5% Agarosegel) auf die zu erwartende Produktlänge hin überprüft.

2.2.8 Quantitative PCR (qPCR)

Für die einzelnen Versuche wurden 96-Well-Probenplatten verwendet, die nach einem einheitlichen Pipettierschema für alle Versuche bestückt und mit einer

transparenten Kunststoffolie verschlossen wurden. Die Reaktionen zum quantitativen Nachweis der cDNA-Sequenzen wurden nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Materialien für 1 Reaktionsgefäß der 96-Well-Platte:

12,5 µl iQ SYBR Green Supermix

0,4 µl Primer (fwd)

0,4 µl Primer (rev)

6,7 µl DNA-freies steriles Wasser

5 µl cDNA-Probe

Insgesamt 25 µl Probenvolumen

Da in den Vorversuchen zur Ermittlung der konzentrationsabhängigen Primerspezifität ein sehr früher Amplifikationsbeginn festgestellt worden war, wurden die cDNA-Proben 1:5 verdünnt eingesetzt.

Durch Einsatz der etablierten Primerpaare wurde pro Platte die Expression von 7 Genen inklusive GAPDH als Referenzgen („Housekeeping-Gene“) in Tumorzellen der Kokulturen mit hMSC gegenüber den Tumorzellen in Einzelkulturen untersucht. Die cDNA-Proben wurden jeweils als technische Triplikate eingesetzt. Gleichzeitig enthielt jeder Versuch eine Standardreihe mit in vier Schritten von 1:1 bis 1:1000 verdünnter cDNA-Poolprobe für jedes Primerpaar. Die eingesetzte cDNA-Poolprobe war ebenfalls zuvor, wie die zu untersuchenden cDNA-Proben, 1:5 verdünnt worden. Zum Ausschluss einer Kontamination mit Fremd-DNA wurde pro Primerpaar eine Negativkontrolle („No-Template-Control“) mit in die Versuchsanordnung eingebracht, bei der anstelle der Proben-DNA steriles und nukleinsäurefreies Wasser eingesetzt wurde.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		WNT3 NTC	WNT3 S1	WNT3 S2	WNT3 S3	WNT3 S4	CDH1 S1	CDH1 S2	CDH1 S3	CDH1 S4	CDH1 NTC	
B							CTSB S1	CTSB S2	CDH1 S3	CDH1 S4	CDH1 NTC	
C	WNT3 Einzelkultur			WNT3 Kokultur			CDH1 Einzelkultur			CDH1 Kokultur		
D							CTSB Einzelkultur			CTSB Kokultur		
E	MMP14 Einzelkultur			MMP14 Kokultur			ETS1 Einzelkultur			ETS1 Kokultur		
F	CTNNB1 Einzelkultur			CTNNB1 Kokultur			GAPDH Einzelkultur			GAPDH Kokultur		
G	MMP14 NTC	MMP14 S1	MMP14 S2	MMP14 S3	MMP14 S4	ETS1 S1	ETS1 S2	ETS1 S3	ETS1 S4	ETS1 NTC		
H	CTNNB1 NTC	CTNNB1 S1	CTNNB1 S2	CTNNB1 S3	CTNNB1 S4	GAPDH S1	GAPDH S2	GAPDH S3	GAPDH S4	GAPDH NTC		

Tabelle 2.8: Plattendesign zur Durchführung der qPCR-Versuche (NTC = No-Template-Control = Negativkontrolle; S1-S4: Verdünnungsreihe aus Poolproben, S1=1:1, S4=1:1000)

Das folgende PCR-Programm war bereits in Vorversuchen etabliert worden (s. auch Verifikation der konzentrationsabhängigen Spezifität) und wurde für sämtliche Reaktionen zur cDNA-Quantifikation verwendet:

Zyklenanzahl	Temperatur	Zeit	Bemerkung
1	98°C	30 s	
45	94°C	1 s	
	60°C	15 s	Fluoreszenzmessung
	72°C	10 s	
1	94°C	15 s	
1	60°C	30 s	
75	55-92°C	10 s	Bei jeder Wiederholung Temperaturerhöhung um 0,5°C

Tabelle 2.9: PCR-Programm zur cDNA-Quantifikation

2.3 Statistische Analyse

2.3.1 Evaluation der Zellproliferationsunterschiede

Die mittels Widerstandsmessprinzip an den entsprechenden Kulturtagen (4, 7, 14) dreifach gemessenen Zellzahlen sowohl der PCI-13-Zellen als auch der mesenchymalen Stromazellen wurden zunächst gemittelt. Im Anschluss erfolgte die statistische Evaluation von Zeit und Versuchsgruppe mit einer zweifaktoriellen

Varianzanalyse für longitudinale Daten. Die Proliferationswerte wurden zuvor zur Basis 2 logarithmiert. Als Signifikanzniveau wurde für alle Tests $\alpha = 5\%$ festgelegt. Alle Analysen wurden in der freien Software R (Version 2.8, www.r-project.org) ausgeführt.

2.3.2 Evaluation der Genexpressionsunterschiede

Zur relativen Quantifizierung der Genexpressionswerte in den verschiedenen Versuchsgruppen erfolgte zunächst eine Berechnung der Expressionsrate mit dem Algorithmus nach PFAFFL (2001). Die erhaltenen Werte wurden zunächst ebenfalls zur Basis 2 logarithmiert und anschließend mit einer zweifaktoriellen Varianzanalyse für longitudinale Daten auf Einflüsse von Zeit und Versuchsgruppe hin analysiert. Als Signifikanzniveau wurde auch bei der Expressionsanalyse für alle Tests $\alpha = 5\%$ festgelegt. Die Analysen wurden ebenfalls in der freien Software R (Version 2.8) ausgeführt.

2.4 Verwendete Lösungen, Chemikalien und Geräte

2.4.1 Verwendete Lösungen

- Kokulturmedium (DMEM modifiziert)
DMEM (+1000 mg/l Glucose + L-Glutamin + Pyruvat)
10% FCS
2% Gentamicin

- ESC-Medium
DMEM (+4500 mg/l Glucose + L-Glutamin + Pyruvat)
10% FCS
1% NEAA
1% β -Mercaptoethanol
2% Gentamicin

- 10xTBE-Puffer
 108 g Tris Base
 55 g Borsäure
 7,44 g EDTA-Dinatriumsalz
 Ad 1000 ml Aqua bidest. Für 5xTBE-Puffer 1:1 mit Aqua bidest verdünnen
- Agarosegel
 100 ml 5xTBE, 1:10 verdünnt
 1,5 g Agarose
 5 µl Ethidiumbromid
 TBE mit Agarose vermischen und in Mikrowellenherd aufkochen. 5 µl Ethidiumbromid in die Gelkammer geben, noch heißes Agarosegel einfüllen und vermischen, Gelkamm eintauchen und abkühlen lassen. Anschließend Elektrophorese nach Proben- und Ladungspufferzugabe.

2.4.2 Verwendete Chemikalien

Aqua dest./-bidest.	eigene Herstellung
10x Inkubationspuffer für DNase 1	Roche Diagnostics, Mannheim
5x iScript Reaction Mix	Bio-Rad Laboratories, München
Agarose	Bio-Rad Laboratories, München
Ampuwa (Aqua dest., steril und pyrogenfrei)	B. Braun, Melsungen
Anti-CD105-Antikörper, monoklonal (Maus), PE-konjugiert	Antibodies-online, Aachen
Anti-CD133-Antikörper, monoklonal (Maus), PE-konjugiert	Antibodies-online, Aachen
Anti-CD271-Antikörper, monoklonal (Maus), PE-konjugiert	Becton Dickinson, Heidelberg
Anti-CD45-Antikörper, monoklonal (Maus), PE-Konjugiert	Antibodies-online, Aachen
Anti-CD90-Antikörper, monoklonal (Maus), PE-konjugiert	Antibodies-online, Aachen
Anti-STRO-1-Antikörper, monoklonal (Maus), FITC-konjugiert	Antibodies-online, Aachen
Aqua dest., RNase-frei	Qiagen, Hilden
Borsäure	Merck, Darmstadt
CASYton	Schärfe System, Reutlingen
DMEM GIBCO 1,0 g Glucose	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM GIBCO 4,5 g Glucose	Invitrogen, Karlsruhe
DMSO	Merck, Darmstadt
DNase 1	Roche Diagnostics, Mannheim
EDTA-Dinatriumsalz	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol abs. zur Analyse	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Invitrogen, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FCS)	Carl Roth, Karlsruhe
Gentamicin	Invitrogen, Karlsruhe
Heparin Amp. 5000 i.E.	Ratiopharm, Ulm
Immunglobulin Maus-IgG1, monoklonal, FITC-konjugiert	Antibodies-online, Aachen
Immunglobulin Maus-IgG1, monoklonal, PE-konjugiert	Antibodies-online, Aachen
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories, München
iScript Reverse Transkriptase	Bio-Rad Laboratories, München
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kulturmedium DMEM 1% Glucose „GIBCO“	Invitrogen, Karlsruhe
Kulturmedium DMEM 4,5% Glucose „GIBCO“	Invitrogen, Karlsruhe
Ladungspuffer „Blue Juice“	Invitrogen, Karlsruhe
Lymphoprep-Lösung	Axis Shield, Oslo

Puffer RLT
 Puffer RPE
 Puffer RW1
 Reiniger DNA ExitusPlus
 Reiniger RNase Zap
 RNase OUT
 Rotiphenol (Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol)
 Tris Base
 Trypsin
 Wasser, RNase-frei
 β -Mercaptoethanol

Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden
 AppliChem, Darmstadt
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Invitrogen, Karlsruhe
 Carl Roth, Karlsruhe
 Merck, Darmstadt
 Sigma-Aldrich, Steinheim
 Qiagen, Hilden
 Sigma-Aldrich, Steinheim

2.4.3 Verwendete Geräte

6-Well-Multiwell-Platten
 96-Well-PCR-Platten
 cDNA-Synthesekt "iScript cDNA Synthesis Kit"
 Durchflusszytometriegerät „FACS Scan“
 Einwegspritzen 5 ml
 Eismaschine
 Elektrische Pipette „Accu-Jet“
 Erlenmeyerkolben 250 ml/500 ml
 Fluoreszenzkammer „BioDocAnalyze“
 Gelkammer „Mini 400.000“
 Hochspannungstransformator „Elite 300 plus“
 Kühlschrank 4°C/-20°C
 Kühlzentrifuge „Centrifuge 5415 R“
 Latexhandschuhe „Peha Soft“
 Mikroliterpipette 0,5-10 μ l „Eppendorf Reference“
 Mikroliterpipette 100 μ l „Eppendorf Reference“
 Mikroliterpipette 1000 μ l „Eppendorf Reference“
 Mikroliterpipette 20 μ l „Eppendorf Reference“
 Mikroskop „Axiovert 200M“
 Mikrowellenherd
 Parafilm
 Pasteurpipetten „Long Size 230 mm“
 Photometerküvetten „UVette“
 Pipettenspitzen 1000 μ l „Biosphere Filter Tips“
 Pipettenspitzen 10 μ l „Biosphere Filter Tips“
 Pipettenspitzen 100 μ l „Biosphere Filter Tips“
 Präzisionswaage „PM 460“
 Probengefäße 10 ml
 Probengefäße 50 ml
 Reaktionsgefäße „Lymphoprep“
 Reaktionsgefäße 1,5 ml
 Reaktionsgefäße 2 ml
 Real-Time-Thermocycler „MyIQ“
 RNA-Elektrophoresechips
 RNA-Elektrophoresegerät „Bioanalyzer 2100“
 RNA-Werkbank „AirClean 600“
 RNEasy Mini Kit
 Säulen zur Zellyse „QiaShredder Columns“
 Serologische Pipette 10 ml
 Serologische Pipette 25 ml
 Software „AxioVision“
 Software „IQ5“

Greiner Bio-One, Frickenhausen
 Bio-Rad Laboratories, München
 Bio-Rad Laboratories, München
 Becton Dickinson, Heidelberg
 B. Braun, Melsungen
 Ziegra, Isernhagen
 Brand, Wertheim
 Schott, Mainz
 Biometra, Göttingen
 Polymehr, Paderborn
 Polymehr, Paderborn
 Liebherr, Ochsenhausen
 Eppendorf, Hamburg
 Hartmann, Heidenheim
 Eppendorf, Hamburg
 Eppendorf, Hamburg
 Eppendorf, Hamburg
 Eppendorf, Hamburg
 Zeiss, Oberkochen
 Medion, Essen
 American National Can, Grennwich
 WU, Mainz
 Eppendorf, Hamburg
 Sarstedt, Nümbrecht
 Sarstedt, Nümbrecht
 Sarstedt, Nümbrecht
 Mettler-Toledo, Gießen
 Sarstedt, Nümbrecht
 Sarstedt, Nümbrecht
 Axis Shield, Oslo
 Biozym, Hess. Oldendorf
 Biozym, Hess. Oldendorf
 Qiagen, Hilden
 Agilent Technologies, Böblingen
 Agilent Technologies, Böblingen
 Star Lab, Ahrensburg
 Qiagen, Hilden
 Qiagen, Hilden
 Sarstedt, Nümbrecht
 Sarstedt, Nümbrecht
 Zeiss, Oberkochen
 Qiagen, Hilden

Software "R"	The R Foundation, Wien
Software "Statistica"	Statsoft, Hamburg
Software "WinDMI"	Scripps Research Institute, La Jolla
Thermoblock/Mixer "Thermimixer Comfort"	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler "Mastercycler Gradient"	Eppendorf, Hamburg
Tiefkühlschrank -80°C	GFL, Burgwedel
Werkbank für Zellkulturarbeiten „EN 12469“	Clean Air Systems, Chennai
Zellkultureinsätze „ThinCerts“	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschrank „CO ₂ -Incubator“	Sanyo, München
Zellzähler „CASY Model TT“	Schärfe System, Reutlingen
Zentrifuge „2K15C“	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Zentrifuge „Centrifuge 5417 C“	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge „Megafuge 1.0“	Heraeus, Hanau

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung humaner mesenchymaler Stromazellen

Die bei 4 Patienten (Pat. 4, 5, 6 und 7) vor Einsatz in die Kokultur durchgeführte Charakterisierung der entnommenen Knochenmarkstromazellen mittels Durchflusszytometrie (FACS) ergab nach Auswertung gemittelt in 83,95% eine Positivität der entnommenen Zellen für den mesenchymalen Stromazell-Oberflächenmarker CD105 und in 69,38% für das mesenchymale Antigen CD90. In 18,56% zeigte sich ebenfalls eine Positivität für den mesenchymalen Marker CD73. Für das Antigen STRO-1 konnte bei 12,6% der Zellen ein positiver Nachweis geführt werden. Als Kontrollantigene für die hämatogene Reihe zeigten die Clustermoleküle CD133 (1,81%), CD271 (1,35%) und CD45 (3,84%) eine geringe positive Reaktion.

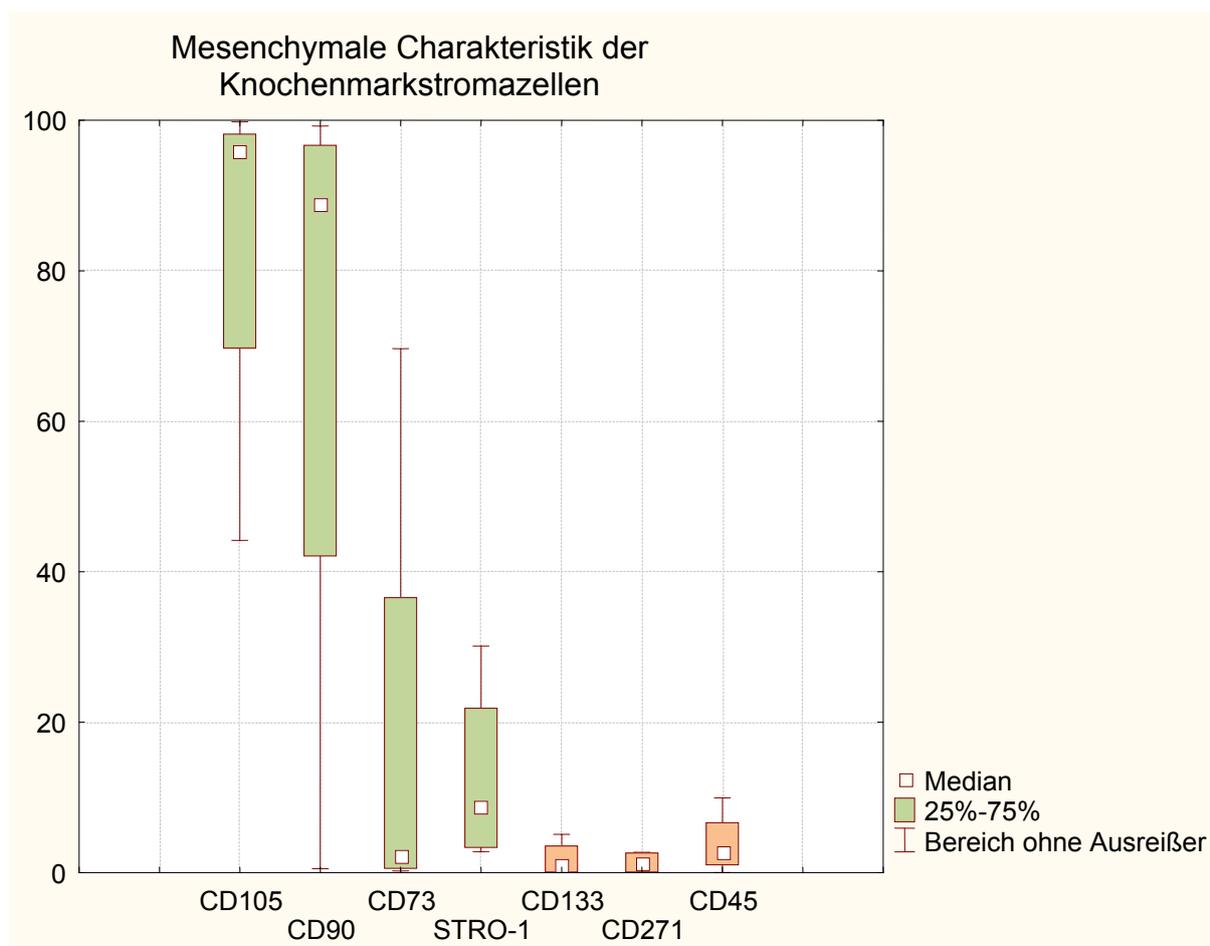


Abb. 3.1: Übersicht der Reaktivität für Antigene der mesenchymalen und hämatogenen Zellreihe in der Durchflusszytometrie bei Knochenmarkstromazellen. Grün: Oberflächenantigene der mesenchymalen Reihe; Rot: Oberflächenantigene der hämatogenen Reihe

Die folgenden Abbildungen zeigen die Einzelergebnisse der FACS-Analyse zur Quantifikation von Zellen mit mesenchymalen Oberflächenantigenen als farbcodierte Dichteplots. Für die untersuchten Populationen expandierter Knochenmarkstromazellen wurde zunächst eine nicht antikörpermarkierte Leerzählung zur Ermittlung des Forward Scatter (FSC) als Maß für die Zellgröße und des Side Scatter (SSC) als Maß für die Zellkomplexität durchgeführt. Anhand der Auftragung von SSC über FSC wurde das Gating für die folgenden Messungen festgelegt. Es folgten zwei Isotypkontrollen für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) zur Quadrantendefinition. Die Quadranten wurden so gewählt, dass in der Isotypkontrolle mindestens 95% der untersuchten Zellen als negativ dargestellt wurden. Im Anschluss wurde die Sortierung nach Antikörpermarkierung für die entsprechenden Oberflächenmarker CD105, CD90, CD73, STRO-1, CD133, CD271 und CD45 durchgeführt.

3.1.1 Patient 4

3.1.1.1 Patient 4: Leermessung und Isotypkontrollen

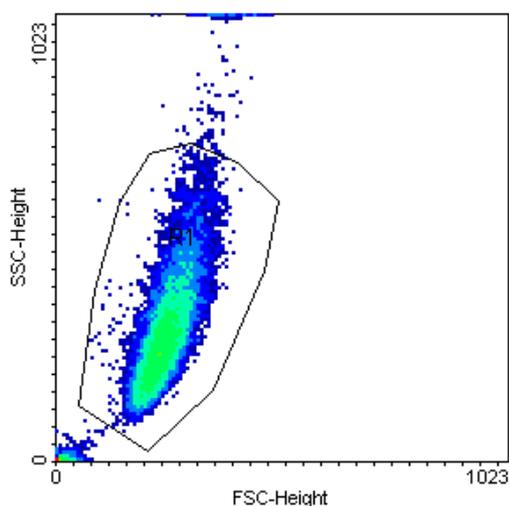


Abb. 3.2:
Patient 4
Leermessung SSC/FSC
Festlegung des Gates (Polygon R1)

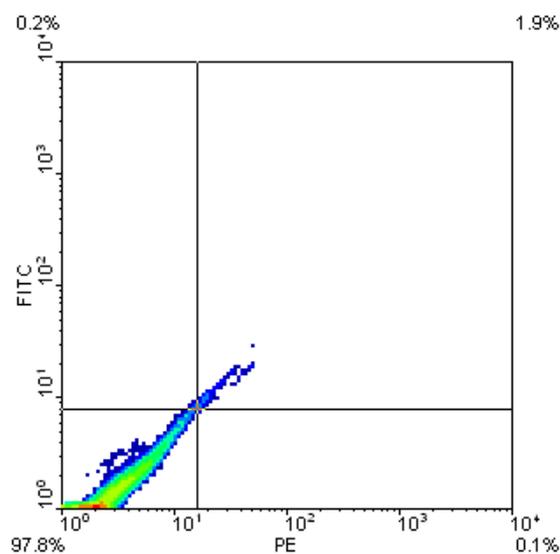


Abb. 3.3:
Patient 4
Isotypkontrolle FITC
2,1% positiv, 97,9% negativ

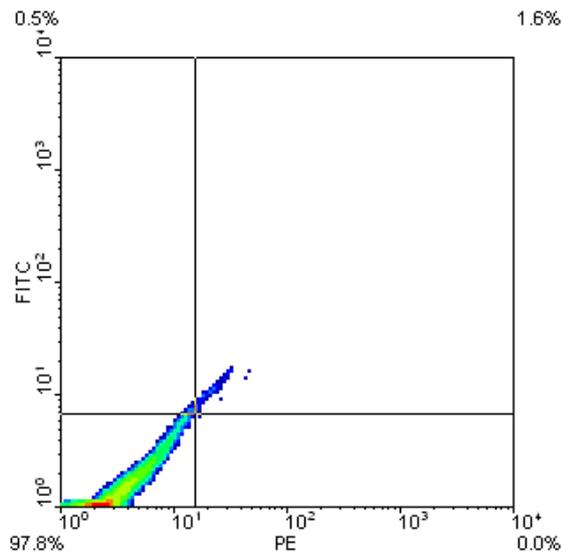


Abb. 3.4:
Patient 4
Isotypkontrolle PE
 2,2% positiv, 97,8% negativ

3.1.1.2 Patient 4: Bestimmung der Oberflächenantigene

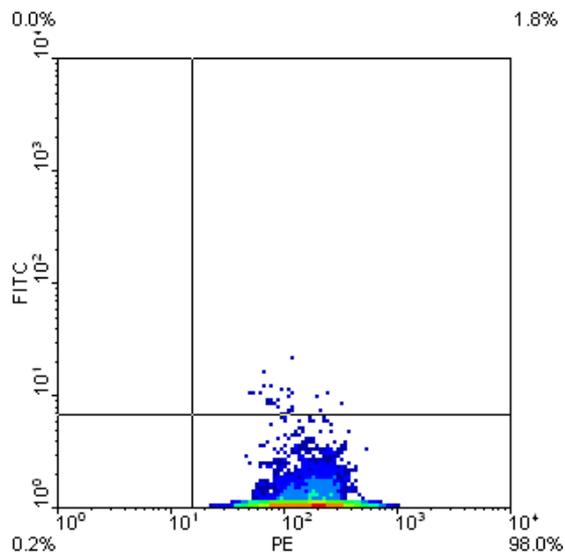


Abb. 3.5:
Patient 4
Anti-CD105 (PE-konjugiert)
 98,2% positiv, 1,8% negativ

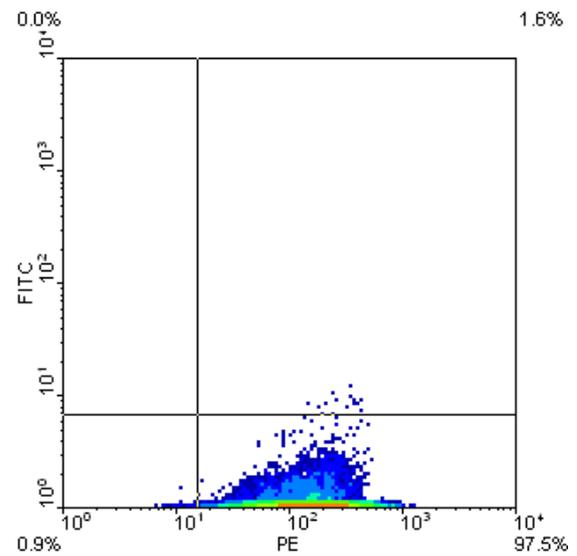


Abb. 3.6:
Patient 4
Anti-CD90 (PE-konjugiert)
 98,4% positiv, 1,6% negativ

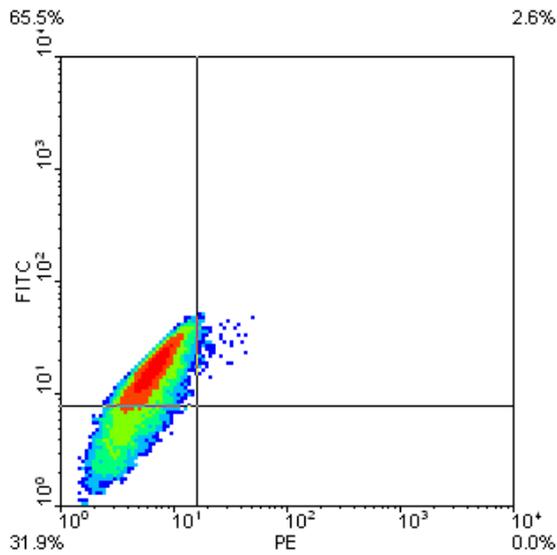


Abb. 3.7:
Patient 4
Anti-CD73 (FITC-konjugiert)
 68,1% positiv, 31,9% negativ

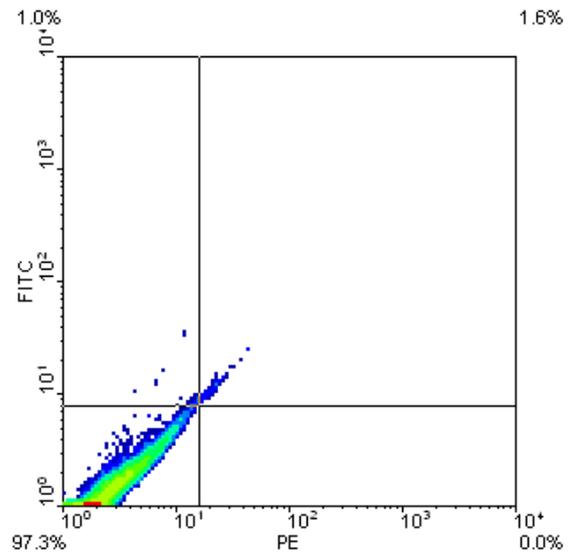


Abb. 3.8:
Patient 4
Anti-STRO-1 (FITC-konjugiert)
 2,7% positiv, 97,3% negativ

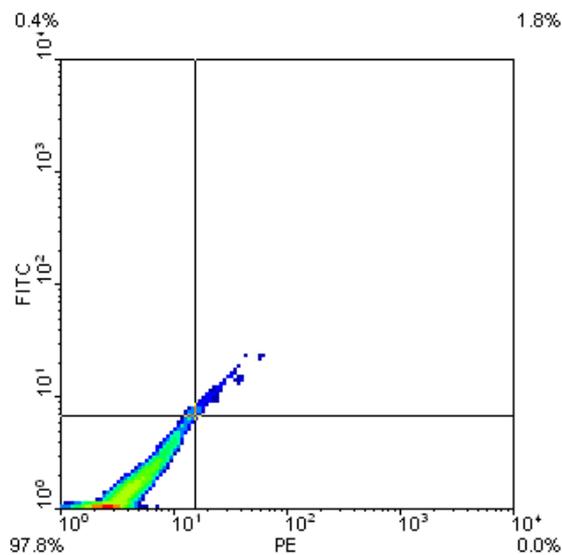


Abb. 3.9:
Patient 4
Anti-CD133 (PE-konjugiert)
 1,8% positiv, 98,2% negativ

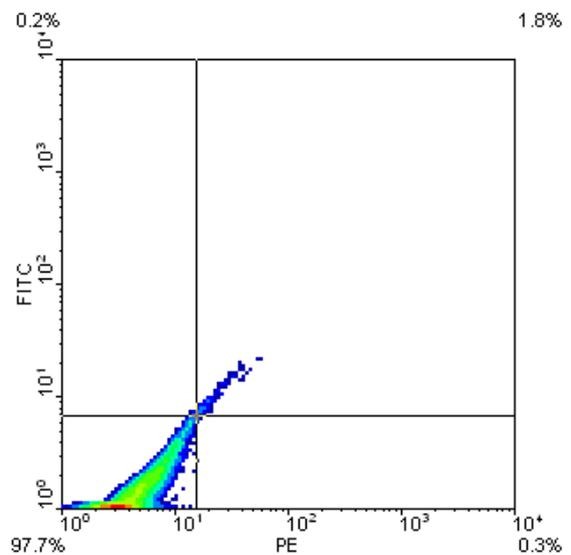


Abb. 3.10:
Patient 4
Anti-CD271 (PE-konjugiert)
 2,1% positiv, 97,9% negativ

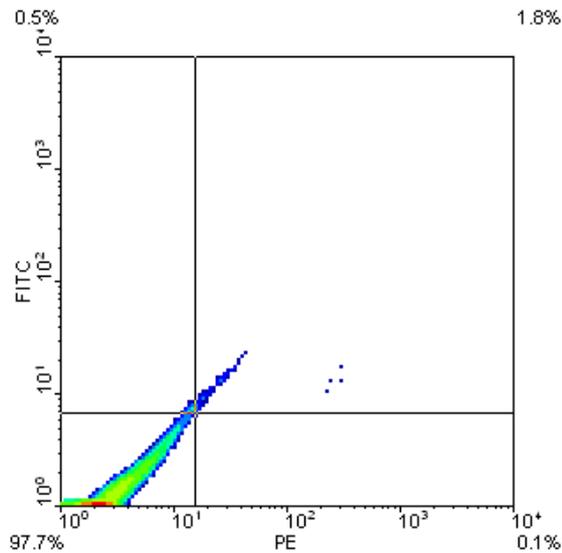


Abb. 3.11:
Patient 4
Anti-CD45 (PE-konjugiert)
 1,8% positiv, 98,2% negativ

3.1.2 Patient 5 und 6

3.1.2.1 Patient 5 und 6: Leermessung und Isotypkontrollen

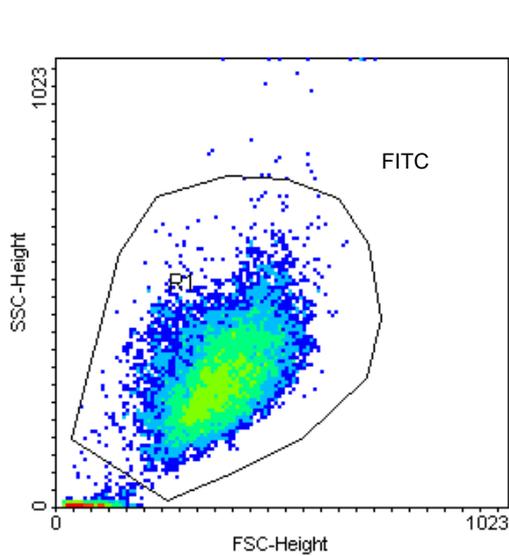


Abb. 3.12:
Patient 5 und 6
Leermessung SSC/FSC
 Festlegung des Gates (Polygon R1)

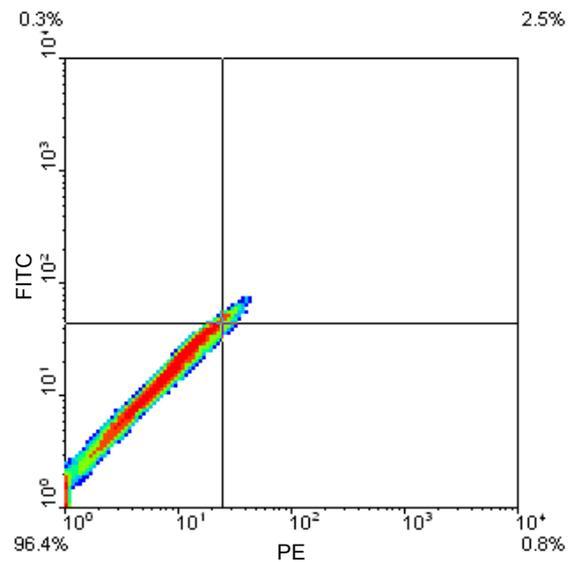


Abb. 3.13:
Patient 5 und 6
Isotypkontrolle FITC
 2,8% positiv, 97,2% negativ

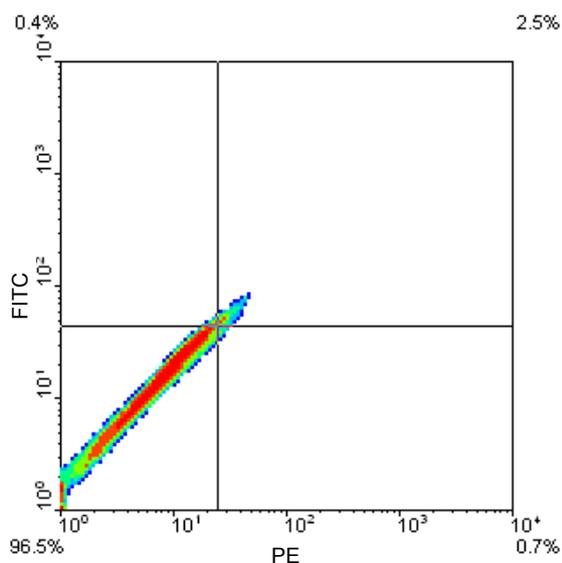


Abb. 3.14:
Patient 5 und 6
Isotypkontrolle PE
 3,1% positiv, 96,9% negativ

3.1.2.2 Patient 5: Bestimmung der Oberflächenantigene

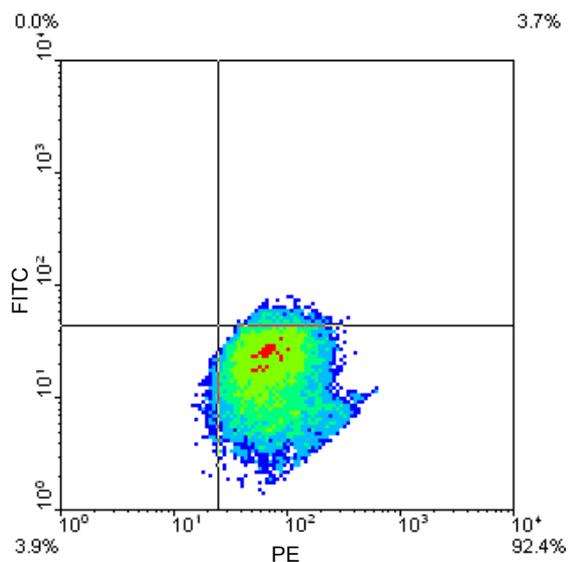


Abb. 3.15:
Patient 5
Anti-CD105 (PE-konjugiert)
 96,3% positiv, 3,7% negativ

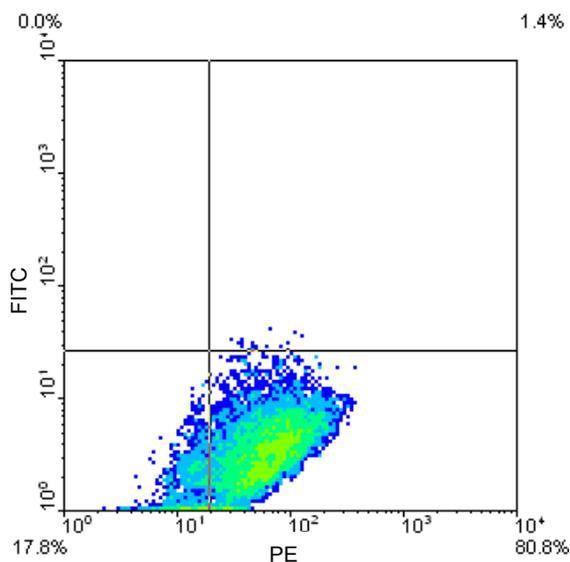


Abb. 3.16:
Patient 5
Anti-CD90 (PE-konjugiert)
 98,6% positiv, 1,4% negativ

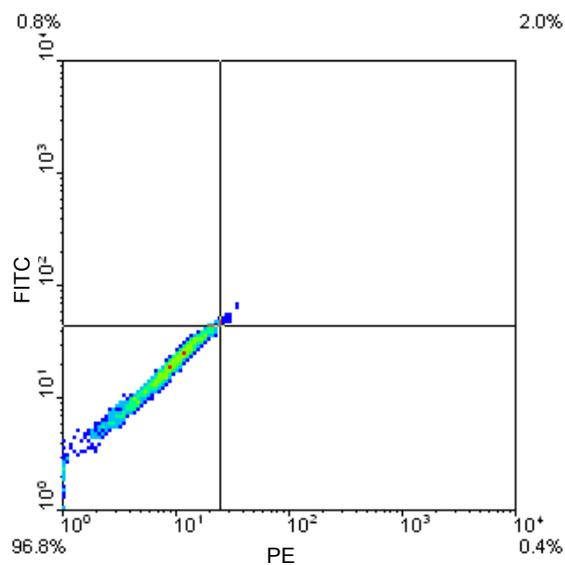


Abb. 3.17:
Patient 5
Anti-CD73 (FITC-konjugiert)
 2,8% positiv, 97,2% negativ

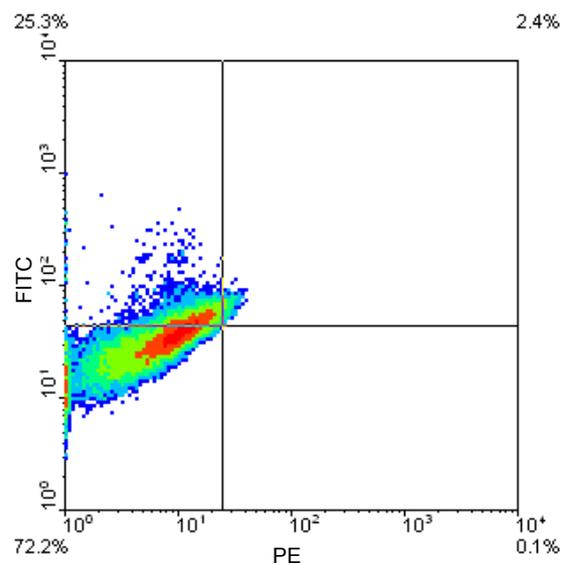


Abb. 3.18:
Patient 5
Anti-STRO-1 (FITC-konjugiert)
 27,7% positiv, 72,3% negativ

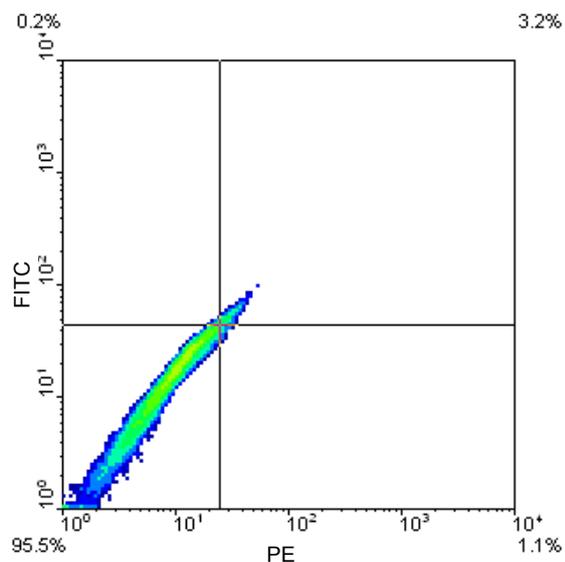


Abb. 3.19:
Patient 5
Anti-CD133 (PE-konjugiert)
 4,3% positiv, 95,7% negativ

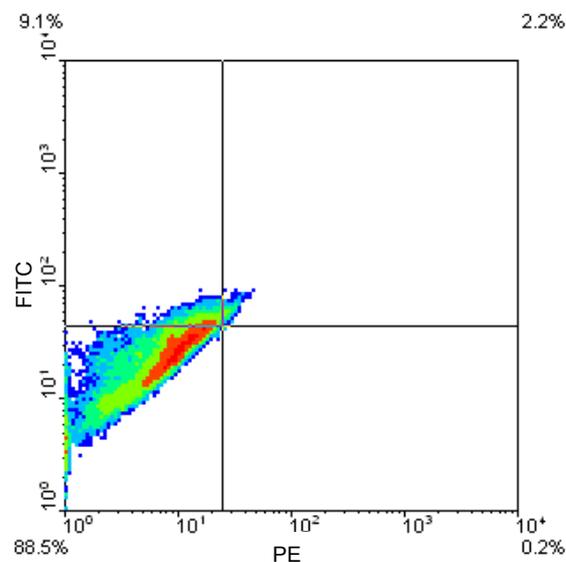


Abb. 3.20:
Patient 5
Anti-CD271 (PE-konjugiert)
 2,4% positiv, 97,6% negativ

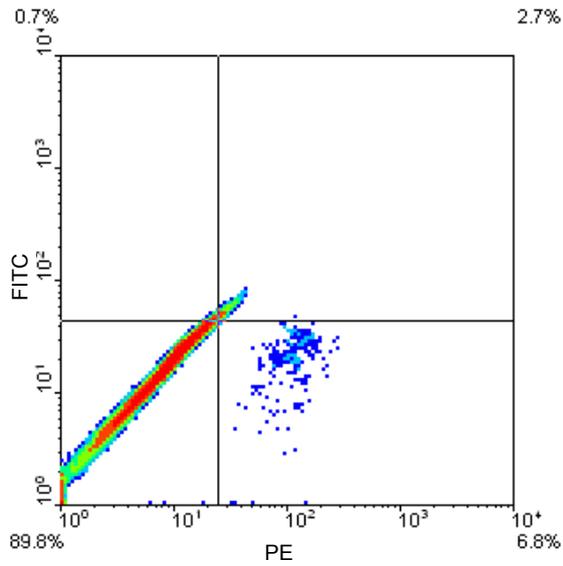


Abb. 3.21:
Patient 5
Anti-CD45 (PE-konjugiert)
 9,5% positiv, 90,5% negativ

3.1.2.3 Patient 6: Bestimmung der Oberflächenantigene

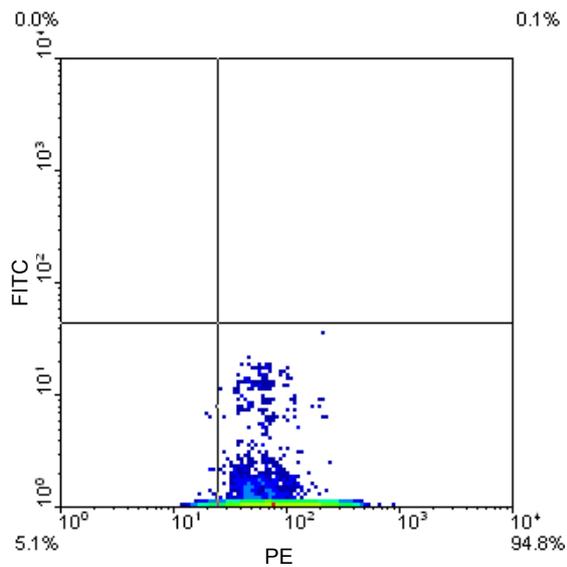


Abb. 3.22:
Patient 6
Anti-CD105 (PE-konjugiert)
 94,9% positiv, 5,1% negativ

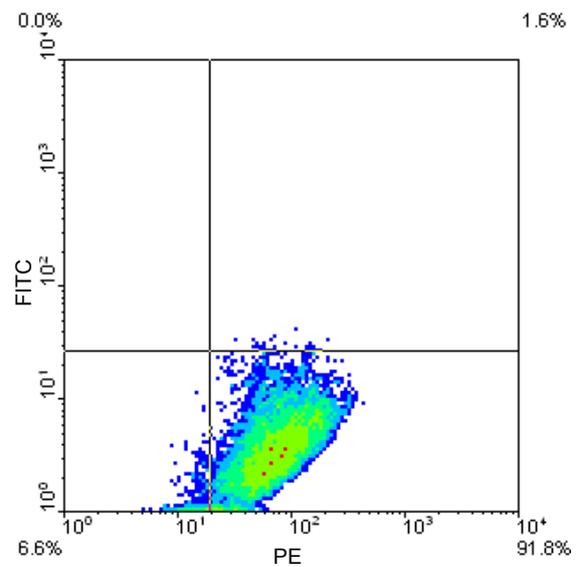


Abb. 3.23:
Patient 6
Anti-CD90 (PE-konjugiert)
 93,4% positiv, 6,6% negativ

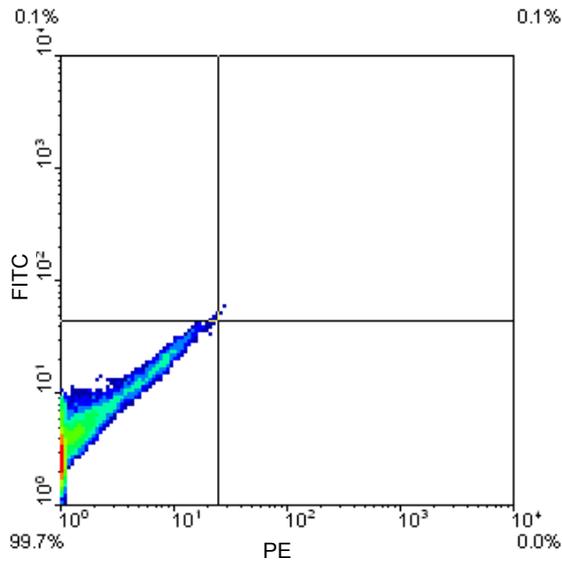


Abb. 3.24:
Patient 6
Anti-CD73 (PE-konjugiert)
 0,2% positiv, 99,8% negativ

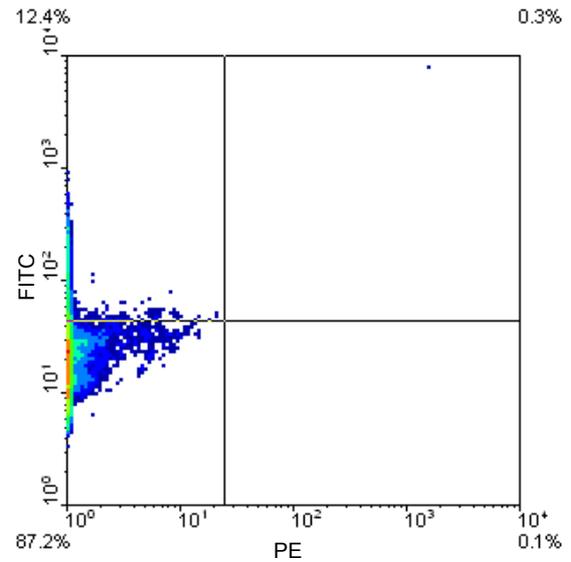


Abb. 3.25:
Patient 6
Anti-STRO-1 (FITC-konjugiert)
 12,7% positiv, 87,3% negativ

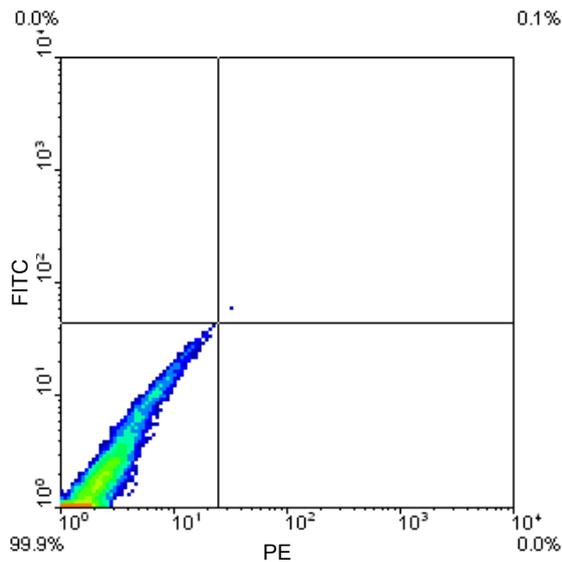


Abb. 3.26:
Patient 6
Anti-CD133 (PE-konjugiert)
 0,1% positiv, 99,9% negativ

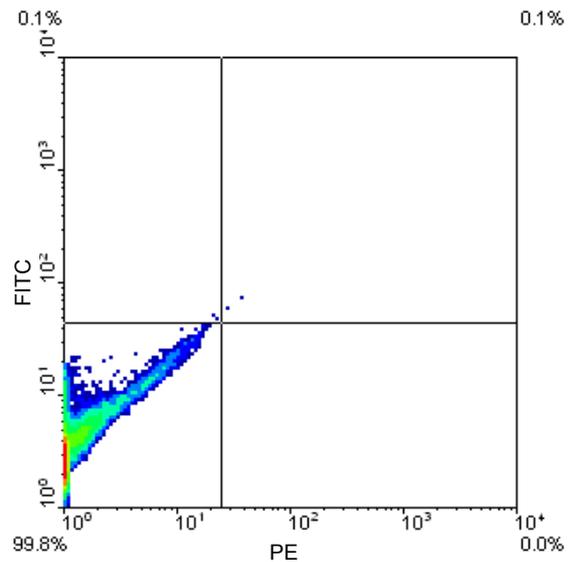


Abb. 3.27:
Patient 6
Anti-CD271 (PE-konjugiert)
 0,1% positiv, 99,9% negativ

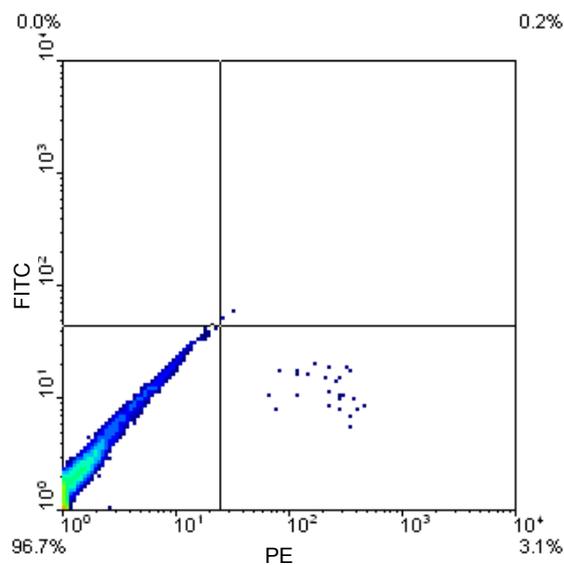


Abb. 3.28:
Patient 6
Anti-CD45 (PE-konjugiert)
 3,3% positiv, 96,7% negativ

3.1.3 Patient 7

3.1.3.1 Patient 7: Leermessung und Isotypkontrollen

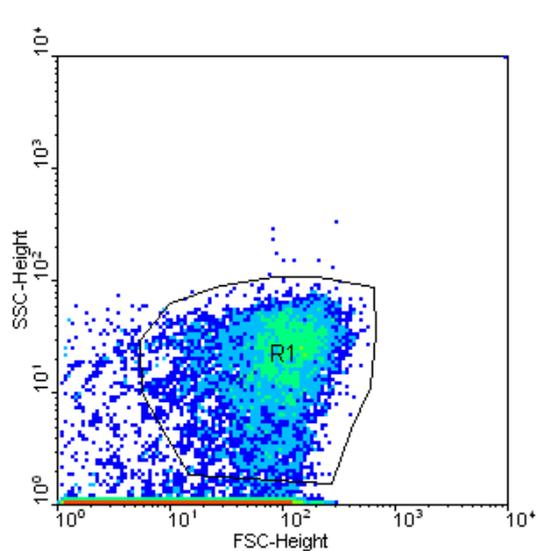


Abb. 3.29:
Patient 7
Leermessung SSC/FSC
 Festlegung des Gates (Polygon R1)

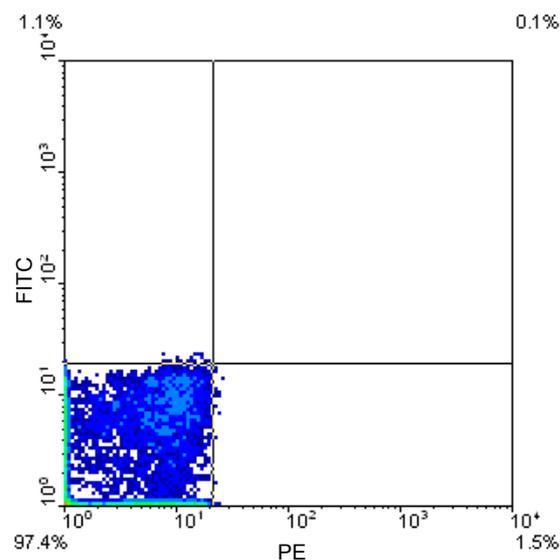


Abb. 3.30:
Patient 7
Isotypkontrolle FITC
 1,1% positiv, 98,9% negativ

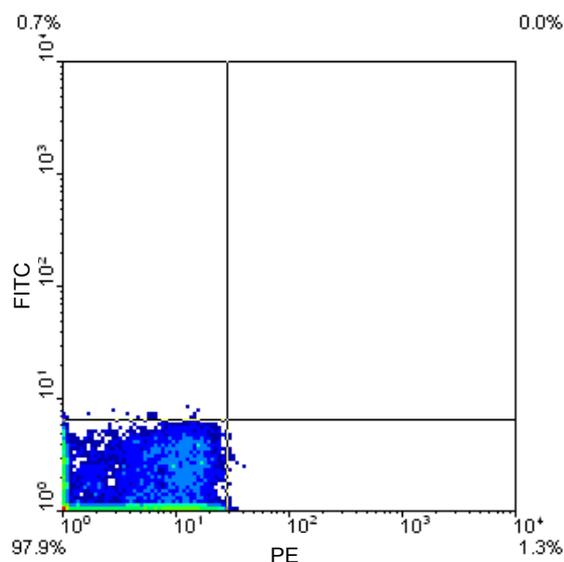


Abb. 3.31:
Patient 7
Isotypkontrolle PE
1,4% positiv, 98,6% negativ

3.1.3.2 Patient 7: Bestimmung der Oberflächenantigene

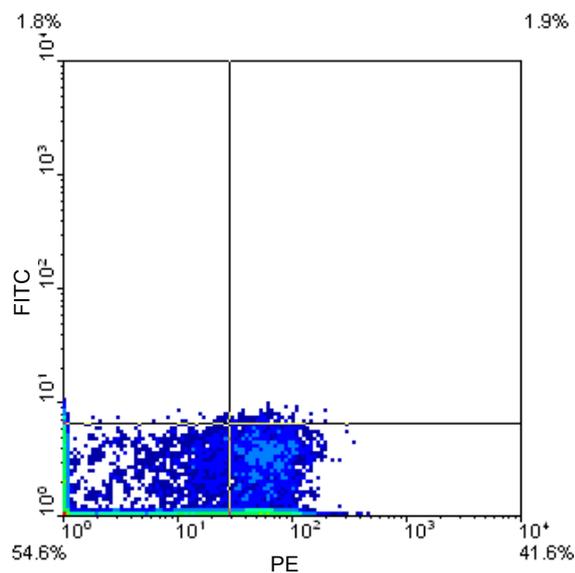


Abb. 3.32:
Patient 7
Anti-CD105 (PE-konjugiert)
96,2% positiv, 93,8% negativ

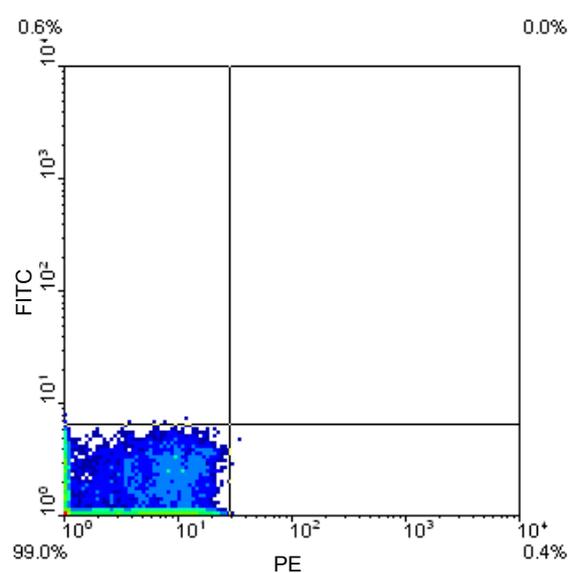


Abb. 3.33:
Patient 7
Anti-CD90 (PE-konjugiert)
0,4% positiv, 99,6% negativ

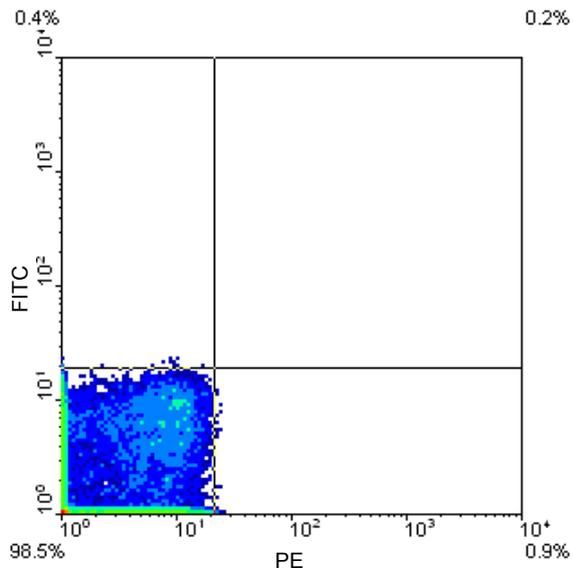


Abb. 3.34:
Patient 7
Anti-CD73 (FITC-konjugiert)
0,6% positiv, 99,4% negativ

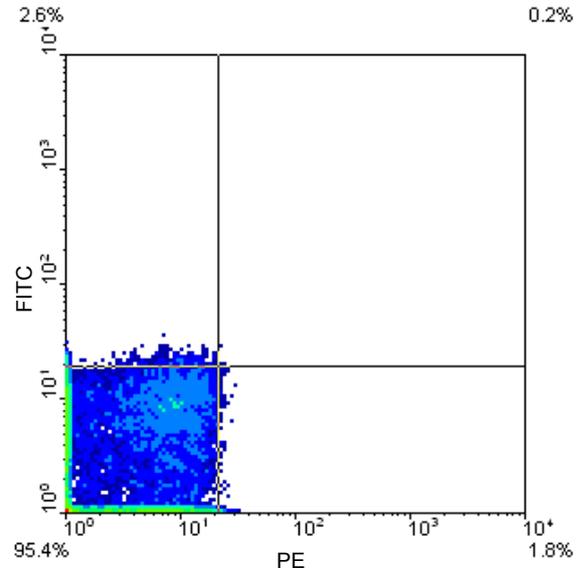


Abb. 3.35:
Patient 7
Anti-STRO-1 (FITC-konjugiert)
2,8% positiv, 97,2% negativ

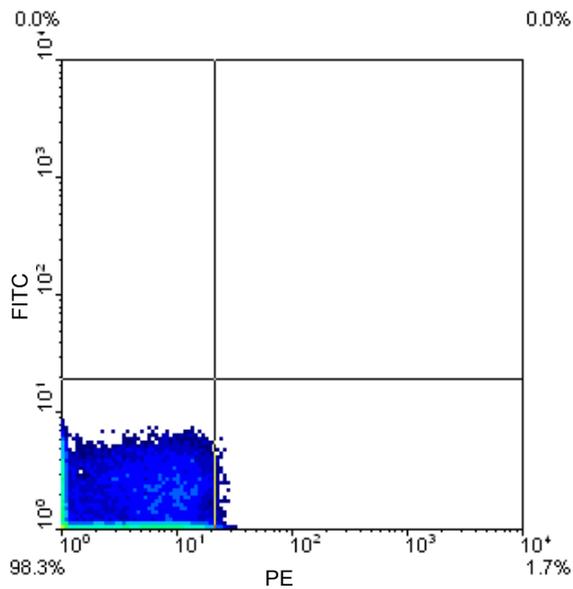


Abb. 3.36:
Patient 7
Anti-CD133 (PE-konjugiert)
1,7% positiv, 98,3% negativ

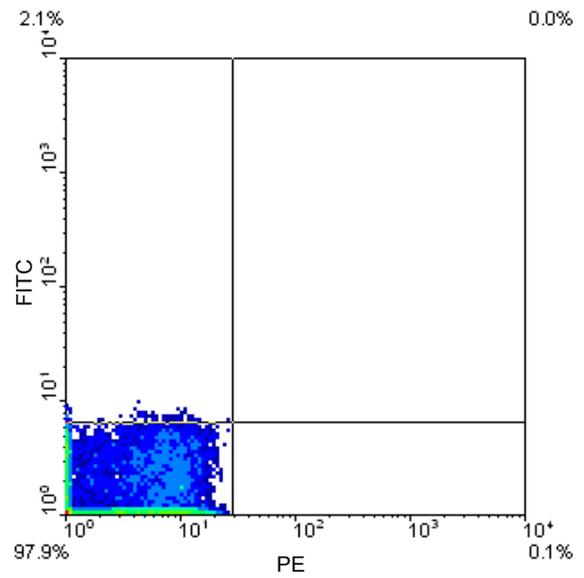


Abb. 3.37:
Patient 7
Anti-CD271 (PE-konjugiert)
0% positiv, 100% negativ

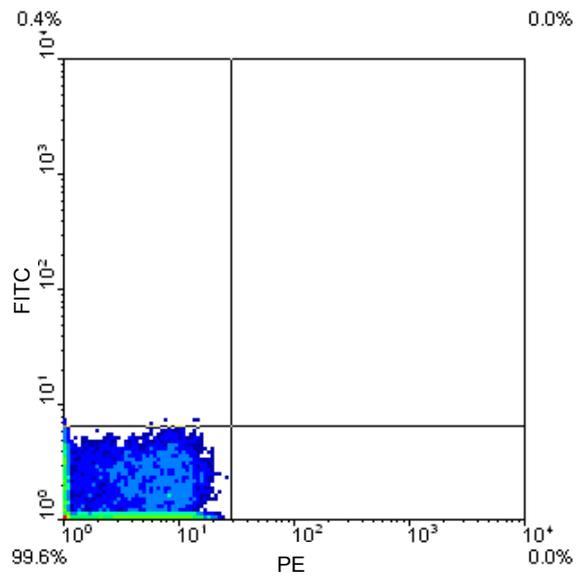


Abb. 3.38:
Patient 7
Anti-CD45 (PE-konjugiert)
0% positiv, 100% negativ

3.2 Zellproliferation in indirekter Kokultur

3.2.1 Proliferation der PCI-13-Zellen

In den beobachteten Kulturansätzen zeigte sich eine kontinuierliche Zellproliferation, die die Zellzahl über den gesamten Beobachtungszeitraum ansteigen ließ. Das Zellwachstum war an den Beobachtungszeitpunkten Tag 4 und Tag 7 zwischen beiden Gruppen vergleichbar und ohne feststellbare wesentliche Differenzen. Morphologisch ließen sich ebenfalls keine wesentlichen Unterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe feststellen. An Tag 14 fiel eine verminderte Proliferation der PCI-13-Zellen in Kokultur gegenüber der Kontrollgruppe auf, die sich in der zweifaktoriellen Varianzanalyse im Gruppenvergleich (Kokultur/Kontrolle, getrennt nach Beobachtungszeitpunkt) als statistisch signifikant erwies ($p=0,0039$).

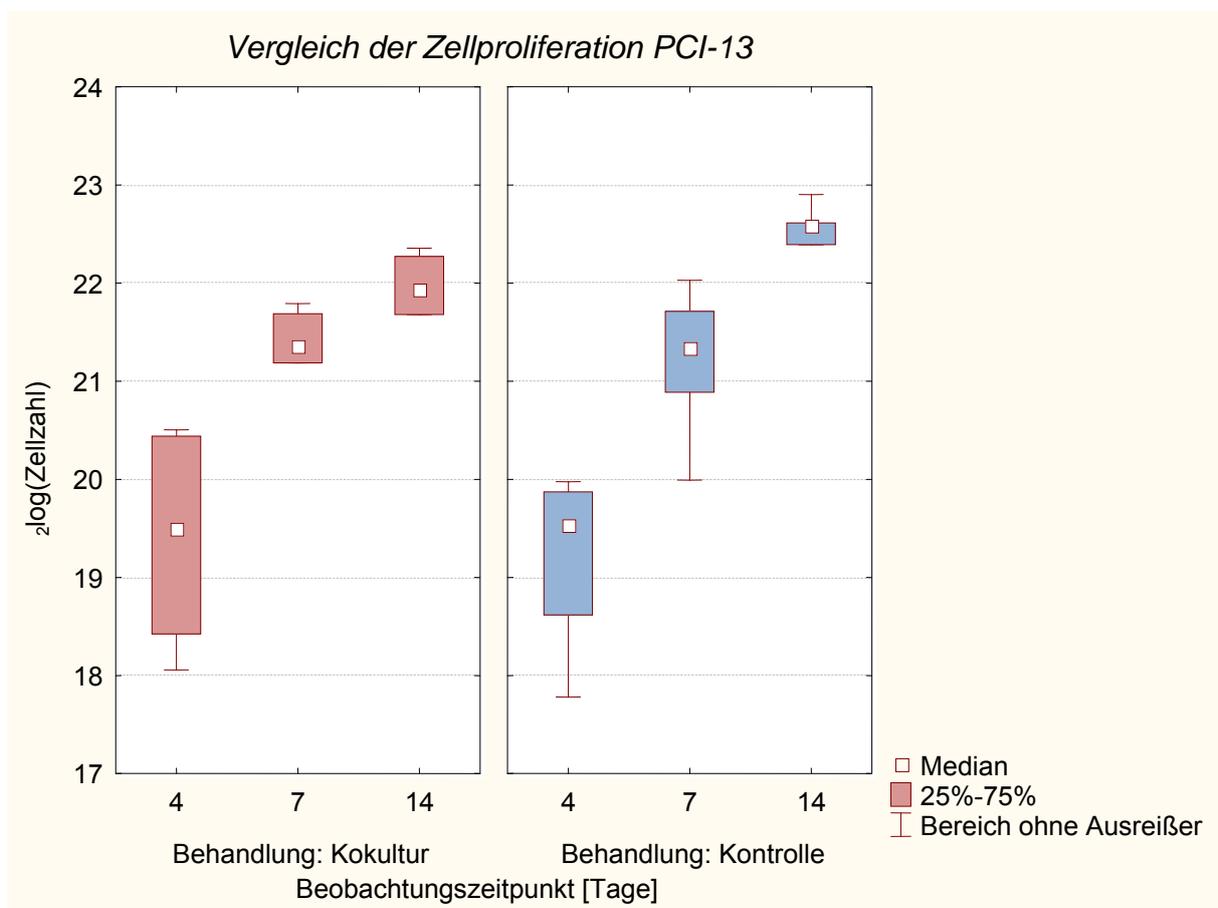


Abb. 3.39: Proliferationsvergleich der PCI-13-Zellen zwischen Kokultur- und Kontrollgruppe

3.2.2 Proliferation der humanen mesenchymalen Stromazellen

Bei der Beobachtung der Zellproliferation der humanen mesenchymalen Stromazellen fiel zunächst wiederum ein kontinuierlich über den gesamten Zeitraum verlaufender Anstieg der gemessenen Zellzahlen auf. An Tag 14 zeigte sich in der Versuchsgruppe ein tendenziell erhöhtes Zellwachstum, das jedoch im Vergleich zur Kontrollgruppe keine statistische Signifikanz in der zweifaktoriellen Varianzanalyse aufwies ($p=0,0873$). Das Wachstumsverhalten der hMSC wies im Vergleich zu den PCI-13-Zellen ein gegensätzliches Muster mit Proliferationssteigerung in der Versuchsgruppe auf.

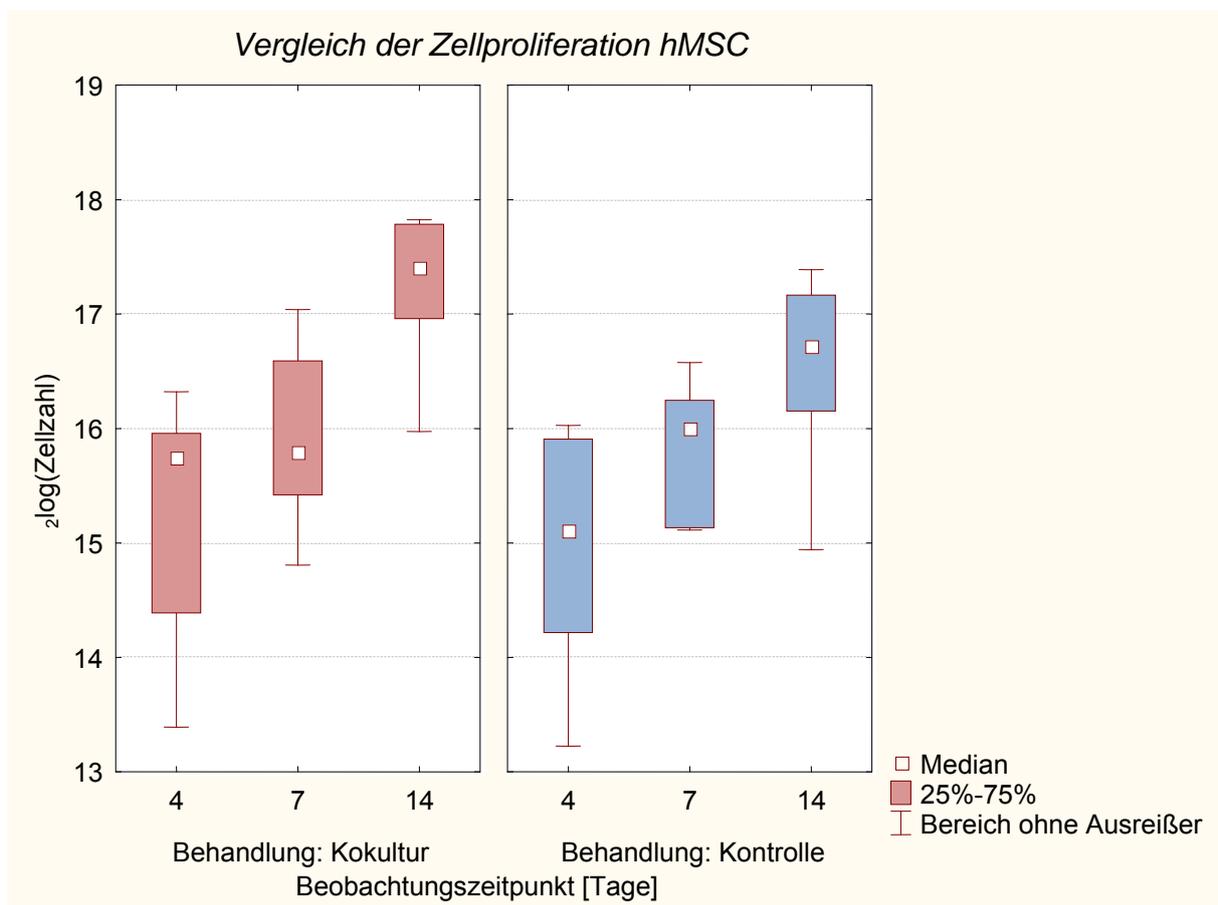


Abb. 3.40: Proliferationsvergleich der humanen mesenchymalen Stromazellen zwischen Kokultur- und Kontrollgruppe

3.2.3 Zusammenfassender Vergleich der Proliferation

Bei der Zellproliferation von PCI-13-Zellen zeigte sich eine im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikante Reduktion der Zellproliferation an Tag 14 der Kokultur. An den Beobachtungszeitpunkten Tag 4 und Tag 7 ließen sich keine signifikanten Proliferationsunterschiede zwischen beiden Gruppen feststellen. Die Zellzahl der Tumorzellen war sowohl in der Kokultur- als auch in der Kontrollgruppe hochsignifikant abhängig vom Beobachtungszeitpunkt ($p < 0,0001$) und stieg über den Beobachtungszeitraum kontinuierlich an.

Bezüglich der Zellproliferation bei humanen mesenchymalen Stromazellen war festzustellen, dass im Gruppenvergleich eine tendenziell erhöhte Zellzahl an Tag 14 der Kokultur vorlag. Eine statistische Signifikanz war nicht nachweisbar ($p = 0,0873$), jedoch stand dieses Ergebnis im Gegensatz zur Proliferationsbeobachtung bei den PCI-13-Zellen. Auch bei den humanen mesenchymalen Stromazellen war eine kontinuierliche Zellproliferation über den Beobachtungszeitraum hinweg festzustellen. Die gemessene Zellzahl war in der Kokultur- und Kontrollgruppe wiederum hochsignifikant abhängig vom Beobachtungszeitpunkt ($p < 0,0001$).

3.3 Genexpression

3.3.1 Genexpression von WNT3

Bei der relativen Quantifizierung der Genexpression von WNT3 fiel zunächst auf, dass eine deutliche Abhängigkeit der Expressionsraten vom Beobachtungszeitpunkt bestand, die auch eine hohe statistische Signifikanz aufwies ($p=0,0003$). Am Beobachtungstag 7 kam es in der Kokultur zu einem ausgeprägten Einbruch der Genexpression, der in der Kontrollgruppe nicht nachweisbar war und sich durch eine statistische Signifikanz im Gruppenvergleich auszeichnete ($p=0,0249$). An Tag 4 und 14 ließen sich keine nennenswerten Gruppenunterschiede in der Genexpression von WNT3 feststellen.

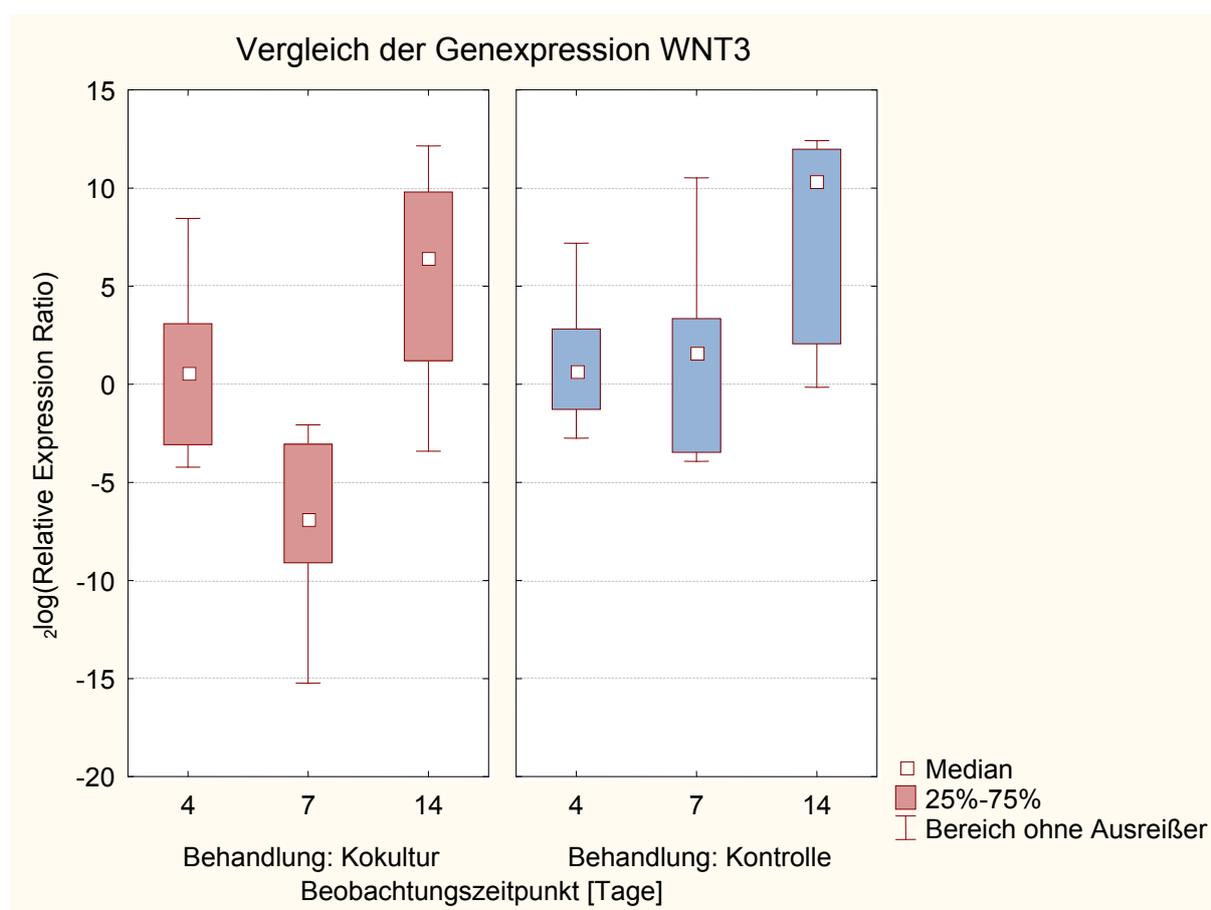


Abb. 3.41: Genexpressionsvergleich (relative Quantifizierung) von WNT3 zwischen Kokultur- und Kontrollgruppe

3.3.2 Genexpression von MMP14

Betrachtete man die relative Quantifizierung der Genexpression von MMP14, so fiel auf, dass auch hier eine deutliche Abhängigkeit der Genexpression vom Beobachtungszeitpunkt bestand, die sich durch eine hohe statistische Signifikanz belegen ließ ($p < 0,0001$). Die Streuung zwischen den gemessenen Werten fiel in der Kontrollgruppe an Tag 7 und Tag 14 deutlich geringer aus. An den Tagen 4 und 7 bestand eine im Gruppenvergleich hochsignifikant verminderte Genexpression von MMP14 in der Kokulturgruppe ($p = 0,0004$). Die beobachteten Genexpressionsraten zeigten in beiden Gruppen einen kontinuierlichen Anstieg bei Betrachtung aller Beobachtungszeitpunkte.

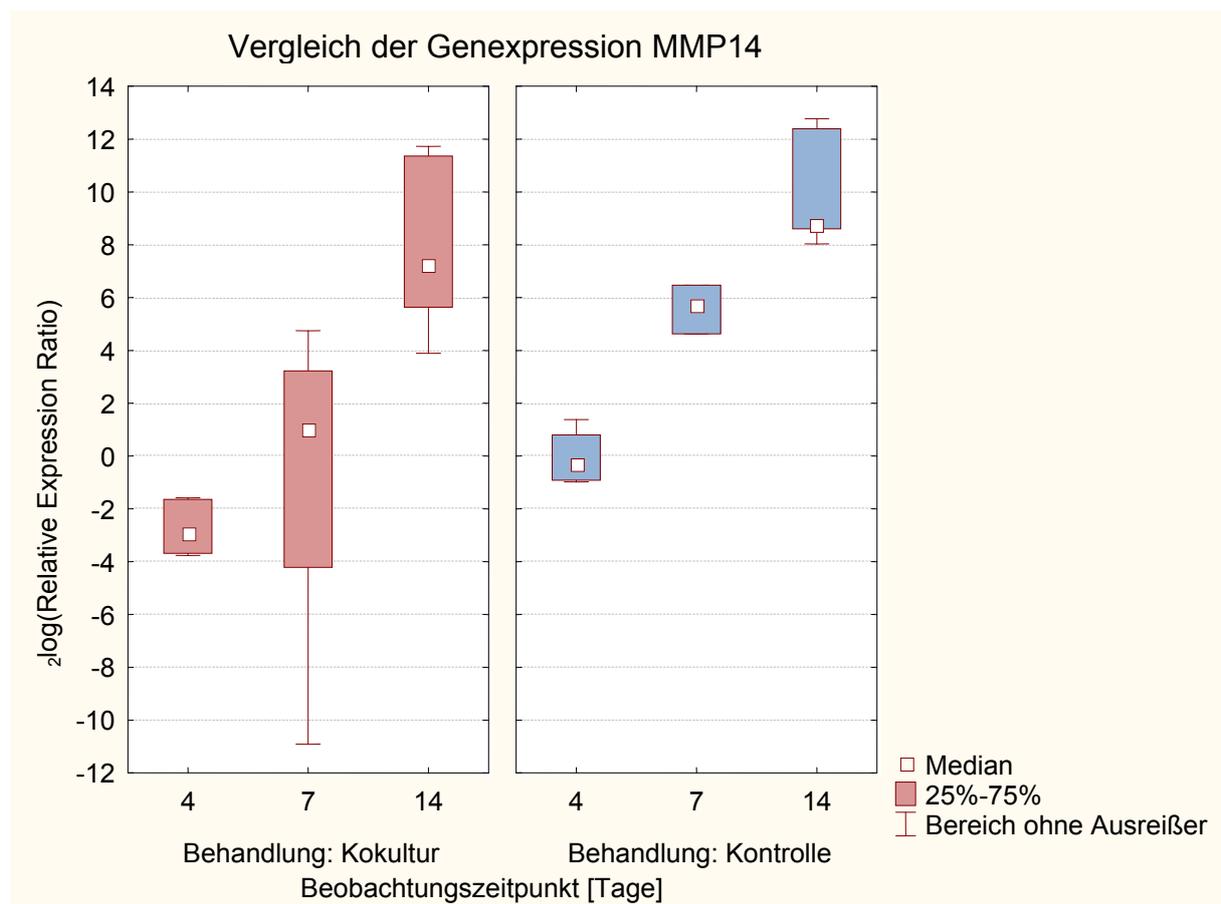


Abb. 3.42: Genexpressionsvergleich (relative Quantifizierung) von MMP14 zwischen Kokultur- und Kontrollgruppe

3.3.3 Genexpression von CTNNB1

Die relative Quantifizierung der Genexpression von CTNNB1 zeigte zunächst keine signifikante Abhängigkeit vom jeweiligen Beobachtungszeitpunkt ($p=0,2105$). Auffällig war jedoch, dass es beim Vergleich von Versuchs- und Kontrollgruppe in der Kokulturgruppe eine Tendenz zur Verminderung der Genexpression an Tag 7 gab, wogegen in der Kontrollgruppe die mittlere Genexpression an Tag 7 sogar die an Tag 14 überstieg. Eine statistische Signifikanz wiesen diese Beobachtungen nicht auf ($p=0,0863$). Es lag zudem eine relativ große Streubreite der Messwerte in beiden Gruppen vor, hauptsächlich an Beobachtungstag 7. Ein kontinuierlicher Genexpressionsanstieg über den Beobachtungszeitraum lag in keiner Gruppe vor.

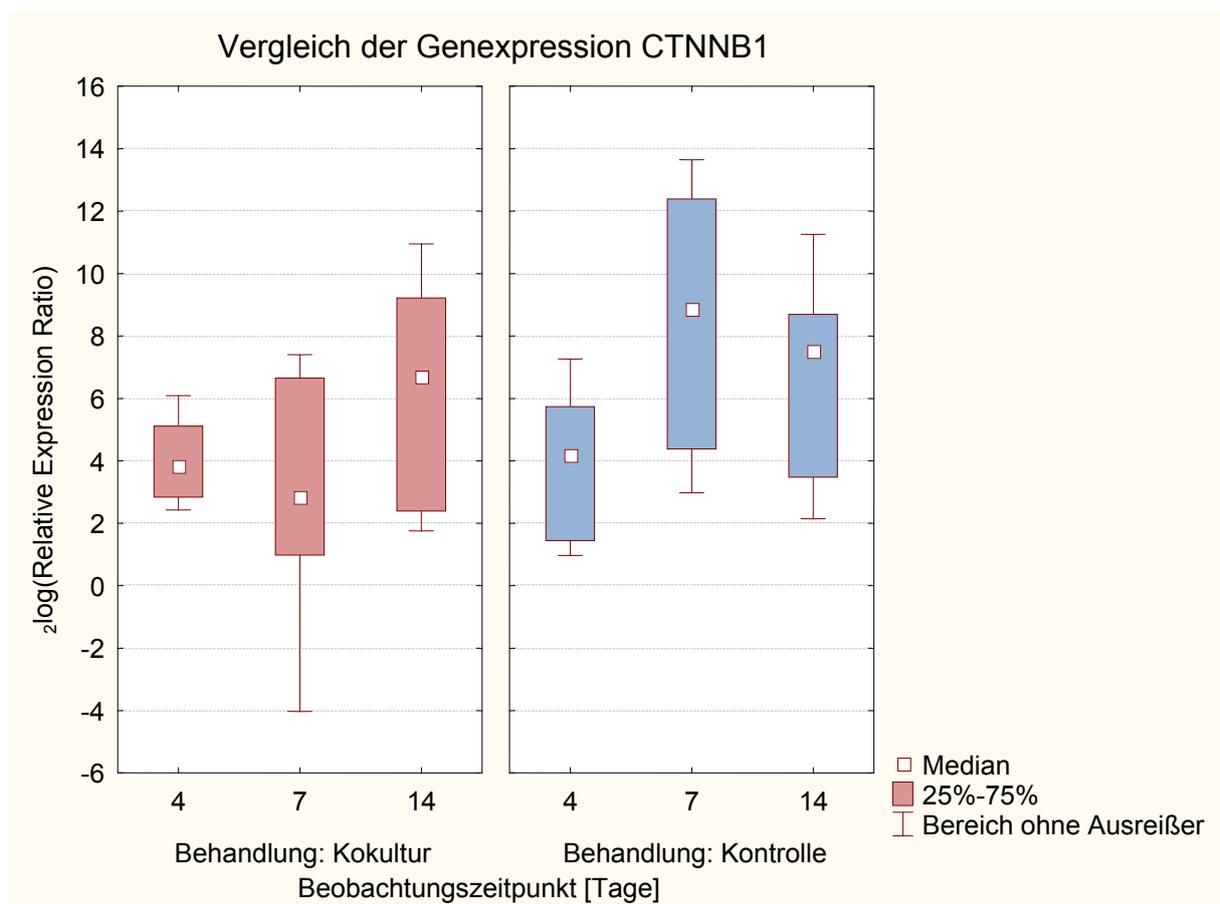


Abb. 3.43: Genexpressionsvergleich (relative Quantifizierung) von CTNNB1 zwischen Kokultur- und Kontrollgruppe

3.3.4 Genexpression von CDH1

Bei der Betrachtung der Genexpression von CDH1 mittels relativer Quantifizierung fiel zunächst auf, dass sowohl in der Versuchs- als auch in der Kontrollgruppe ein kontinuierlicher Anstieg der Expressionsraten über den Beobachtungszeitraum vorlag. Die Genexpression korrelierte hochsignifikant mit den Beobachtungszeitpunkten ($p < 0,0001$). Vergleich man Kokultur- und Kontrollgruppe, so zeigte sich an Tag 7 eine in der Kokulturgruppe signifikant verminderte Genexpression ($p = 0,0155$). Die Mediane der Expressionsraten unterschieden sich hingegen an Tag 7 kaum und glichen sich an Tag 14 zwischen beiden Gruppen wieder an. Auffällig war des Weiteren die geringe Streubreite der Messwerte an Tag 14 innerhalb der Kontrollgruppe.

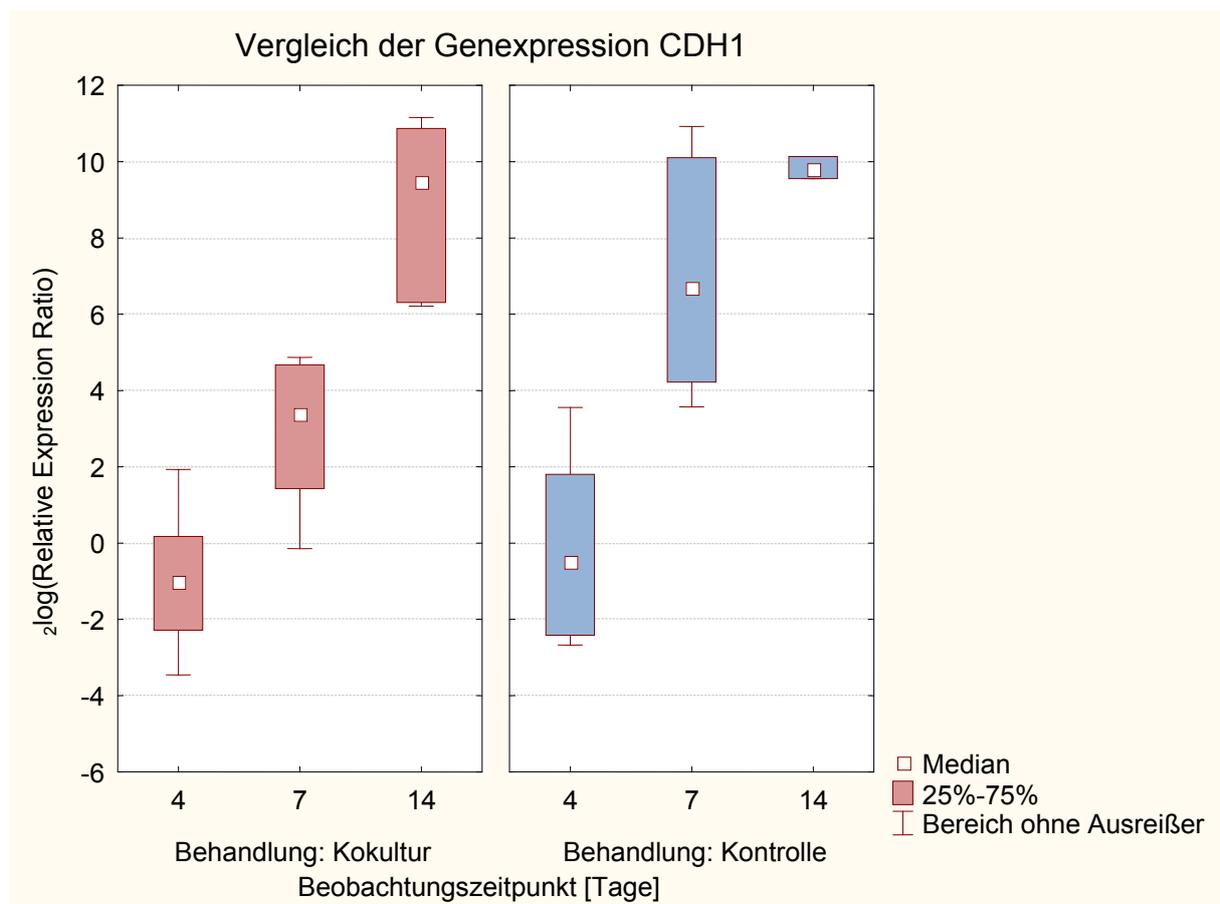


Abb. 3.44: Genexpressionsvergleich (relative Quantifizierung) von CDH1 zwischen Kokultur- und Kontrollgruppe

3.3.5 Genexpression von CTSB

Die Analyse der Genexpression von CTSB zeigte beim Vergleich der Untersuchungszeitpunkte wiederum einen hochsignifikanten Einfluss auf die Expressionsraten ($p < 0,0001$). Der Genexpressionsverlauf zeigte einen kontinuierlichen Anstieg über den Beobachtungszeitraum, signifikante Gruppenunterschiede ließen sich jedoch nicht feststellen ($p = 0,5193$). Auffällig war jedoch, dass der Median der Expressionsrate an Tag 14 in der Versuchsgruppe gegenüber der Kontrollgruppe erhöht war und sich daher eine tendenziell erhöhte Genexpression für CTSB annehmen ließ.

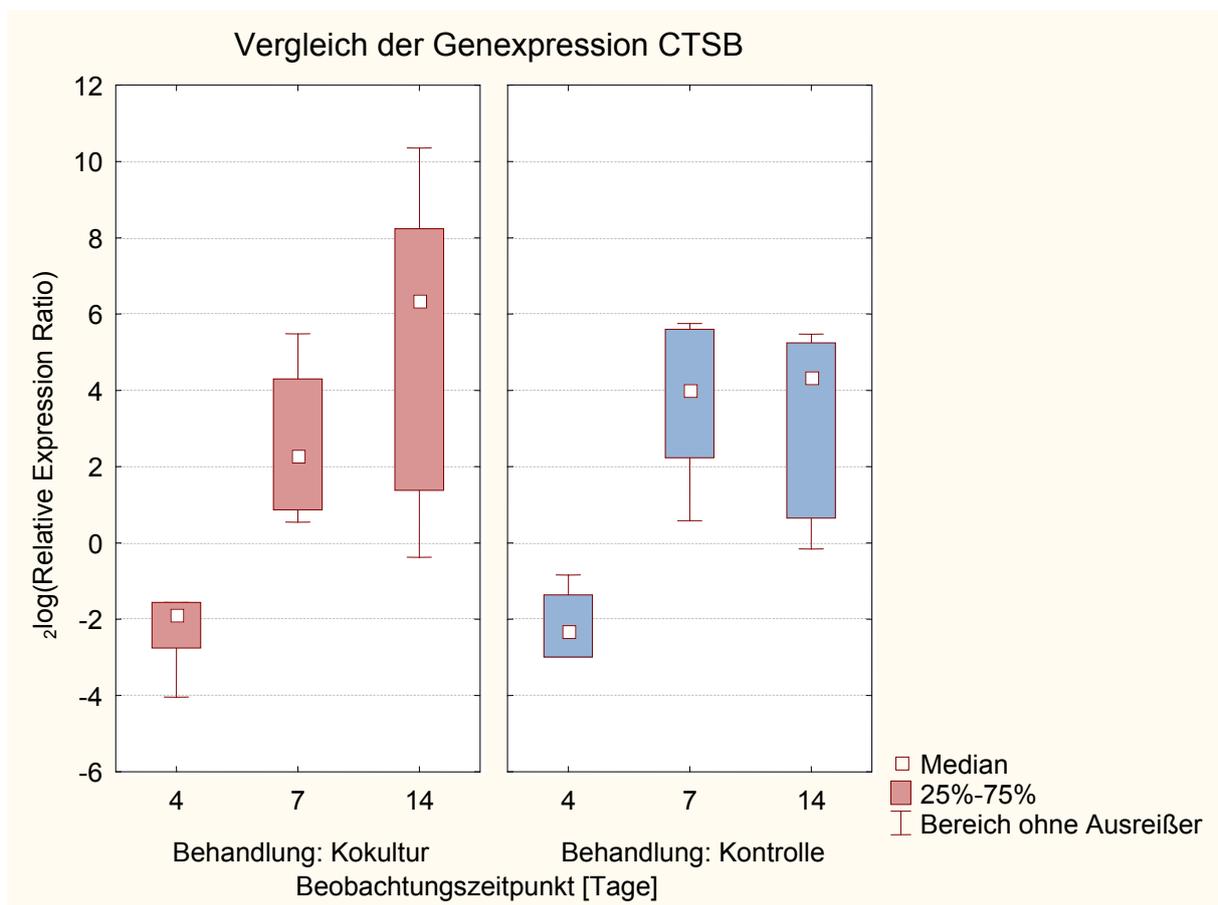


Abb. 3.45: Genexpressionsvergleich (relative Quantifizierung) von CTSB zwischen Kokultur- und Kontrollgruppe

3.3.6 Genexpression von ETS1

Die Genexpression von ETS1 zeigte in beiden Gruppen einen zunächst von Tag 4 auf Tag 7 absinkenden Verlauf, die Expressionsrate stieg später jedoch bis zu Tag 14 stark an. Auch hier waren die Expressionsraten hochsignifikant abhängig von den Beobachtungszeitpunkten ($p < 0,0001$). Signifikante Expressionsunterschiede zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe konnten für ETS1 nicht festgestellt werden ($p = 0,8865$).

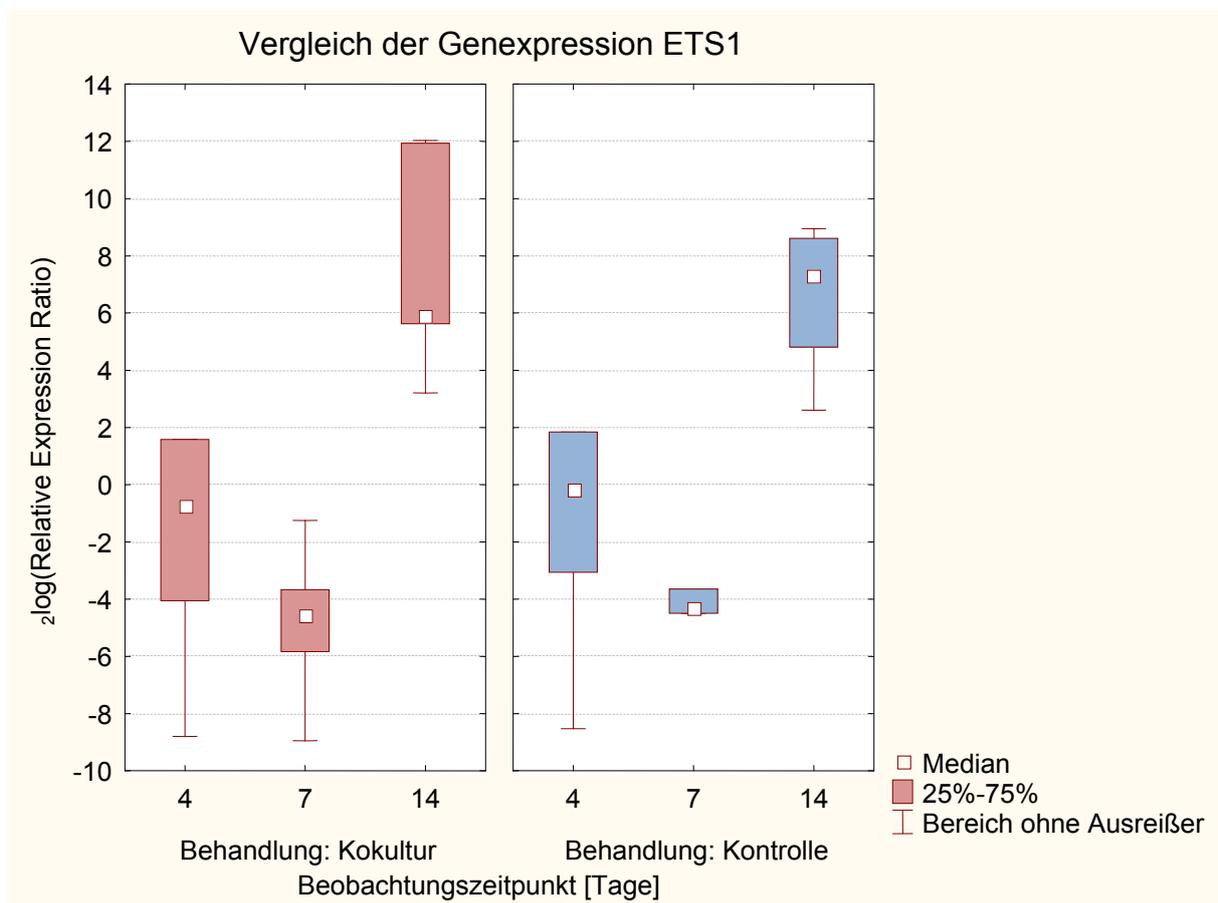


Abb. 3.46: Genexpressionsvergleich (relative Quantifizierung) von ETS1 zwischen Kokultur- und Kontrollgruppe

3.3.7 Zusammenfassender Vergleich der Genexpressionsraten

Für die relative Quantifizierung der Genexpression mittels qPCR ließ sich zusammenfassend festhalten, dass es statistisch signifikante Unterschiede der Expressionsraten zwischen Kokultur- und Kontrollgruppe gab. Diese traten an Beobachtungstag 7 für die Transkripte WNT3 (für das Genprodukt Wnt-3) und CDH1 (für das Genprodukt E-Cadherin) auf. Hierbei zeigte sich in beiden Fällen eine Verminderung der Genexpression in der Gruppe der mit humanen mesenchymalen Stromazellen kokultivierten PCI-13-Zellen. Bei dem Transkript MMP14 (für das Genprodukt Matrix-Metalloproteinase 14) fiel schon an Tag 4 eine statistisch signifikante Genexpressionsminderung in der Kokultur auf, die an Tag 7 fortbestand. An Tag 14 hatten sich für alle der genannten Transkripte die Expressionsraten im Gruppenvergleich wieder angeglichen.

Für alle Transkripte mit Ausnahme von CTNNB1 (für das Genprodukt β -Catenin) zeigt sich ein hochsignifikanter Einfluss des Beobachtungszeitpunkts auf die Höhe der Expressionsrate. Der Verlauf der Expressionsraten über den Beobachtungszeitraum verlief bei MMP14, CDH1 und CTSB (für das Genprodukt Cathepsin B) kontinuierlich ansteigend. Bei WNT3 und ETS1 (für das Genprodukt Ets-1) zeigte sich ein in beiden Gruppen auftretender Genexpressionsabfall an Tag 7. Bei CTNNB1 fand sich in der Versuchsgruppe ein Abfall der Expressionsrate an Tag 7, der in der Kontrollgruppe nicht vorzufinden war.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Analysen mittels Durchflusszytometrie haben sich als Standardverfahren in vielen Bereichen der Zellcharakterisierung etabliert (BACHER et al. 2009, BARLOGIE et al. 1983, BUCHNER et al. 1971). Für die Analyse einer Zellpopulation nach Vorhandensein bestimmter Oberflächenantigene stellt die FACS-Analyse eine vorteilhafte Methode dar, da durch sie eine unkomplizierte Beurteilung des Zellcharakters durch Quantifizierung der vorhandenen Oberflächenantigene möglich ist.

Zusätzlich zur durchgeführten Dichtegradientenzentrifugation zur Auftrennung des Knochenmarkstromas (FIERRO et al. 2004) konnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie der mesenchymale Charakter der gewonnenen Knochenmarkstromazellen weitgehend bestätigt werden.

Die Zellcharakterisierung der Knochenmarkstromazellen wurde zu Beginn der Kokultur durchgeführt, um den mesenchymalen Zellstatus an diesem Zeitpunkt zu prüfen. Nachteilig ist, dass eventuelle Differenzierungsvorgänge während der späteren Kulturphase nicht molekularbiologisch berücksichtigt werden können. Es wurde jedoch durch zytomorphologische Kontrollen zu den jeweiligen Beobachtungszeitpunkten der phänotypische mesenchymale Zellcharakter überprüft, der sich nicht von der Zellmorphologie zum Zeitpunkt der FACS-Analyse unterschied.

4.1.2 Indirekte Kokultur

Als *in-vitro*-Modell für die Interaktion von mesenchymalen Stromazellen und Plattenepithelkarzinomzellen des Oropharynx wurde die indirekte Kokultur im Transwell-Verfahren gewählt. Es handelt sich hierbei um eine vielfach erprobte und etablierte Zellkulturmethode (BOYERA et al. 1993, GACHE et al. 1998, HENEWEER et al. 2005). Mit Hilfe dieser Methode lässt sich eine separate Kultur beider Zelltypen realisieren, wobei dennoch eine parakrine Interaktion mittels Mediatoren über das gemeinsame Kulturmedium möglich ist. Für die Versuchs- und Kontrollgruppen

lassen sich mit Hilfe dieses Verfahrens sehr ähnliche, reproduzierbare und gut kontrollierbare Rahmenbedingungen schaffen. Als einzige Variable zwischen Kokultur und Kontrolle dient die Präsenz bzw. das Fehlen mesenchymaler Stromazellen bei ansonsten identischem Versuchsaufbau. Beide Zelltypen lassen sich durch die Trennung mittels semipermeabler Membran problemlos einzeln isolieren und für weitere Versuchsschritte aufarbeiten. Vor allem für die durchgeführten Zellzählungen nach 4, 7 und 14 Tagen stellt dies einen entscheidenden Vorteil dar, da durch die angewandte Methode keine aufwändigen Trennverfahren notwendig sind.

Als Nachteil der indirekten Kokultur kann angeführt werden, dass die Auswirkungen direkter Zell-Zell-Kontakte zwischen Tumor- und mesenchymalen Stromazellen im Versuchsaufbau nicht berücksichtigt werden können. Die heterotype Zell-Zell-Kommunikation erfolgt ausschließlich parakrin über das Medium.

4.1.3 Reverse Transcription Quantitative PCR (RT-qPCR)

Die Methode der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) hat sich in weiten Bereichen der molekularbiologischen Forschung und Diagnostik als Standardverfahren zur relativen und absoluten Quantifikation von DNA-Sequenzen in Biomaterialien etabliert (KUBISTA et al. 2006). In Kombination mit der reversen Transkription von RNA in cDNA stellt sie als RT-qPCR ein nützliches Hilfsmittel zur Quantifikation von Genexpressionsraten sowohl in Geweben als auch in kultivierten Zellen dar (BUSTIN und MUELLER 2005).

Die Detektion der amplifizierten Gensequenzen erfolgte mittels SYBR-Green als Fluorophor. Durch eine Fluoreszenz bei Bindung doppelsträngiger DNA lässt sich die Amplifikation während der PCR unmittelbar verfolgen sowie photometrisch quantifizieren. Zur Quantifikation wird der Zyklus, in dem die ermittelte Menge an amplifizierter DNA der Probe einen bestimmten Messwert überschreitet, in Beziehung zu einer Kontrollprobe gesetzt, deren Schwellenzyklus bekannt ist. Diese Methode ist der Endpunkt-PCR überlegen, bei der eine semiquantitative Anfärbung einer Gelelektrophoresebande durchgeführt wird. Bei der zuletzt genannten Methode kann nicht nur die eingesetzte DNA-Menge sondern auch die Effizienz der PCR-Reaktion das Messergebnis beeinflussen (SCHMITTGEN et al. 2000).

Für die Detektion doppelsträngiger DNA in Echtzeit existieren mehrere Methoden. In der durchgeführten Untersuchung wurde ein konfektionierter PCR-Kit mit SYBR Green verwendet, wodurch eine hohe Konsistenz der Probenzusammensetzung gewährleistet wurde. Vorteil der Verwendung von SYBR Green als Fluorophor ist die hohe Sensitivität im Vergleich zu Ethidiumbromid und die proportionale Fluoreszenzaktivität zur Menge an Doppelstrang-DNA. Einen Nachteil stellt die Möglichkeit der artifiziellen Beeinflussung des detektierten Signals durch unspezifische PCR-Produkte dar (SCHNEEBERGER et al. 1995). Nach jeder DNA-Quantifikation wurde daher eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um etwaige unspezifisch amplifizierte Sequenzen auszuschließen (RIRIE et al. 1997). Untersuchungen mit TaqMan-Sonden könnten als alternative Methode zur Detektion mittels SYBR Green dienen, da sie keine Schmelzkurvenanalyse benötigen und damit einen ökonomischeren Arbeitsablauf bieten. Zu bedenken ist jedoch, dass TaqMan-Assays im Vergleich zu SYBR Green über eine reduzierte Präzision verfügen (SCHMITTGEN et al. 2000). Für die hier vorliegende Arbeit wurde daher der Analyse mittels SYBR Green und Schmelzkurvenanalyse der Vorzug gegeben. In den Schmelzkurvenanalysen ergab sich kein Anhalt für amplifizierte Nebenprodukte, sodass davon auszugehen ist, dass es sich um einen spezifischen Nachweis der zu erwartenden Sequenzen handelt.

Bei der RT-qPCR kann mit Hilfe reverser Transkription die Genexpression auf mRNA-Ebene untersucht werden. Es können somit Transkriptionsunterschiede zwischen verschiedenen Proben erfasst werden, die regulativ oder durch genomische Differenzen bedingt sein können. Im weiteren Verlauf der Translation kommt es meist zu zusätzlichen regulativen Einflüssen auf die Proteinbiosynthese, so dass Folgerungen bezüglich der Synthese des entsprechend codierten Proteins nur mit Einschränkungen möglich sind. Funktionelle Konsequenzen lassen sich nur bei Annahme einer Proportionalität der Translation zur Transkription erwarten.

4.2 Parakrine Einflüsse humaner mesenchymaler Stromazellen auf die Proliferation von PCI-13-Zellen

Bei unseren Untersuchungen konnten wir eine gegenüber der Kontrollgruppe statistisch signifikante Reduktion der Proliferation von PCI-13-Zellen in Kokultur mit humanen mesenchymalen Stromazellen an Tag 14 feststellen. Demgegenüber

zeigte sich bei den kokultivierten humanen mesenchymalen Stromazellen eine Tendenz zur Proliferationszunahme in der Kokultur an Tag 14, die jedoch keine statistische Signifikanz aufwies. Es wurde sowohl in der Kokultur- als auch in der Kontrollgruppe eine über den Beobachtungszeitraum kontinuierlich zunehmende Zellzahl bei PCI-13 und bei hMSC beobachtet.

Unsere Beobachtungen weisen erstmals darauf hin, dass zwischen PCI-13-Zellen und humanen mesenchymalen Stromazellen in indirekter Kokultur gegenseitige parakrine Einflüsse bestehen. Diese führen möglicherweise zur oben beschriebenen Abnahme der Tumorzellproliferation und zu einer tendenziellen Zunahme der Stromazellproliferation. Dieser Aspekt spricht gegen eine Konkurrenz der unterschiedlichen Zelltypen um das Kulturmedium in Kokultur, da es in diesem Fall zu einer Proliferationsabnahme bei beiden Zellpopulationen kommen würde.

Die Ergebnisse korrelieren mit denen früherer experimenteller Untersuchungen, die für andere maligne Tumorzellentitäten eine in Kokultur mit hMSC ähnliche Proliferationsabnahme gezeigt haben. Dies gilt für humane Zelllinien des Mammakarzinoms (FIERRO et al. 2004, HOMBAUER und MINGUELL 2000), für Zellen des hepatozellulären Karzinoms (QIAO et al. 2008) und für Zellen der myeloischen Leukämie (ZHU et al. 2009).

Für die beobachtete Proliferationsabnahme der oropharyngealen Plattenepithelkarzinomzellen in der Kokultur können verschiedene Mechanismen der heterotyp-parakrinen Zell-Zell-Interaktion als Erklärungsansatz herangezogen werden. Als Regulatoren der Tumorzellproliferation und -Differenzierung kommen u.a. Stufen des Wnt- β -Catenin-Signaltransduktionswegs in Frage. Innerhalb von malignen Tumorzellpopulationen, so auch beim Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereichs, tritt eine erhöhte Expression von Wnt und Frizzled-Rezeptoren auf (DIAZ PRADO et al. 2009, URAGUCHI et al. 2004). Durch Blockierung von Wnt-1 mittels spezifischer Antikörper konnte *in vitro* eine Abnahme der Tumorzellproliferation induziert werden (RHEE et al. 2002). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass humane mesenchymale Stromazellen durch Sekretion des Wnt-Inhibitors Dickkopf-1 (DKK-1) die Tumorzellproliferation hemmen können (ZHU et al. 2009).

Aus vorangehenden Untersuchungen ist bekannt, dass tumorassoziierte Fibroblasten als Bestandteil des Tumorstromas fördernde Einflüsse auf die Tumorinvasivität und

-angiogene Genese besitzen (SHIMODA et al. 2009). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass für diese tumorsynergistische Eigenschaften mesenchymaler Zellen eine vorherige „Aktivierung“ durch das Tumorgewebe notwendig ist. Bekannt ist, dass Karzinomzellen *in vitro* parakrin eine Umwandlung von Knochenmarkstromazellen in myofibroblastenähnliche Zellformen induzieren können (GUO et al. 2008). Es konnte weiterhin im Mausmodell nachgewiesen werden, dass gerade Knochenmarkstromazellen eine wichtige Ursprungspopulation für Zellen des Tumorstromas darstellen (DIREKZE et al. 2004). Für die Initiation dieser Transdifferenzierung wird in erster Linie die parakrine Wirkung von Wachstumsfaktoren in unmittelbarer Umgebung des Tumorgewebes verantwortlich gemacht, hier vor allem von TGF- β (SHIMODA et al. 2009).

Die transdifferenzierten Stromazellen wiederum zeigen proangiogenetische Eigenschaften, wie im Angiogenesemodell an Umbilikalvenenzellen (HUVEC-Zellen) und humanen mikrovaskulären Endothelzellen (HMVEC-Zellen) nachgewiesen werden konnte (GUO et al. 2008, NOMA et al. 2008). Weiterhin wirken sie unterstützend auf die Proliferation von Tumorzellen oraler Plattenepithelkarzinome *in vitro* (KELLERMANN et al. 2008). *In vivo* korreliert deren Anzahl im Tumorpräparat signifikant mit dem N-Stadium, der Rezidivrate, dem Proliferationspotential, der Invasivität, der Metastasierung und der Prognose der entsprechenden Tumoren (KELLERMANN et al. 2008, MAESHIMA et al. 2002, SUROWIAK et al. 2006).

Auch von Zellen mesenchymalen Ursprungs werden Wachstumsfaktoren der TGF- β -Familie sezerniert. Im Gegensatz zu vielen anderen Zytokinen der IGF-, EGF- oder FGF-Familie, die im Regelfall die Tumorproliferation steigern, können diese bei epithelialen Tumorzellen neben einer Proliferationssteigerung ebenso eine Proliferationsinhibition bewirken (BHOWMICK et al. 2004). Zur Erklärung der in unseren Kokulturansätzen beobachteten Wachstumsinhibition bei PCI-13-Zellen ist eine parakrine Mediation über TGF- β durchaus denkbar. Verschiedene Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Aktivierung von TGF- β -aktivierten Signalwegen eine Hemmung der Tumorbildung auslösen kann (BECKER et al. 2004, DERYNCK et al. 2001), wogegen deren Inhibition die Karzinogenese fördert (BOTTINGER et al. 1997, GORSKA et al. 2003). Die Wirkung von TGF- β ist stadienabhängig und entwickelt sich von einer Wachstumsinhibition zu Beginn der Tumorenstehung zur invasivitätsfördernden Wirkung in späteren Stadien. Es ist

erwiesen, dass gerade bei der Interaktion epithelialer Tumorzellen mit mesenchymalen Stromazellen entscheidende Steuerungsfunktionen bezüglich Proliferation, Invasivität und Angiogenese über TGF- β reguliert werden (DERYNCK et al. 2001).

Auswirkungen der Präsenz mesenchymaler Stromazellen auf Invasivität oder Angiogenese der oropharyngealen Tumorzellen sind im hier analysierten indirekten Kokulturmodell jedoch nicht evaluierbar und erfordern weitere Untersuchungen.

4.3 Parakrine Einflüsse humaner mesenchymaler Stromazellen auf die Genexpression von PCI-13-Zellen

Die von uns beobachteten signifikanten Unterschiede der Genexpression von oropharyngealen Tumorzellen bei Präsenz humaner mesenchymaler Stromazellen spricht für eine parakrine Interaktion beider Zellpopulationen. Die Wechselwirkung beeinflusst verschiedene Komponenten intra- und extrazellulärer Signaltransduktionswege auf Ebene der Transkription.

4.3.1 WNT3

Bei der Untersuchung der Genexpression von Wnt-3 fiel ein an Beobachtungstag 7 signifikant vermindertes Auftreten des entsprechenden Transkripts WNT3 in der Kokultur auf. Die Differenzen der Genexpression an Tag 4 und 14 waren zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe unerheblich.

Wnt-3 als Genprodukt des WNT3-Gens erfüllt für die Signaltransduktion als Bestandteil des Wnt- β -Catenin-Pathways sowohl bei malignen Tumorzellen als auch bei mesenchymalen Stromazellen wichtige Aufgaben. Eine Abnahme der Genexpression von WNT innerhalb der Population von PCI-13-Zellen bei gleichzeitig verminderter Zellproliferation lässt sich mit Erkenntnissen aus bereits durchgeführten Studien an anderen Tumorarten vereinbaren (GELEBART et al. 2008, WEI et al. 2009).

Wie bereits beschrieben, kommt bei Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs, aber auch bei anderen malignen Tumoren eine erhöhte Genexpression von WNT und Wnt-

Rezeptoren vor (DIAZ PRADO et al. 2009, KATOH 2003, OSHIMA et al. 2009). Da WNT auch von hMSC exprimiert wird (NETH et al. 2006), ist nicht auszuschließen, dass ein parakriner Einfluss der mesenchymalen Zellen auf die kokultivierten Tumorzellen zu einer Hemmung deren Genexpression von WNT3 führt. Zytokine der Wnt-Familie besitzen über den kanonischen Wnt- β -Catenin-Signalweg entscheidende Einflüsse auf das Differenzierungsverhalten von Stammzellen, Progenitorzellen und malignen Tumorzellen (REYA und CLEVERS 2005). Die in der vorliegenden Untersuchung aufgetretene Proliferationsabnahme der Tumorzellen an Tag 14 ließe sich neben anderen Einflussfaktoren auch durch die beobachtete Expressionsabnahme von WNT3 erklären, da eine verminderte autokrine Wirkung auf den Wnt-Rezeptor durchaus eine verminderte Proliferationsrate und erhöhte Neigung zur Zelldifferenzierung nach sich ziehen könnte. Für andere maligne Tumorentitäten wie das Mammakarzinom (SCHLANGE et al. 2007, ZHANG J et al. 2010), das Prostatakarzinom (JIANG et al. 2007) oder das hepatozelluläre Karzinom (WEI et al. 2009) sind Zusammenhänge zwischen einer Wnt-Aktivierung und zunehmender Tumorpheriferation oder einer Neigung zur epithelial-mesenchymalen Transdifferenzierung bekannt.

Als von hMSC exprimiertes Zytokin kommt auch TGF- β als möglicher Kandidat für eine parakrine Interaktion mit dem Wnt- β -Catenin-Pathway bei PCI-13-Zellen in Frage. Bekannt ist, dass TGF- β sowohl inhibitorische als auch synergistische Effekte auf den kanonischen Wnt- β -Catenin-Pathway ausüben kann, wobei die molekularen Mechanismen bislang noch nicht vollständig geklärt sind (DENNLER et al. 2009, VINCENT et al. 2009). Eine konsekutive Hemmung der Genexpression von WNT3 mit Auswirkungen auf die Zellproliferation könnte die Folge einer derartigen Interaktion sein.

4.3.2 CDH1

Ähnlich wie für WNT3 konnte auch für CDH1 ein signifikant vermindertes Auftreten des Transkripts an Tag 7 in der Kokultur beobachtet werden, wogegen an Tag 4 und 14 kaum Unterschiede in der Genexpression zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe festgestellt werden konnten. Als Erklärungsansätze für die beobachteten Differenzen kommen verschiedene parakrine Einflüsse der humanen mesenchymalen Stromazellen in Betracht.

E-Cadherin erfüllt als membranständiges Protein wichtige Funktionen bei der Bildung von Zonulae adhaerentes, weiterhin wird es, wie bereits beschrieben, mit verschiedenen Einflüssen auf die Invasivität, das Metastasierungsverhalten und damit auch auf die Prognose maligner Tumoren in Verbindung gebracht (VAN ROY und BERX 2008).

Zwischen dem Wnt-Pathway und E-Cadherin besteht insofern eine Verbindung, als dass während der Embryonalentwicklung eine Hemmung der Genexpression von E-Cadherin durch die Aktivierung der kanonischen Wnt-Signalkaskade nachgewiesen werden konnte (JAMORA et al. 2003). Der Promotor für die Transkription von CDH1 scheint dabei durch eine Aktivierung des Wnt-abhängigen β -Catenin-Lef-TCF-Komplexes gehemmt zu werden. Zusätzlich wurde eine inhibitorische Wirkung auf die CDH1-Expression durch den Transkriptionsfaktor Snail beschrieben, der seinerseits direkt mit β -Catenin interagiert (STEMMER et al. 2008). Bekannt ist, dass bei Spindelzellkarzinomen des Kopf-Hals-Bereichs sowohl E-Cadherin als auch β -Catenin vermindert nachgewiesen werden können. Gleichzeitig ist ein vermehrtes Auftreten von Snail-1 zu beobachten (ZIDAR et al. 2008).

Zusätzlich können verschiedene über Wachstumsfaktoren aktivierte Signalwege die Genexpression von E-Cadherin hemmen, wie EGF, HGF, FGF und auch TGF- β (VAN ROY und BERX 2008). TGF- β hat sowohl einen hemmenden Einfluss auf die Expression von E-Cadherin als auch auf β -Catenin (TAKANO et al. 2007).

Es ist nicht auszuschließen, dass auch in der hier vorliegenden Untersuchung eine parakrine Wirkung von Wachstumsfaktoren, insbesondere von TGF- β , auf die PCI-13-Zellen in Kokultur eine Minderung der Genexpression von E-Cadherin hervorruft. Die Regulationsmechanismen über verschiedene Signaltransduktionswege ergeben allerdings ein komplexes Bild und sind teils noch unzureichend bekannt, so dass hier weiterer Forschungsbedarf besteht.

4.3.3 MMP14

Bei der Untersuchung der Genexpression von MMP-14 konnten wir in der Kokultur von PCI-13-Zellen mit hMSC sowohl an Tag 4 als auch an Tag 7 ein hochsignifikant vermindertes Auftreten des entsprechenden Transkripts MMP14 bei den Tumorzellen feststellen. MMP14 ist damit in der vorliegenden Untersuchung das einzige

Transkript, das bereits nach 4 Tagen Kokultur deutliche Differenzen der Genexpression zwischen Kokultur- und Kontrollgruppe aufweist.

Bekannt ist, dass MMP-14 als membranständige Matrix-Metalloproteinase das Wachstum und die Invasivität oropharyngealer Tumorzellen *in vitro* und im Mausmodell fördert (ZHANG W et al. 2006). Eine Inhibition der Genexpression von MMP14 vermindert *in vitro* die Invasivität von Ovarialkarzinomzelllinien, gleichzeitig konnte eine reduzierte Aktivierung von MMP-2 festgestellt werden, deren proteolytische Aktivierung durch MMP-14 erfolgt. MMP-14 wurde daher bereits als potentielles Zielenzym für eine antiproliferative Tumorthherapie vorgeschlagen (WU et al. 2006). Durch MMP-14 scheint ein direkter proliferationsfördernder Effekt auf Tumorzellen ausgeübt werden, dessen Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, der wahrscheinlich aber über den zytoplasmatischen Anteil des Enzyms vermittelt wird (D'ALESSIO et al. 2008). Des Weiteren verschafft die proinvasive Wirkung von MMP-14 malignen Tumorzellen offensichtlich Wachstumsvorteile (HOTARY et al. 2003).

Die Inhibition von MMP-14 kann über verschiedene Wege erfolgen: Ein potenter Inhibitor membranständiger Matrix-Metalloproteinasen ist TIMP-2 (Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2) (VISSE und NAGASE 2003). Weiterhin konnte für das membranständige Glykoprotein RECK eine inhibitorische Funktion auf MMP-14 nachgewiesen werden (OH et al. 2001). Die Genexpression von MMP14 korreliert *in vitro* auf Transkriptionsebene signifikant mit der Expressionsrate der beiden Inhibitoren, was auf eine Regulation über gemeinsame Signalwege hindeutet (FIGUEIRA et al. 2009).

Auch mesenchymale Stromazellen synthetisieren MMP-14 und erhalten unter anderem bei einer chemotaktischen Aktivierung durch Zytokine invasive Fähigkeiten (RIES et al. 2007). *In vitro* und im Mausmodell konnte eine proinvasive Wirkung MMP-14-synthetisierender Fibroblasten auf maligne Tumorzellen nachgewiesen werden (ZHANG W et al. 2006). Das Tumorstroma scheint daher zusätzlich zu den Tumorzellen eine wichtige Rolle bei der Bereitstellung invasivitätsfördernder Mediatoren zu spielen.

Zur Erklärung der in unseren Kokulturrexperimenten beobachteten Abnahme der Genexpression von MMP14 in der Tumorzellpopulation kann durchaus eine zusätzliche Synthese der Matrix-Metalloproteinase durch die humanen

mesenchymalen Stromazellen herangezogen werden. Diese ist bei karzinomassoziierten Fibroblasten, die mittels Lasermikrodissektion aus der Tumormikroumgebung gewonnen wurden, erhöht (ROSENTHAL et al. 2004). Eine regulative Reduktion der Transkription in den PCI-13-Zellen wäre, wie bereits beschrieben, mit früheren Erkenntnissen zur parakrinen Kommunikation von Tumor- und Tumorstromazellen vereinbar. Sekundär wären auch direkte Effekte der verminderten Genexpression von MMP14 auf die Tumorzellproliferation denkbar, da nach derzeitigem Kenntnisstand ein unmittelbar proliferationsfördernder Effekt von MMP-14 hauptsächlich autokrin durch den intrazellulären Proteinanteil vermittelt wird (D'ALESSIO et al. 2008). Dieser könnte bei der in unseren Versuchen verminderten Genexpression von MMP14 durch die PCI-13-Zellen ebenfalls in reduzierter Menge vorliegen.

4.4 Mögliche Auswirkungen der beobachteten Modifikationen der Genexpression auf die Eigenschaften der Tumorzellpopulation

Die von uns erstmals beobachteten Unterschiede der Genexpression innerhalb der Population von PCI-13-Zellen lassen sich durch parakrine Interaktion mit den kokultivierten mesenchymalen Stromazellen erklären. Sie stehen nicht im Widerspruch zu der ebenfalls beobachteten Proliferationsabnahme der Tumorzellen in der Kokultur, da sich hierzu für die differenzell exprimierten Mediatoren durchaus Parallelen zu früheren Studien aufzeigen lassen.

Denkbar sind proliferationsmindernde Einflüsse durch eine Reduktion der Genexpression von WNT3 mit konsekutiver Beeinflussung der entsprechenden Signalkaskaden. Die beobachtete signifikante Expressionsabnahme von MMP14 kommt zur Erklärung einer Proliferationsreduktion der PCI-13-Zellen ebenfalls in Betracht.

E-Cadherin wird in der Literatur mit multiplen Interaktionen über intrazelluläre Signalkaskaden, Wachstumsfaktoren und direkte Zell-Zell-Kontakte in Verbindung gebracht (VAN ROY und BERX 2008), die ein sehr komplexes Wechselwirkungsbild ergeben. Vor allem die intrazelluläre Interaktion mit β -Catenin und die konsekutive Beeinflussung des Wnt- β -Catenin-Pathways legt Auswirkungen einer Genexpressionsänderung von CDH1 auf die Proliferation der PCI-13-Zellen nahe.

Eine Reduktion der Genexpression für die o.g. Transkripte wurde in Kokultur an den Beobachtungstagen 4 (nur für MMP14) und 7 festgestellt, die Größe der Tumorzellpopulation zeigte erst an Tag 14 eine Minderung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Tatsache könnte ein Hinweis darauf sein, dass mögliche proliferationshemmende Einflüsse durch ein vermindertes Auftreten der untersuchten Mediatoren sich erst mit einer gewissen Verzögerung auswirken. Die Berücksichtigung der Translation und eventuellen posttranslationalen Modifikation der Genprodukte könnte hierfür einen Erklärungsansatz liefern.

Die Bedeutung einer parakrinen Beeinflussung von weiteren Eigenschaften der Tumorzellpopulation durch die Präsenz humaner mesenchymaler Stromazellen in indirekter Kokultur, wie die Fähigkeit zur Invasivität oder die Neigung zur Metastasierung, soll Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

5 Zusammenfassung

Karzinome des Kopf-Hals-Bereichs sind die am achthäufigsten auftretenden malignen Tumoren des Menschen, die zu erheblichen Einschränkungen der individuellen Lebensqualität führen. Die 5-Jahres-Überlebensraten haben sich trotz weiterentwickelter multimodaler Therapiekonzepte in den letzten 40 Jahren kaum verbessert. Untersuchungen der Interaktionen von Tumorzellen und tumorassoziierten Stromazellen über molekularbiologische Mechanismen stellen derzeit daher einen aktuellen und klinisch relevanten Forschungsschwerpunkt dar. Sie könnten mögliche Wege für zukünftige zielorientierte Therapieverfahren weisen.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, der Frage nachzugehen, ob humane mesenchymale Stromazellen als Modellzellen für das Tumorstroma mit oropharyngealen Tumorzellen in parakrine Wechselwirkung treten. Wenn dies der Fall ist, sollte evaluiert werden, inwiefern sich das Genexpressionsmuster der Tumorzellen bezüglich wichtiger Mediatoren der Tumor-Stroma-Interaktion ändert.

Wir untersuchten daher die Interaktionen von humanen mesenchymalen Stromazellen und der oropharyngealen Tumorzelllinie PCI-13 im Modell der indirekten Kokultur. Die mesenchymalen Stromazellen waren aus humanen Knochenmarkstromazellen per Durchflusszytometrie charakterisiert worden.

Wir verglichen die Kokulturgruppe mit zwei Kontrollgruppen. Die erste bestand aus alleinigen Kulturen von PCI-13-Zellen, die zweite aus entsprechenden alleinigen Kulturen von humanen mesenchymalen Stromazellen. Nach 4, 7 und 14 Tagen Kulturdauer wurden die Zellzahlen aller Populationen aus Versuchs- und Kontrollgruppen ermittelt.

Zur Untersuchung der Genexpression wichtiger Mediatoren der Tumorzellen erfolgte an den Beobachtungstagen eine RNA-Isolation und Untersuchung des Genexpressionsmusters mittels RT-qPCR. Die Transkripte für Wnt-3, β -Catenin, MMP-14, E-Cadherin, und Ets-1 wurden relativ quantifiziert.

Zusammenfassend haben wir durch unsere Untersuchung folgende Erkenntnisse gewonnen:

1. Es gibt Proliferationsunterschiede zwischen indirekt mit humanen mesenchymalen Stromazellen kokultivierten oropharyngealen Tumorzellen der Zelllinie PCI-13 und den entsprechend in Einzelkultur kultivierten Tumorzellen. Die Unterschiede manifestieren sich als signifikante Reduktion der Tumorzellzahl in der Kokultur an Beobachtungstag 14.
2. Beim Vergleich von mit PCI-13-Zellen indirekt kokultivierten humanen mesenchymalen Stromazellen mit der entsprechenden Einzelkultur zeigt sich eine Tendenz zur Zunahme der hMSC-Zellzahl an Beobachtungstag 14. Diese weist jedoch keine statistische Signifikanz auf.
3. Die Untersuchung der Genexpression von PCI-13-Zellen zeigt eine in indirekter Kokultur signifikant verminderte Genexpression von Wnt-3 und E-Cadherin an Tag 7. Für die Matrix-Metalloproteinase MMP-14 konnte sowohl an Tag 4 als auch an Tag 7 der Kokultur eine signifikant verminderte Genexpression festgestellt werden.

Unsere Untersuchung zeigt damit erstmals, dass im Rahmen der parakrinen Interaktion von humanen oropharyngealen Tumorzellen und humanen mesenchymalen Stromazellen in indirekter Kokultur ein signifikanter Einfluss sowohl auf die Proliferation als auch auf die Genexpression der Tumorzellen ausgeübt wird.

Diese Ergebnisse liefern neue Hinweise darauf, dass die Interaktion von Karzinomzellen des Oropharynx mit dem Tumorstroma mesenchymalen Ursprungs im Kontext weiterer Regulationsmechanismen eine relevante Bedeutung für die Tumorentwicklung besitzt.

6 Literaturverzeichnis

Acloque H, Adams MS, Fishwick K, Bronner-Fraser M, Nieto MA (2009):

Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J Clin Invest* 119, 1438-1449

Andrews NA, Jones AS, Helliwell TR, Kinsella AR (1997):

Expression of the E-cadherin-catenin cell adhesion complex in primary squamous cell carcinomas of the head and neck and their nodal metastases. *Br J Cancer* 75, 1474-1480

Annabi B, Lee YT, Turcotte S, Naud E, Desrosiers RR, Champagne M, Eliopoulos N, Galipeau J, Beliveau R (2003):

Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation. *Stem Cells* 21, 337-347

Bacher U, Schnittger S, Haferlach C, Haferlach T (2009):

Review: Molecular diagnostics in acute leukemias. *Clin Chem Lab Med* 47, 1333-1341

Bagutti C, Speight PM, Watt FM (1998):

Comparison of integrin, cadherin, and catenin expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *J Pathol* 186, 8-16

Baillat D, Begue A, Stehelin D, Aumercier M (2002):

ETS-1 transcription factor binds cooperatively to the palindromic head to head ETS-binding sites of the stromelysin-1 promoter by counteracting autoinhibition. *J Biol Chem* 277, 29386-29398

Bair EL, Massey CP, Tran NL, Borchers AH, Heimark RL, Cress AE, Bowden GT (2001):

Integrin- and cadherin-mediated induction of the matrix metalloprotease matrilysin in cocultures of malignant oral squamous cell carcinoma cells and dermal fibroblasts. *Exp Cell Res* 270, 259-267

Barlogie B, Raber MN, Schumann J, Johnson TS, Drewinko B, Swartzendruber DE, Gohde W, Andreeff M, Freireich EJ (1983):

Flow cytometry in clinical cancer research. *Cancer Res* 43, 3982-3997

Barry FP, Murphy JM (2004):

Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 568-584

Battle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T et al. (2002):

Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111, 251-263

Becker C, Fantini MC, Schramm C, Lehr HA, Wirtz S, Nikolaev A, Burg J, Strand S, Kiesslich R, Huber S et al. (2004):

TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 21, 491-501

Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL (2004):

Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332-33

Birchmeier W, Behrens J (1994):

Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness.

Biochim Biophys Acta 1198, 11-26

Birkedal-Hansen B, Pavelic ZP, Gluckman JL, Stambrook P, Li YQ, Stetler-Stevenson WG (2000):

MMP and TIMP gene expression in head and neck squamous cell carcinomas and adjacent tissues.

Oral Dis 6, 376-382

Blanpain C, Horsley V, Fuchs E (2007):

Epithelial stem cells: turning over new leaves.

Cell 128, 445-458

Bottinger EP, Jakubczak JL, Haines DC, Bagnall K, Wakefield LM (1997):

Transgenic mice overexpressing a dominant-negative mutant type II transforming growth factor beta receptor show enhanced tumorigenesis in the mammary gland and lung in response to the carcinogen 7,12-dimethylbenz-[a]-anthracene.

Cancer Res 57, 5564-5570

Boyera N, Cavey D, Delamadeleine F, Bouclier M, Hensby C, Shroot B (1993):

A novel in vitro model for the study of human keratinocyte/leucocyte interactions under autologous conditions.

Br J Dermatol 129, 521-529

Buchner T, Dittrich W, Gohde W (1971):

[Impulse cytophotometry of blood cells and bone marrow cells].

Verh Dtsch Ges Inn Med 77, 416-418

Bustin SA, Mueller R (2005):

Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis.

Clin Sci (Lond) 109, 365-379

Cadigan KM, Nusse R (1997):

Wnt signaling: a common theme in animal development.

Genes Dev 11, 3286-3305

Campo E, Munoz J, Miquel R, Palacin A, Cardesa A, Sloane BF, Emmert-Buck MR (1994):

Cathepsin B expression in colorectal carcinomas correlates with tumor progression and shortened patient survival.

Am J Pathol 145, 301-309

Carvalho AL, Ikeda MK, Magrin J, Kowalski LP (2004):

Trends of oral and oropharyngeal cancer survival over five decades in 3267 patients treated in a single institution.

Oral Oncol 40, 71-76

Castro-Malaspina H, Gay RE, Resnick G, Kapoor N, Meyers P, Chiarieri D, McKenzie S, Broxmeyer HE, Moore MA (1980):

Characterization of human bone marrow fibroblast colony-forming cells (CFU-F) and their progeny.

Blood 56, 289-301

Ch'ng S, Sullivan M, Yuan L, Davis P, Tan ST (2006):

Mast cells dysregulate apoptotic and cell cycle genes in mucosal squamous cell carcinoma.

Cancer Cell Int 6, 28

Chang JY, Wright JM, Svoboda KK (2007):

Signal transduction pathways involved in epithelial-mesenchymal transition in oral cancer compared with other cancers.

Cells Tissues Organs 185, 40-47

Civin CI, Trischmann T, Kadan NS, Davis J, Noga S, Cohen K, Duffy B, Groenewegen I, Wiley J, Law P et al. (1996):

Highly purified CD34-positive cells reconstitute hematopoiesis.
J Clin Oncol 14, 2224-2233

D'Alessio S, Ferrari G, Cinnante K, Scheerer W, Galloway AC, Roses DF, Rozanov DV, Remacle AG, Oh ES, Shiryaev SA et al. (2008):

Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 binding to membrane-type 1 matrix metalloproteinase induces MAPK activation and cell growth by a non-proteolytic mechanism.
J Biol Chem 283, 87-99

DasGupta R, Fuchs E (1999):

Multiple roles for activated LEF/TCF transcription complexes during hair follicle development and differentiation.

Development 126, 4557-4568

De Boer J, Wang HJ, Van Blitterswijk C (2004):

Effects of Wnt signaling on proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells.
Tissue Eng 10, 393-401

Demchik LL, Sameni M, Nelson K, Mikkelsen T, Sloane BF (1999):

Cathepsin B and glioma invasion.

Int J Dev Neurosci 17, 483-494

Dennler S, Andre J, Verrecchia F, Mauviel A (2009):

Cloning of the human GLI2 Promoter: transcriptional activation by transforming growth factor-beta via SMAD3/beta-catenin cooperation.

J Biol Chem 284, 31523-31531

Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A (2001):

TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression.

Nat Genet 29, 117-129

De Wever O, Mareel M (2003):

Role of tissue stroma in cancer cell invasion.

J Pathol 200, 429-447

Diaz Prado SM, Medina Villaamil V, Aparicio Gallego G, Blanco Calvo M, Lopez Cedrun JL, Sironvalle Soliva S, Valladares Ayerbes M, Garcia Campelo R, Anton Aparicio LM (2009):

Expression of Wnt gene family and frizzled receptors in head and neck squamous cell carcinomas.

Virchows Arch 455, 67-75

Direkze NC, Alison MR (2006):

Bone marrow and tumour stroma: an intimate relationship.

Hematol Oncol 24, 189-195

Direkze NC, Hodivala-Dilke K, Jeffery R, Hunt T, Poulson R, Oukrif D, Alison MR, Wright NA (2004):

Bone marrow contribution to tumor-associated myofibroblasts and fibroblasts.

Cancer Res 64, 8492-8495

Erices A, Conget P, Minguell JJ (2000):

Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood.

Br J Haematol 109, 235-242

Eriksen JG, Steiniche T, Sogaard H, Overgaard J (2004):

Expression of integrins and E-cadherin in squamous cell carcinomas of the head and neck.

APMIS 112, 560-568

Eriksen JG, Steiniche T, Overgaard J (2005):

The role of epidermal growth factor receptor and E-cadherin for the outcome of reduction in the overall treatment time of radiotherapy of supraglottic larynx squamous cell carcinoma.

Acta Oncol 44, 50-58

Fierro FA, Sierralta WD, Epanan MJ, Minguell JJ (2004):

Marrow-derived mesenchymal stem cells: role in epithelial tumor cell determination.

Clin Exp Metastasis 21, 313-319

Figueira RC, Gomes LR, Neto JS, Silva FC, Silva ID, Sogayar MC (2009):

Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential.

BMC Cancer 9, 20

Fodde R, Brabletz T (2007):

Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior.

Curr Opin Cell Biol 19, 150-158

Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS (1970):

The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells.

Cell Tissue Kinet 3, 393-403

Fröhlich E, Schlagenhauß B, Mohrle M, Weber E, Klessen C, Rassner G (2001):

Activity, expression, and transcription rate of the cathepsins B, D, H, and L in cutaneous malignant melanoma.

Cancer 91, 972-982

Frosch BA, Berquin I, Emmert-Buck MR, Moin K, Sloane BF (1999):

Molecular regulation, membrane association and secretion of tumor cathepsin B.

APMIS 107, 28-37

Gache C, Berthois Y, Martin PM, Saez S (1998):

Positive regulation of normal and tumoral mammary epithelial cell proliferation by fibroblasts in coculture.

In Vitro Cell Dev Biol Anim 34, 347-351

Gelebart P, Anand M, Armanious H, Peters AC, Dien Bard J, Amin HM, Lai R (2008):

Constitutive activation of the Wnt canonical pathway in mantle cell lymphoma.

Blood 112, 5171-5179

Genis L, Galvez BG, Gonzalo P, Arroyo AG (2006):

MT1-MMP: universal or particular player in angiogenesis?

Cancer Metastasis Rev 25, 77-86

Gocheva V, Zeng W, Ke D, Klimstra D, Reinheckel T, Peters C, Hanahan D, Joyce JA (2006):

Distinct roles for cysteine cathepsin genes in multistage tumorigenesis.

Genes Dev 20, 543-556

Gorska AE, Jensen RA, Shyr Y, Aakre ME, Bhowmick NA, Moses HL (2003):

Transgenic mice expressing a dominant-negative mutant type II transforming growth factor-beta receptor exhibit impaired mammary development and enhanced mammary tumor formation.

Am J Pathol 163, 1539-1549

Guilford P (1999):

E-cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire?

Mol Med Today 5, 172-177

Guo X, Oshima H, Kitmura T, Taketo MM, Oshima M (2008):

Stromal fibroblasts activated by tumor cells promote angiogenesis in mouse gastric cancer.
J Biol Chem 283, 19864-19871

Haasters F, Prall WC, Anz D, Bourquin C, Pautke C, Endres S, Mutschler W, Docheva D, Schieker M (2009):

Morphological and immunocytochemical characteristics indicate the yield of early progenitors and represent a quality control for human mesenchymal stem cell culturing.
J Anat 214, 759-767

Hahne JC, Okuducu AF, Sahin A, Fafeur V, Kiriakidis S, Wernert N (2008):

The transcription factor ETS-1: its role in tumour development and strategies for its inhibition.
Mini Rev Med Chem 8, 1095-1105

He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X (2004):

LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way.
Development 131, 1663-1677

Heneweer M, Muusse M, Dingemans M, de Jong PC, van den Berg M, Sanderson JT (2005):

Co-culture of primary human mammary fibroblasts and MCF-7 cells as an in vitro breast cancer model.
Toxicol Sci 83, 257-263

Heo DS, Snyderman C, Gollin SM, Pan S, Walker E, Deka R, Barnes EL, Johnson JT, Herberman RB, Whiteside TL (1989):

Biology, cytogenetics, and sensitivity to immunological effector cells of new head and neck squamous cell carcinoma lines.
Cancer Res 49, 5167-5175

Herbst RS, Yano S, Kuniyasu H, Khuri FR, Bucana CD, Guo F, Liu D, Kemp B, Lee JJ, Hong WK et al. (2000):

Differential expression of E-cadherin and type IV collagenase genes predicts outcome in patients with stage I non-small cell lung carcinoma.
Clin Cancer Res 6, 790-797

Hollenhorst PC, Jones DA, Graves BJ (2004):

Expression profiles frame the promoter specificity dilemma of the ETS family of transcription factors.
Nucleic Acids Res 32, 5693-5702

Hombauer H, Minguell JJ (2000):

Selective interactions between epithelial tumour cells and bone marrow mesenchymal stem cells.
Br J Cancer 82, 1290-1296

Horvath B, Hegyesi H, Nagy P, Falus A, Schaff Z (2005):

Expression of ets-1 transcription factor in human head and neck squamous cell carcinoma and effect of histamine on metastatic potential of invasive tumor through the regulation of expression of ets-1 and matrix metalloproteinase-3.
Head Neck 27, 585-596

Hotary KB, Allen ED, Brooks PC, Datta NS, Long MW, Weiss SJ (2003):

Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix.
Cell 114, 33-45

Ito H, Duxbury M, Benoit E, Clancy TE, Zinner MJ, Ashley SW, Whang EE (2004):

Prostaglandin E2 enhances pancreatic cancer invasiveness through an Ets-1-dependent induction of matrix metalloproteinase-2.
Cancer Res 64, 7439-7446

Jamora C, DasGupta R, Kocieniewski P, Fuchs E (2003):

Links between signal transduction, transcription and adhesion in epithelial bud development.
Nature 422, 317-322

Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ (2005):

Cancer statistics, 2005.
CA Cancer J Clin 55, 10-30

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Smigal C, Thun MJ (2006):

Cancer statistics, 2006.
CA Cancer J Clin 56, 106-130

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ (2007):

Cancer statistics, 2007.
CA Cancer J Clin 57, 43-66

Jiang YG, Luo Y, He DL, Li X, Zhang LL, Peng T, Li MC, Lin YH (2007):

Role of Wnt/beta-catenin signaling pathway in epithelial-mesenchymal transition of human prostate cancer induced by hypoxia-inducible factor-1alpha.
Int J Urol 14, 1034-1039

Jongen WM, Fitzgerald DJ, Asamoto M, Piccoli C, Slaga TJ, Gros D, Takeichi M, Yamasaki H (1991):

Regulation of connexin 43-mediated gap junctional intercellular communication by Ca²⁺ in mouse epidermal cells is controlled by E-cadherin.
J Cell Biol 114, 545-555

Joyce JA, Hanahan D (2004):

Multiple roles for cysteine cathepsins in cancer.
Cell Cycle 3, 1516-1619

Katoh M (2002):

WNT and FGF gene clusters (review).
Int J Oncol 21, 1269-1273

Katoh M (2003):

Expression and regulation of WNT1 in human cancer: up-regulation of WNT1 by beta-estradiol in MCF-7 cells.
Int J Oncol 22, 209-212

Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, Kowalski LP, Coletta RD (2008):

Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation.
Oral Oncol 44, 509-517

Kimelman D (2006):

Mesoderm induction: from caps to chips.
Nat Rev Genet 7, 360-372

Kimelman D, Xu W (2006):

beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective.
Oncogene 25, 7482-7491

Korbling M, Estrov Z (2003):

Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept?
N Engl J Med 349, 570-582

- Korinek V, Barker N, Moerer P, van Donselaar E, Huls G, Peters PJ, Clevers H (1998):**
Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4.
Nat Genet 19, 379-383
- Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, Lind K, Sindelka R, Sjoback R, Sjogreen B, Strombom L et al. (2006):**
The real-time polymerase chain reaction.
Mol Aspects Med 27, 95-125
- Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Hiraoka M, Sargolzaei S, Keikhaee MR, Sato S, Miyauchi M, Takata T (2004):**
Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous beta-catenin.
Clin Cancer Res 10, 5455-5463
- Kuhn DJ, Smith DM, Pross S, Whiteside TL, Dou QP (2003):**
Overexpression of interleukin-2 receptor alpha in a human squamous cell carcinoma of the head and neck cell line is associated with increased proliferation, drug resistance, and transforming ability.
J Cell Biochem 89, 824-836
- Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, Nakamura S, Beppu M, Hiraki A, Takeuchi H, Shirasuna K (1999):**
Expression of MMPS, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis.
Head Neck 21, 627-638
- Lah TT, Kokalj-Kunovar M, Strukelj B, Pungercar J, Barlic-Maganja D, Drobnic-Kosorok M, Kastelic L, Babnik J, Golouh R, Turk V (1992):**
Stefins and lysosomal cathepsins B, L and D in human breast carcinoma.
Int J Cancer 50, 36-44
- Lang A, Horler D, Baici A (2000):**
The relative importance of cysteine peptidases in osteoarthritis.
J Rheumatol 27, 1970-1979
- Leprince D, Gégonne A, Coll J, de Taisne C, Schneeberger A, Lagrou C, Stehelin D (1983):**
A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26.
Nature 306, 395-397
- Lin CJ, Grandis JR, Carey TE, Gollin SM, Whiteside TL, Koch WM, Ferris RL, Lai SY (2007):**
Head and neck squamous cell carcinoma cell lines: established models and rationale for selection.
Head Neck 29, 163-188
- Mach L, Stuwe K, Hagen A, Ballaun C, Glossl J (1992):**
Proteolytic processing and glycosylation of cathepsin B. The role of the primary structure of the latent precursor and of the carbohydrate moiety for cell-type-specific molecular forms of the enzyme.
Biochem J 282 (Pt 2), 577-582
- Maeshima AM, Niki T, Maeshima A, Yamada T, Kondo H, Matsuno Y (2002):**
Modified scar grade: a prognostic indicator in small peripheral lung adenocarcinoma.
Cancer 95, 2546-2554
- Malanchi I, Huelsken J (2009):**
Cancer stem cells: never Wnt away from the niche.
Curr Opin Oncol 21, 41-46
- Marikawa Y (2006):**
Wnt/beta-catenin signaling and body plan formation in mouse embryos.
Semin Cell Dev Biol 17, 175-184

Marsit CJ, Posner MR, McClean MD, Kelsey KT (2008):

Hypermethylation of E-cadherin is an independent predictor of improved survival in head and neck squamous cell carcinoma.

Cancer 113, 1566-1571

Mattijssen V, Peters HM, Schalkwijk L, Manni JJ, van 't Hof-Grootenboer B, de Mulder PH, Ruiter DJ (1993):

E-cadherin expression in head and neck squamous-cell carcinoma is associated with clinical outcome.

Int J Cancer 55, 580-585

Metelmann HR, Kaduk W:

Tumoren im Kopf-Hals-Bereich; In: Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie; hrsg. von Horch HH; Elsevier, München/Jena 2007, 670-751

Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A (2004):

WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies.

Nat Rev Genet 5, 691-701

Mort JS, Buttle DJ (1997):

Cathepsin B.

Int J Biochem Cell Biol 29, 715-720

Nakamura Y, Esnault S, Maeda T, Kelly EA, Malter JS, Jarjour NN (2004):

Ets-1 regulates TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 and tenascin expression in primary bronchial fibroblasts.

J Immunol 172, 1945-1952

Neth P, Ciccarella M, Egea V, Hoelters J, Jochum M, Ries C (2006):

Wnt signaling regulates the invasion capacity of human mesenchymal stem cells.

Stem Cells 24, 1892-1903

Neth P, Ries C, Karow M, Egea V, Ilmer M, Jochum M (2007):

The Wnt signal transduction pathway in stem cells and cancer cells: influence on cellular invasion.

Stem Cell Rev 3, 18-29

Nicola MH, Bizon R, Machado JJ, Sollero T, Rodarte RS, Nobre JS, Magalhaes MM, Takiya CM, Borojevic R (2003):

Breast cancer micrometastases: different interactions of carcinoma cells with normal and cancer patients' bone marrow stromata.

Clin Exp Metastasis 20, 471-479

Niemann S, Zhao C, Pascu F, Stahl U, Aulepp U, Niswander L, Weber JL, Muller U (2004):

Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family.

Am J Hum Genet 74, 558-563

Nishita M, Hashimoto MK, Ogata S, Laurent MN, Ueno N, Shibuya H, Cho KW (2000):

Interaction between Wnt and TGF-beta signalling pathways during formation of Spemann's organizer.

Nature 403, 781-785

Noma K, Smalley KS, Lioni M, Naomoto Y, Tanaka N, El-Deiry W, King AJ, Nakagawa H, Herlyn M (2008):

The essential role of fibroblasts in esophageal squamous cell carcinoma-induced angiogenesis.

Gastroenterology 134, 1981-1993

Nomura T, Katunuma N (2005):

Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells.

J Med Invest 52, 1-9

Nusse R, van Ooyen A, Cox D, Fung YK, Varmus H (1984):

Mode of proviral activation of a putative mammary oncogene (int-1) on mouse chromosome 15.
Nature 307, 131-136

Oh J, Takahashi R, Kondo S, Mizoguchi A, Adachi E, Sasahara RM, Nishimura S, Imamura Y, Kitayama H, Alexander DB et al. (2001):

The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis.
Cell 107, 789-800

Oikawa T (2004):

ETS transcription factors: possible targets for cancer therapy.
Cancer Sci 95, 626-633

Okada A, Bellocq JP, Rouyer N, Chenard MP, Rio MC, Chambon P, Basset P (1995):

Membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP) gene is expressed in stromal cells of human colon, breast, and head and neck carcinomas.
Proc Natl Acad Sci U S A 92, 2730-2734

Oshima H, Oguma K, Du YC, Oshima M (2009):

Prostaglandin E2, Wnt, and BMP in gastric tumor mouse models.
Cancer Sci 100, 1779-1785

Ozawa M, Kemler R (1992):

Molecular organization of the uvomorulin-catenin complex.
J Cell Biol 116, 989-996

Ozawa M, Baribault H, Kemler R (1989):

The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species.
EMBO J 8, 1711-1717

Pande P, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R (1999):

Ets-1: a plausible marker of invasive potential and lymph node metastasis in human oral squamous cell carcinomas.
J Pathol 189, 40-45

Perez-Moreno M, Fuchs E (2006):

Catenins: keeping cells from getting their signals crossed.
Dev Cell 11, 601-612

Perez-Moreno M, Jamora C, Fuchs E (2003):

Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions.
Cell 112, 535-548

Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G (1998):

A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma.
Nature 392, 190-193

Pfaffl MW (2001):

A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.
Nucleic Acids Res 29, e45

Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, Clevers H (2003):

Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium.
Genes Dev 17, 1709-1713

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR (1999):

Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells.
Science 284, 143-147

Polakis P (2007):

The many ways of Wnt in cancer.
Curr Opin Genet Dev 17, 45-51

Qiao L, Xu Z, Zhao T, Zhao Z, Shi M, Zhao RC, Ye L, Zhang X (2008):

Suppression of tumorigenesis by human mesenchymal stem cells in a hepatoma model.
Cell Res 18, 500-507

Rallapalli S, Bishi DK, Verma RS, Cherian KM, Guhathakurta S (2009):

A multiplex PCR technique to characterize human bone marrow derived mesenchymal stem cells.
Biotechnol Lett 31, 1843-1850

Reya T, Clevers H (2005):

Wnt signalling in stem cells and cancer.
Nature 434, 843-850

Rhee CS, Sen M, Lu D, Wu C, Leoni L, Rubin J, Corr M, Carson DA (2002):

Wnt and frizzled receptors as potential targets for immunotherapy in head and neck squamous cell carcinomas.
Oncogene 21, 6598-6605

Ries C, Egea V, Karow M, Kolb H, Jochum M, Neth P (2007):

MMP-2, MT1-MMP, and TIMP-2 are essential for the invasive capacity of human mesenchymal stem cells: differential regulation by inflammatory cytokines.
Blood 109, 4055-4063

Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R (1987):

The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless.
Cell 50, 649-657

Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT (1997):

Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction.
Anal Biochem 245, 154-160

Rodrigo JP, Dominguez F, Alvarez C, Manrique C, Herrero A, Suarez C (2002):

Expression of E-cadherin in squamous cell carcinomas of the supraglottic larynx with correlations to clinicopathological features.
Eur J Cancer 38, 1059-1064

Rosenthal EL, Matrisian LM (2006):

Matrix metalloproteases in head and neck cancer.
Head Neck 28, 639-648

Rosenthal EL, Hotary K, Bradford C, Weiss SJ (1999):

Role of membrane type 1-matrix metalloproteinase and gelatinase A in head and neck squamous cell carcinoma invasion in vitro.
Otolaryngol Head Neck Surg 121, 337-343

Rosenthal EL, McCrory A, Talbert M, Carroll W, Magnuson JS, Peters GE (2004):

Expression of proteolytic enzymes in head and neck cancer-associated fibroblasts.
Arch Otolaryngol Head Neck Surg 130, 943-947

Roshy S, Sloane BF, Moin K (2003):

Pericellular cathepsin B and malignant progression.
Cancer Metastasis Rev 22, 271-286

Rosivatz E, Becker I, Specht K, Fricke E, Lubert B, Busch R, Hofler H, Becker KF (2002):

Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer.
Am J Pathol 161, 1881-1891

Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S, Polakis P (1996):

Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly.
Science 272, 1023-1026

Sameni M, Elliott E, Ziegler G, Fortgens PH, Dennison C, Sloane BF (1995):

Cathepsin B and D are Localized at the Surface of Human Breast Cancer Cells.
Pathol Oncol Res 1, 43-53

Schlange T, Matsuda Y, Lienhard S, Huber A, Hynes NE (2007):

Autocrine WNT signaling contributes to breast cancer cell proliferation via the canonical WNT pathway and EGFR transactivation.
Breast Cancer Res 9, R63

Schliephake H, Jamil MU (2002):

Prospective evaluation of quality of life after oncologic surgery for oral cancer.
Int J Oral Maxillofac Surg 31, 427-433

Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T (2009):

E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer.
Cancer Metastasis Rev 28, 151-166

Schmittgen TD, Zakrajsek BA, Mills AG, Gorn V, Singer MJ, Reed MW (2000):

Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods.
Anal Biochem 285, 194-204

Schneeberger C, Speiser P, Kury F, Zeillinger R (1995):

Quantitative detection of reverse transcriptase-PCR products by means of a novel and sensitive DNA stain.
PCR Methods Appl 4, 234-238

Scorilas A, Fotiou S, Tsiambas E, Yotis J, Kotsiandri F, Sameni M, Sloane BF, Talieri M (2002):

Determination of cathepsin B expression may offer additional prognostic information for ovarian cancer patients.
Biol Chem 383, 1297-1303

Sharrocks AD (2001):

The ETS-domain transcription factor family.
Nat Rev Mol Cell Biol 2, 827-837

Shimoda M, Mellody K, Orimo A (2009):

Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression.
Semin Cell Dev Biol

Shinohara M, Hiraki A, Ikebe T, Nakamura S, Kurahara S, Shirasuna K, Garrod DR (1998):

Immunohistochemical study of desmosomes in oral squamous cell carcinoma: correlation with cytokeratin and E-cadherin staining, and with tumour behaviour.
J Pathol 184, 369-381

Sinha AA, Gleason DF, Deleon OF, Wilson MJ, Sloane BF (1993):

Localization of a biotinylated cathepsin B oligonucleotide probe in human prostate including invasive cells and invasive edges by in situ hybridization.

Anat Rec 235, 233-240

Sloane BF, Moin K, Sameni M, Tait LR, Rozhin J, Ziegler G (1994):

Membrane association of cathepsin B can be induced by transfection of human breast epithelial cells with c-Ha-ras oncogene.

J Cell Sci 107 (Pt 2), 373-384

Snyderman CH, Klapan I, Milanovich M, Heo DS, Wagner R, Schwartz D, Johnson JT, Whiteside TL (1994):

Comparison of in vivo and in vitro prostaglandin E2 production by squamous cell carcinoma of the head and neck.

Otolaryngol Head Neck Surg 111, 189-196

Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M (2006):

Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells.

Stem Cells 24, 74-85

Stemmer V, de Craene B, Berx G, Behrens J (2008):

Snail promotes Wnt target gene expression and interacts with beta-catenin.

Oncogene 27, 5075-5080

Stewart BW, Kleihues P:

World Cancer Report.

Überarbeiteter Nachdruck (Juni 2003); IARC Press, Lyon 2003

Strojan P, Budihna M, Smid L, Svetic B, Vrhovec I, Kos J, Skrk J (2000):

Prognostic significance of cysteine proteinases cathepsins B and L and their endogenous inhibitors stefins A and B in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck.

Clin Cancer Res 6, 1052-1062

Surowiak P, Suchocki S, Gyorffy B, Gansukh T, Wojnar A, Maciejczyk A, Pudelko M, Zabel M (2006):

Stromal myofibroblasts in breast cancer: relations between their occurrence, tumor grade and expression of some tumour markers.

Folia Histochem Cytobiol 44, 111-116

Takano S, Kanai F, Jazag A, Ijichi H, Yao J, Ogawa H, Enomoto N, Omata M, Nakao A (2007):

Smad4 is essential for down-regulation of E-cadherin induced by TGF-beta in pancreatic cancer cell line PANC-1.

J Biochem 141, 345-351

Taki M, Verschuere K, Yokoyama K, Nagayama M, Kamata N (2006):

Involvement of Ets-1 transcription factor in inducing matrix metalloproteinase-2 expression by epithelial-mesenchymal transition in human squamous carcinoma cells.

Int J Oncol 28, 487-496

Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF (2005):

The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia.

Cancer Res 65, 5996-6000; discussion 6000-5991

Thomas GJ, Speight PM (2001):

Cell adhesion molecules and oral cancer.

Crit Rev Oral Biol Med 12, 479-498

Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D (2005):

Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition?

Cancer Res 65, 5991-5995; discussion 5995

Tokumaru Y, Fujii M, Otani Y, Kameyama K, Imanishi Y, Igarashi N, Kanzaki J (2000):
Activation of matrix metalloproteinase-2 in head and neck squamous cell carcinoma: studies of clinical samples and in vitro cell lines co-cultured with fibroblasts.
Cancer Lett 150, 15-21

Uraguchi M, Morikawa M, Shirakawa M, Sanada K, Imai K (2004):
Activation of WNT family expression and signaling in squamous cell carcinomas of the oral cavity.
J Dent Res 83, 327-332

van Roy F, Berx G (2008):
The cell-cell adhesion molecule E-cadherin.
Cell Mol Life Sci 65, 3756-3788

Viebahn C, Mayer B, Miething A (1995):
Morphology of incipient mesoderm formation in the rabbit embryo: a light- and retrospective electron-microscopic study.
Acta Anat (Basel) 154, 99-110

Vincent T, Neve EP, Johnson JR, Kukalev A, Rojo F, Albanell J, Pietras K, Virtanen I, Philipson L, Leopold PL et al. (2009):
A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition.
Nat Cell Biol 11, 943-950

Visse R, Nagase H (2003):
Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry.
Circ Res 92, 827-839

von Schlippe M, Marshall JF, Perry P, Stone M, Zhu AJ, Hart IR (2000):
Functional interaction between E-cadherin and alphav-containing integrins in carcinoma cells.
J Cell Sci 113 (Pt 3), 425-437

Wasylyk B, Hahn SL, Giovane A (1993):
The Ets family of transcription factors.
Eur J Biochem 211, 7-18

Watson DK, McWilliams-Smith MJ, Nunn MF, Duesberg PH, O'Brien SJ, Papas TS (1985):
The ets sequence from the transforming gene of avian erythroblastosis virus, E26, has unique domains on human chromosomes 11 and 21: both loci are transcriptionally active.
Proc Natl Acad Sci U S A 82, 7294-7298

Wei W, Chua MS, Grepper S, So SK (2009):
Blockade of Wnt-1 signaling leads to anti-tumor effects in hepatocellular carcinoma cells.
Mol Cancer 8, 76

Wells A, Yates C, Shepard CR (2008):
E-cadherin as an indicator of mesenchymal to epithelial reverting transitions during the metastatic seeding of disseminated carcinomas.
Clin Exp Metastasis 25, 621-628

Wernert N (1997):
The multiple roles of tumour stroma.
Virchows Arch 430, 433-443

Wernert N, Raes MB, Lassalle P, Dehouck MP, Gosselin B, Vandebunder B, Stehelin D (1992):
c-ets1 proto-oncogene is a transcription factor expressed in endothelial cells during tumor vascularization and other forms of angiogenesis in humans.
Am J Pathol 140, 119-127

Wernert N, Gilles F, Fafeur V, Bouali F, Raes MB, Pyke C, Dupressoir T, Seitz G, Vandebunder B, Stehelin D (1994):

Stromal expression of c-Ets1 transcription factor correlates with tumor invasion.
Cancer Res 54, 5683-5688

Whiteside TL, Sung MW, Nagashima S, Chikamatsu K, Okada K, Vujanovic NL (1998):

Human tumor antigen-specific T lymphocytes and interleukin-2-activated natural killer cells: comparisons of antitumor effects in vitro and in vivo.
Clin Cancer Res 4, 1135-1145

Wickramasinghe NS, Nagaraj NS, Vigneswaran N, Zacharias W (2005a):

Cathepsin B promotes both motility and invasiveness of oral carcinoma cells.
Arch Biochem Biophys 436, 187-195

Wickramasinghe NS, Banerjee K, Nagaraj NS, Vigneswaran N, Zacharias W (2005b):

Hypoxia alters cathepsin B / inhibitor profiles in oral carcinoma cell lines.
Anticancer Res 25, 2841-2849

Wiegand S, Dunne AA, Muller HH, Mandic R, Barth P, Davis RK, Werner JA (2005):

Metaanalysis of the significance of matrix metalloproteinases for lymph node disease in patients with head and neck squamous cell carcinoma.
Cancer 104, 94-100

Wu M, Xu G, Xi L, Wei J, Song A, Han Z, Zhou J, Wang S, Zhu T, Zhang A et al. (2006):

Down-regulation of MT1-MMP expression suppresses tumor cell invasion in metastatic human SW626 ovarian cancer cells.
Oncol Rep 15, 501-505

Yamaguchi T, Naruishi K, Arai H, Nishimura F, Takashiba S (2008):

IL-6/sIL-6R enhances cathepsin B and L production via caveolin-1-mediated JNK-AP-1 pathway in human gingival fibroblasts.
J Cell Physiol 217, 423-432

Yan S, Sloane BF (2003):

Molecular regulation of human cathepsin B: implication in pathologies.
Biol Chem 384, 845-854

Yang F, Zeng Q, Yu G, Li S, Wang CY (2006):

Wnt/beta-catenin signaling inhibits death receptor-mediated apoptosis and promotes invasive growth of HNSCC.
Cell Signal 18, 679-687

Yang J, Weinberg RA (2008):

Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis.
Dev Cell 14, 818-829

Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA (2004):

Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis.
Cell 117, 927-939

Zhang J, Li Y, Liu Q, Lu W, Bu G (2010):

Wnt signaling activation and mammary gland hyperplasia in MMTV-LRP6 transgenic mice: implication for breast cancer tumorigenesis.
Oncogene 29, 539-49

Zhang W, Matrisian LM, Holmbeck K, Vick CC, Rosenthal EL (2006):

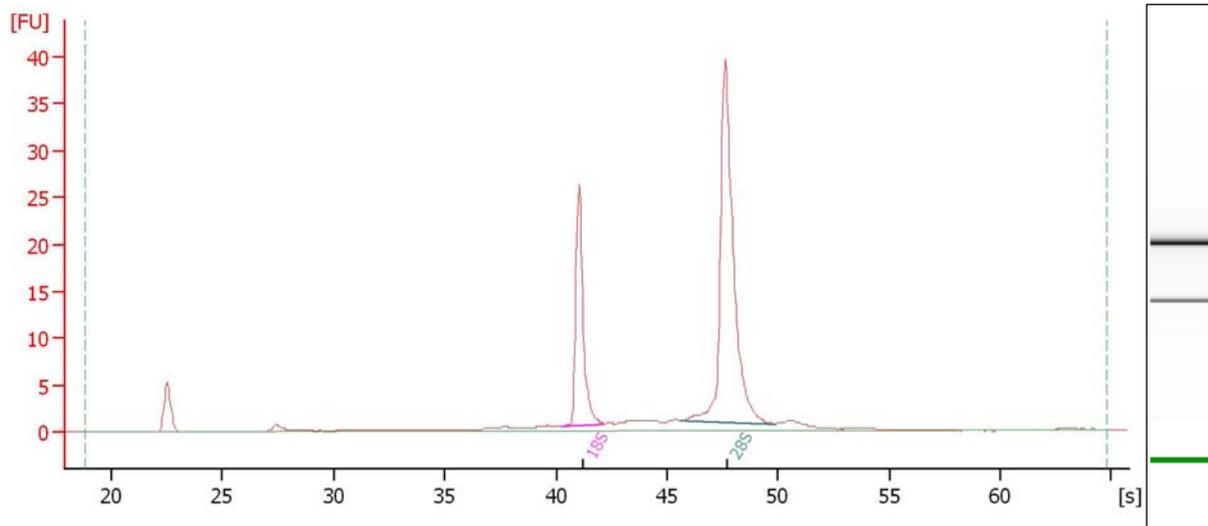
Fibroblast-derived MT1-MMP promotes tumor progression in vitro and in vivo.
BMC Cancer 6, 52

Zhu Y, Sun Z, Han Q, Liao L, Wang J, Bian C, Li J, Yan X, Liu Y, Shao C et al. (2009):
Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1.
Leukemia 23, 925-33

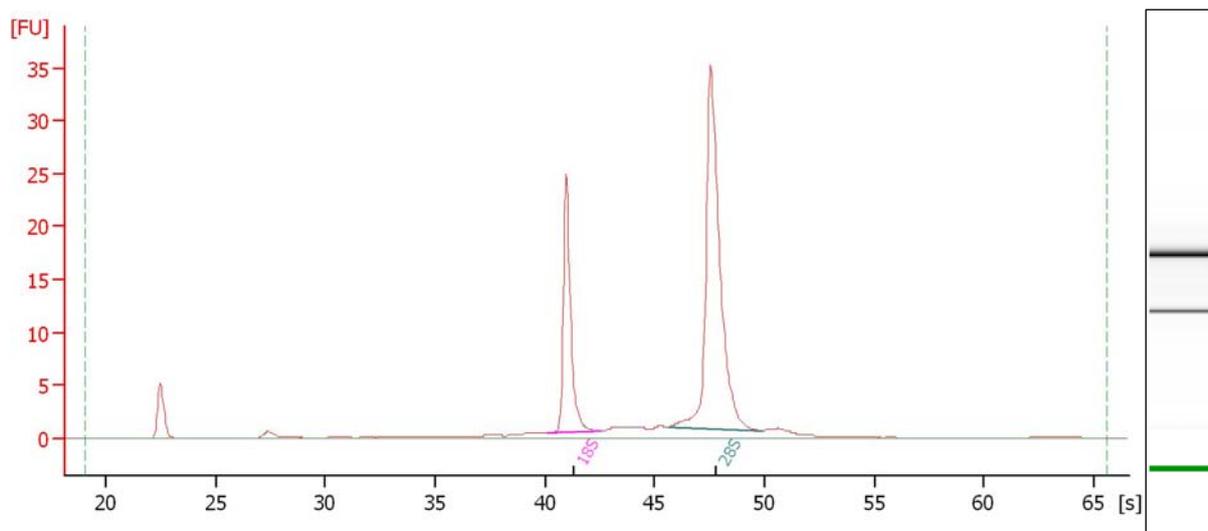
Zidar N, Gale N, Kojc N, Volavsek M, Cardesa A, Alos L, Hofler H, Blechschmidt K, Becker KF (2008):
Cadherin-catenin complex and transcription factor Snail-1 in spindle cell carcinoma of the head and neck.
Virchows Arch 453, 267-274

Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH (2001):
Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies.
Tissue Eng 7, 211-228

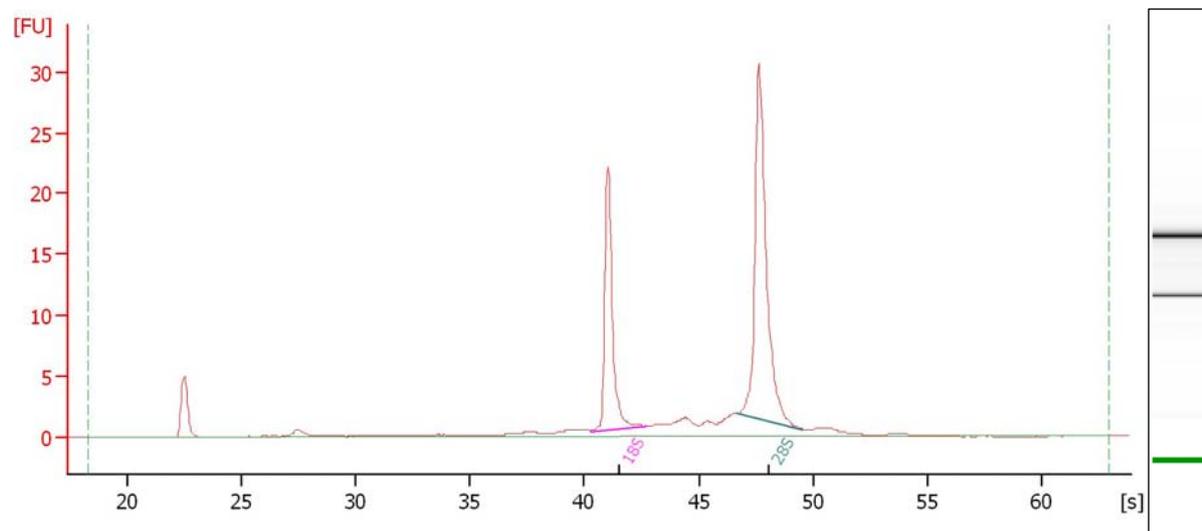
Zuker M (2003):
Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction.
Nucleic Acids Res 31, 3406-3415

Anhang: Qualitätskontrollen der analysierten RNA (RNA-Elektrophorese)**Patient 2****Patient 2, Tag 4, Kokultur PCI-13+hMSC**

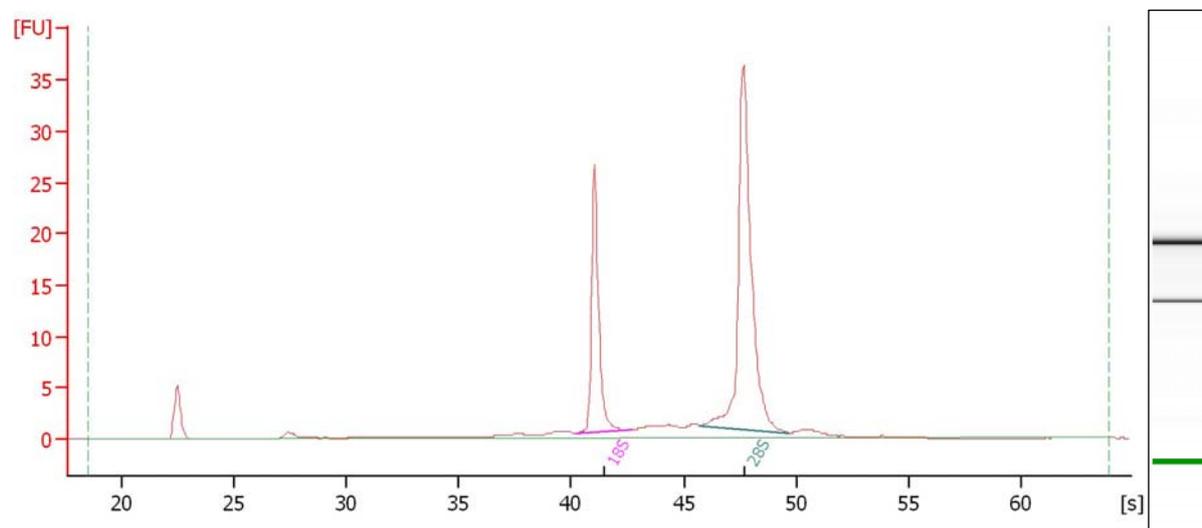
RNA Integrity Number (RIN): 10,0

Patient 2, Tag 4, Kontrolle PCI-13

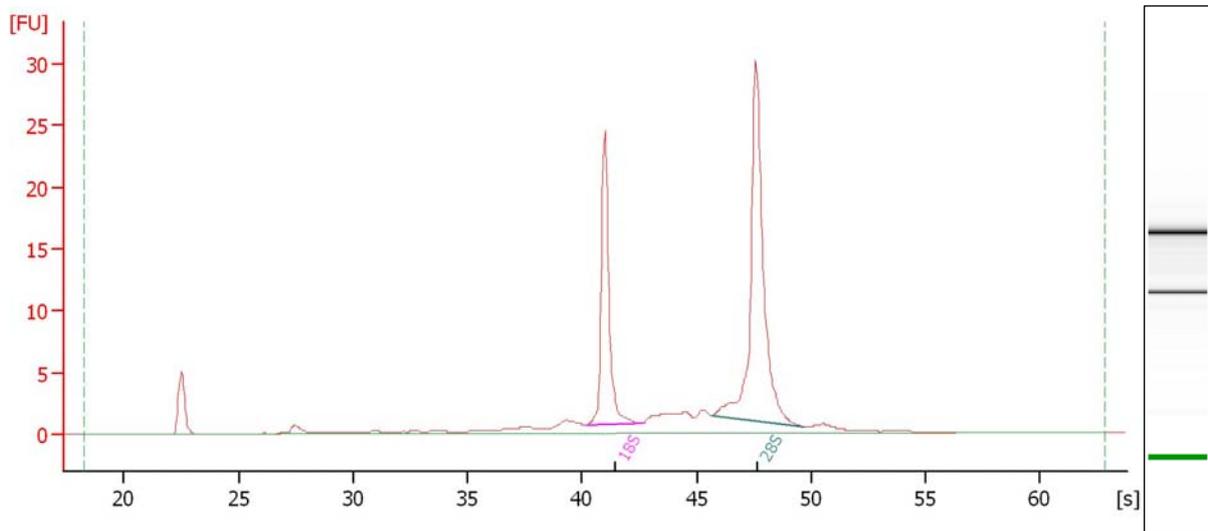
RNA Integrity Number (RIN): 10,0

Patient 2, Tag 7, Kokultur PCI-13+hMSC

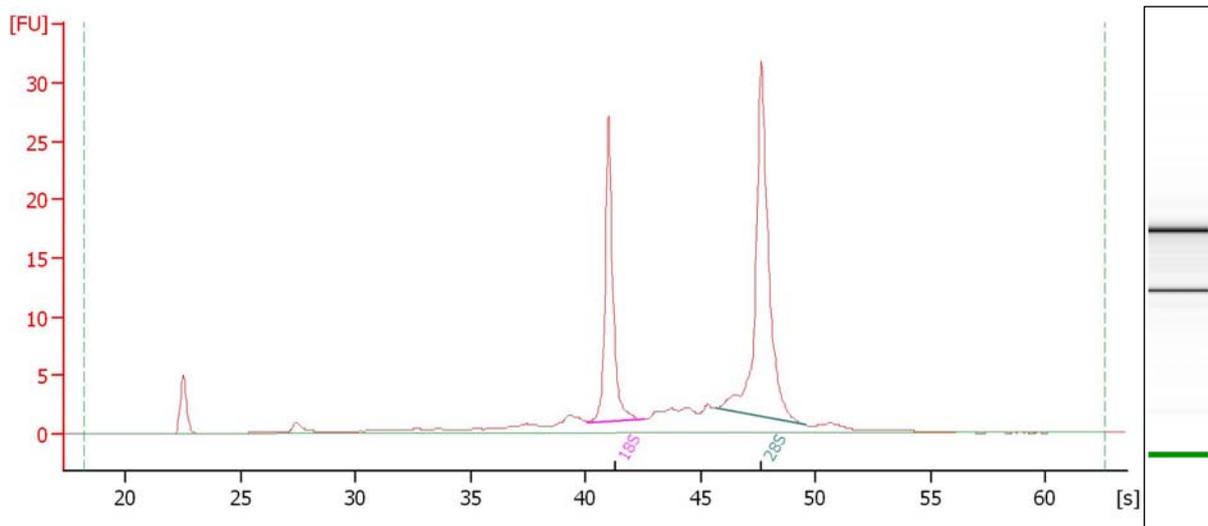
RNA integrity number (RIN): 9,8

Patient 2, Tag 7, Kontrolle PCI-13

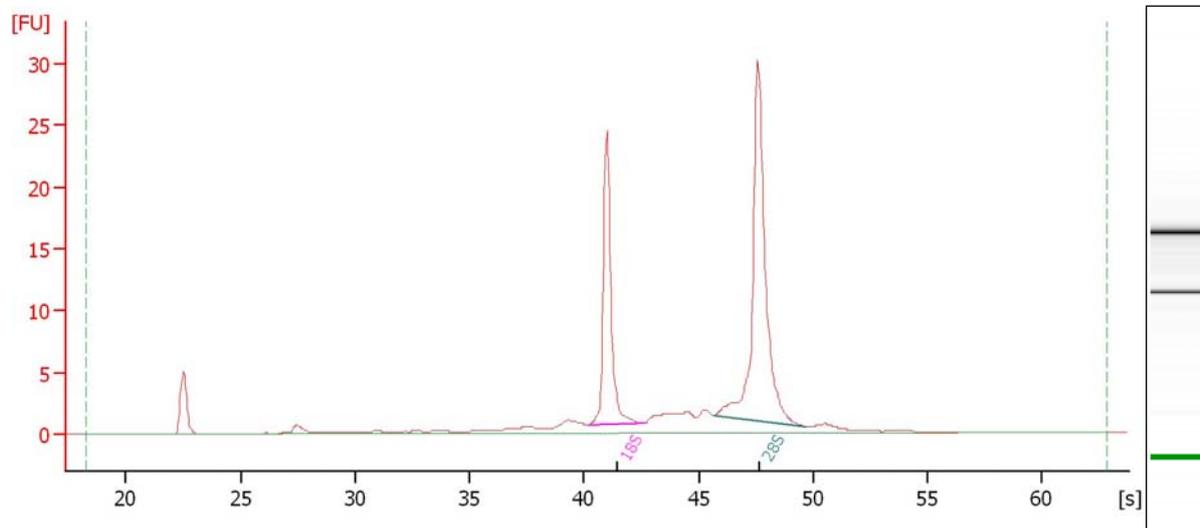
RNA integrity number (RIN): 10,0

Patient 2, Tag 14, Kokultur PCI-13+hMSC

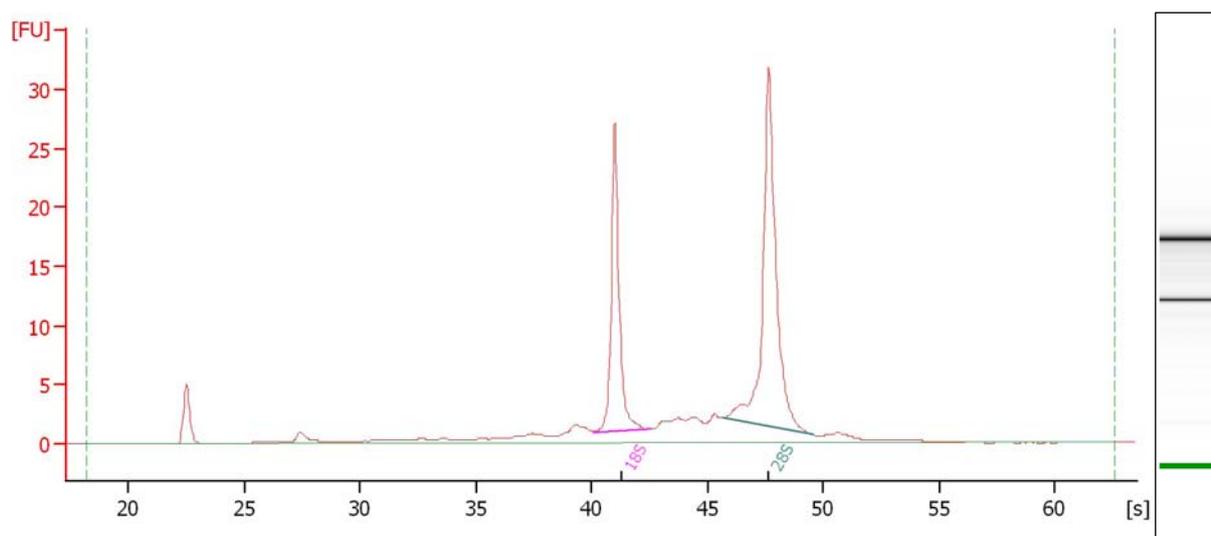
RNA integrity number (RIN): 9,7

Patient 2, Tag 14, Kontrolle PCI-13

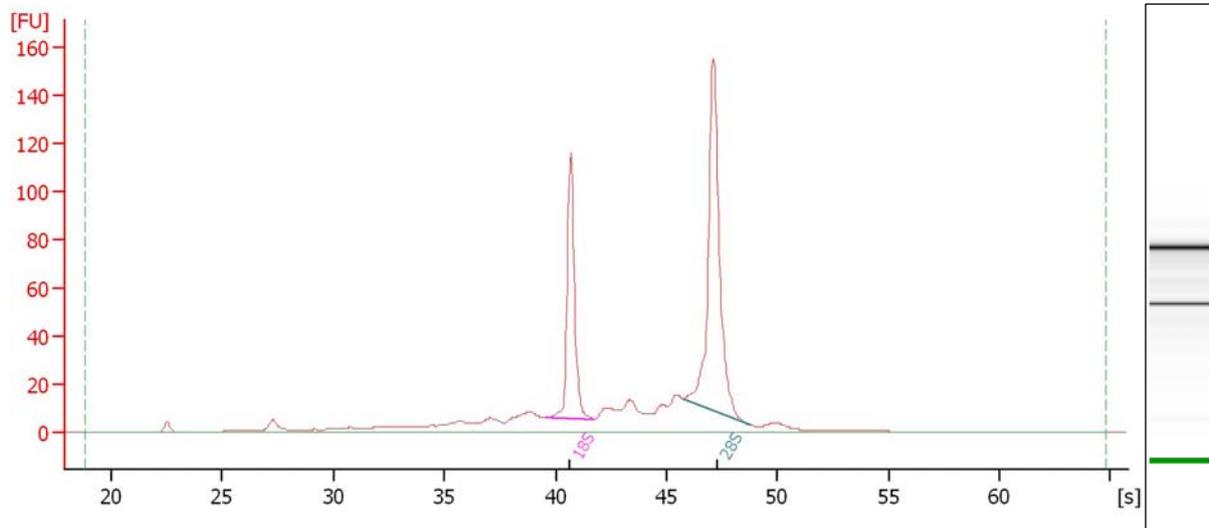
RNA integrity number (RIN): 9,3

Patient 3**Patient 3, Tag 4, Kokultur PCI-13+hMSC**

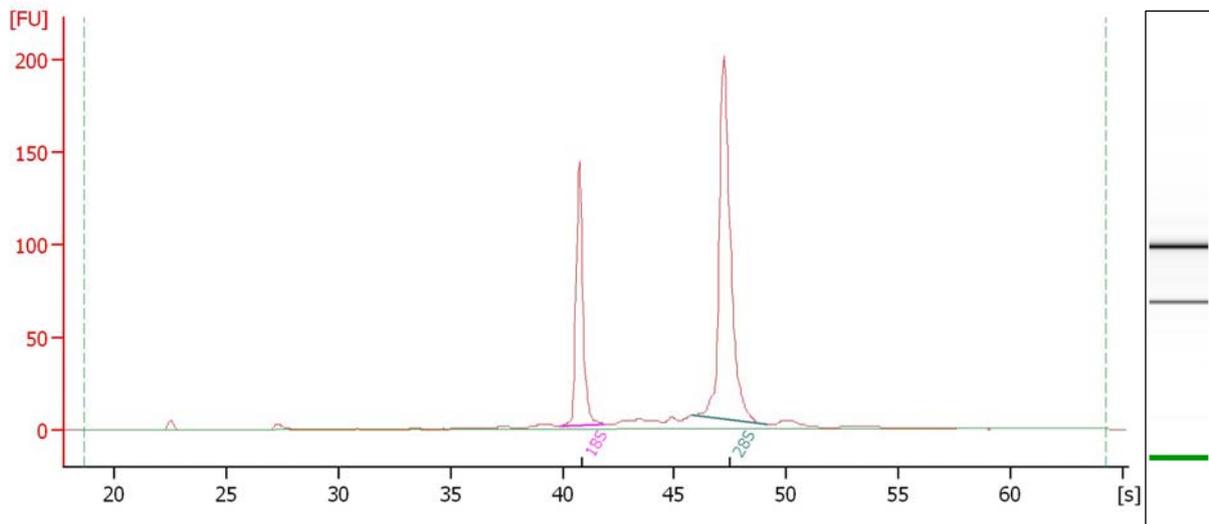
RNA integrity number (RIN): 10,0

Patient 3, Tag 4, Kontrolle PCI-13

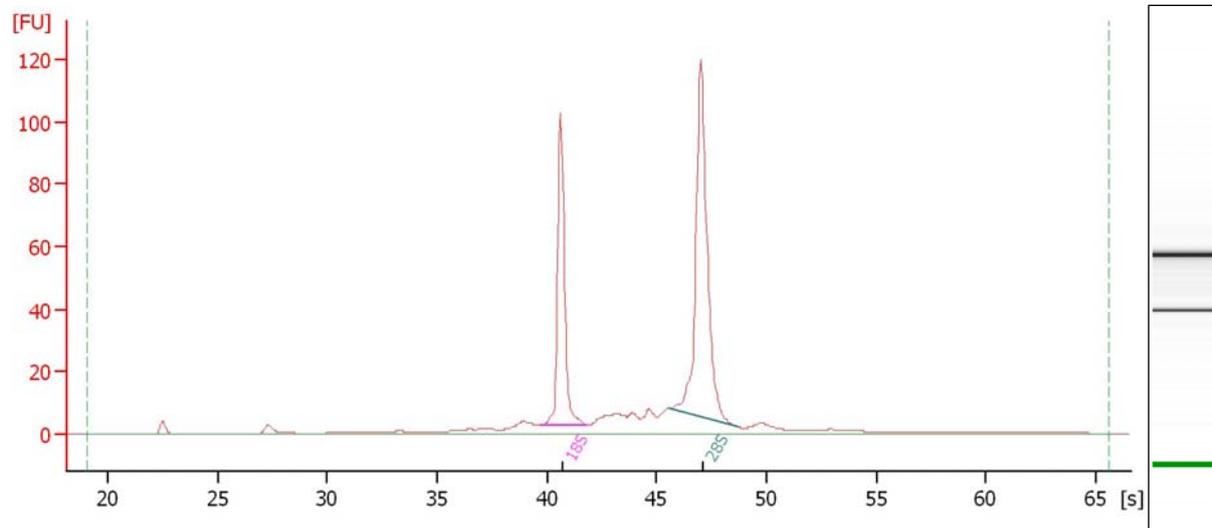
RNA integrity number (RIN): 10,0

Patient 3, Tag 7, Kokultur PCI-13+hMSC

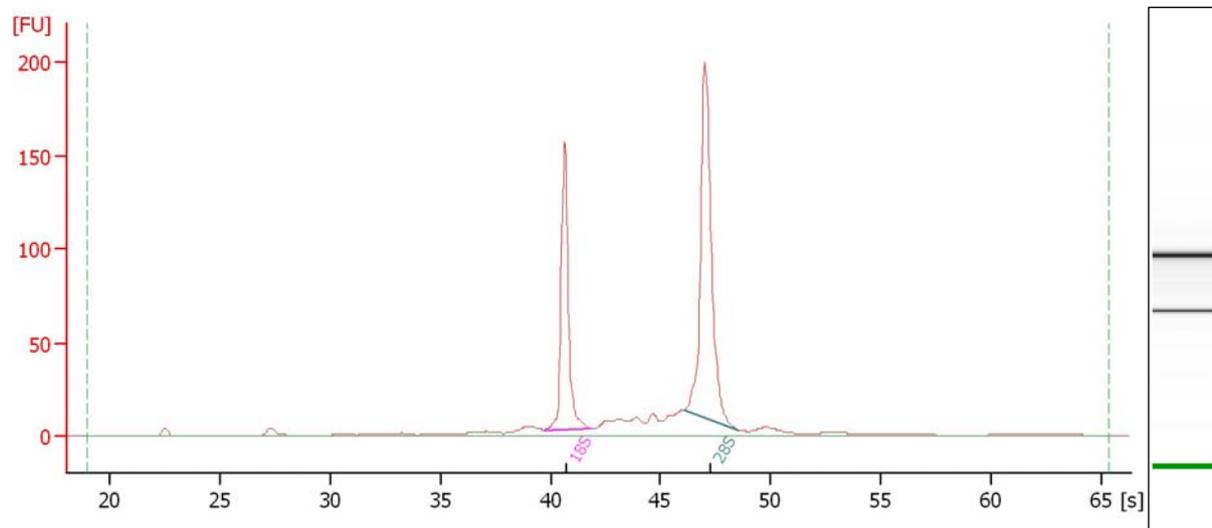
RNA integrity number (RIN): 8,7

Patient 3, Tag 7, Kontrolle PCI-13

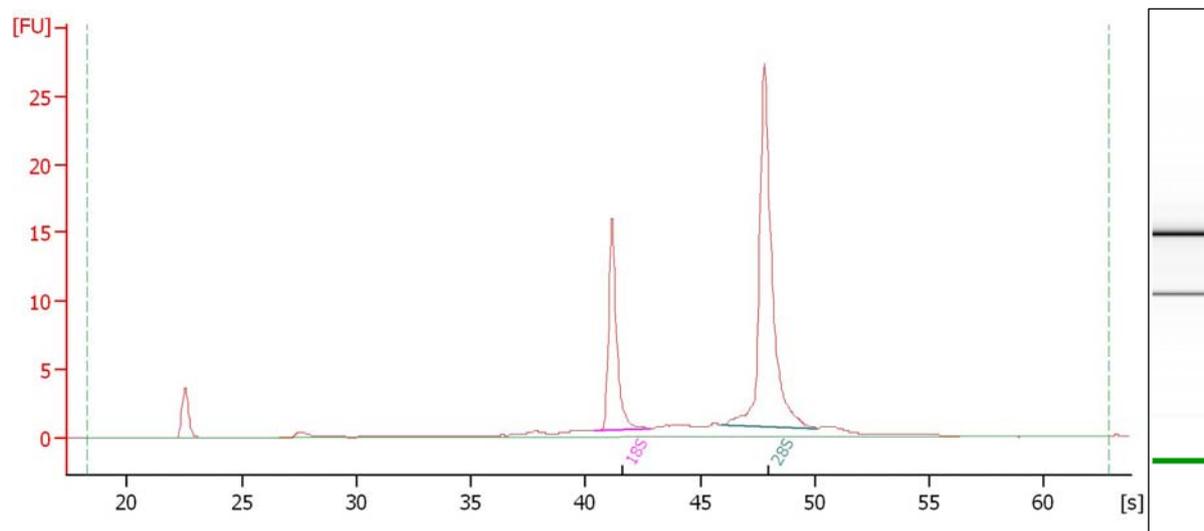
RNA integrity number (RIN): 10,0

Patient 3, Tag 14, Kokultur PCI-13+hMSC

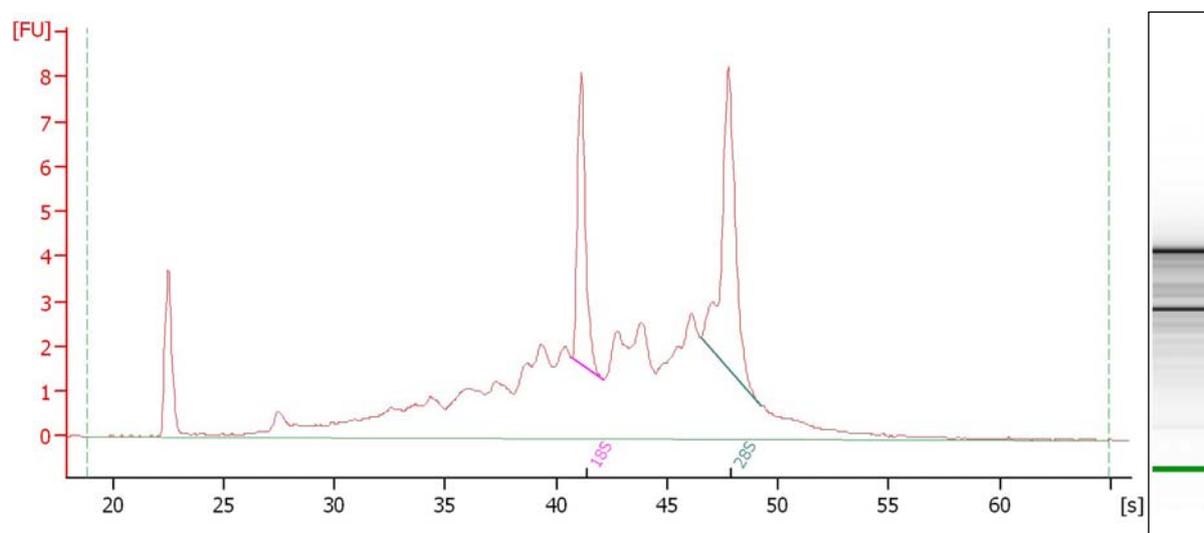
RNA integrity number (RIN): 9,6

Patient 3, Tag 14, Kontrolle PCI-13

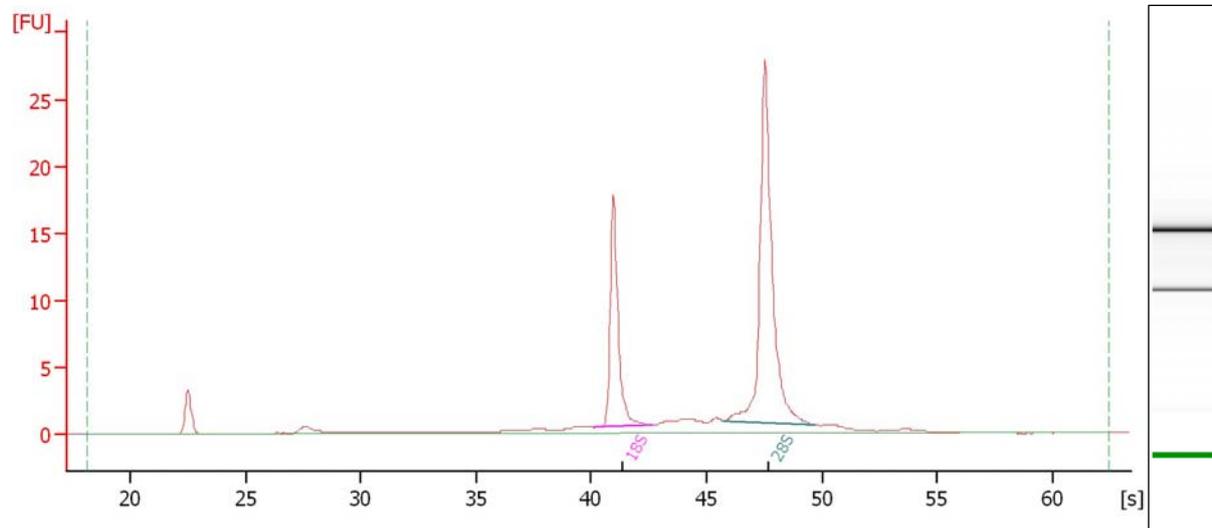
RNA integrity number (RIN): 9,9

Patient 4**Patient 4, Tag 4, Kokultur PCI-13+hMSC**

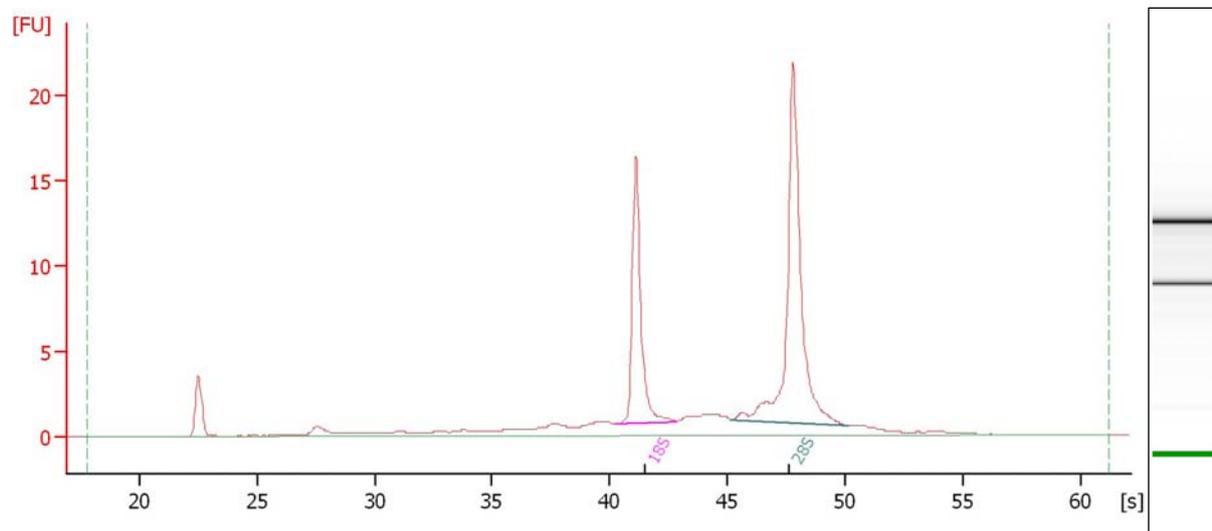
RNA integrity number (RIN): 9,9

Patient 4, Tag 4, Kontrolle PCI-13

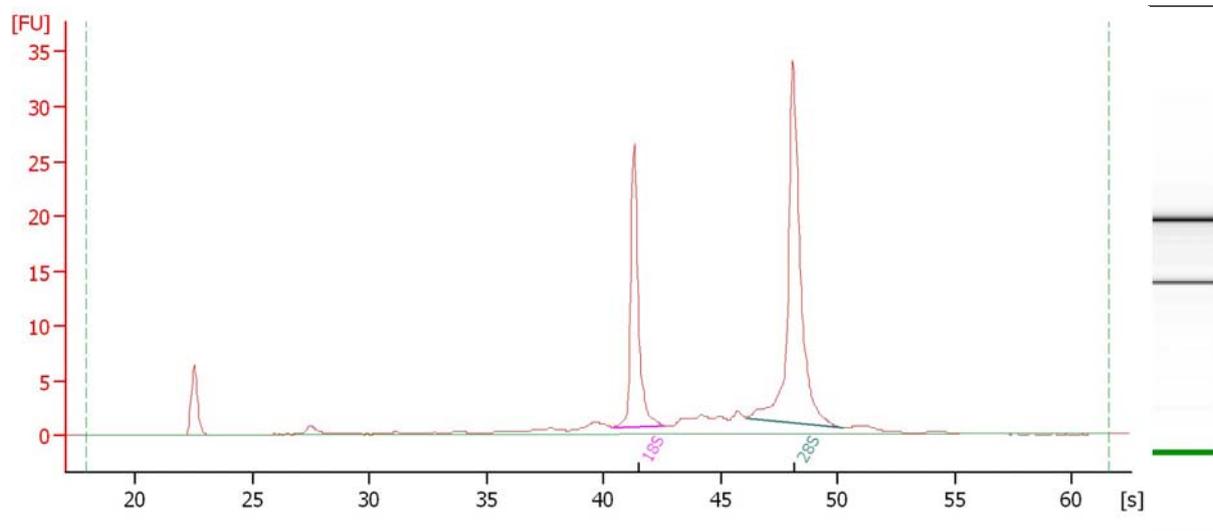
RNA integrity number (RIN): 6,5

Patient 4, Tag 7, Kokultur PCI-13+hMSC

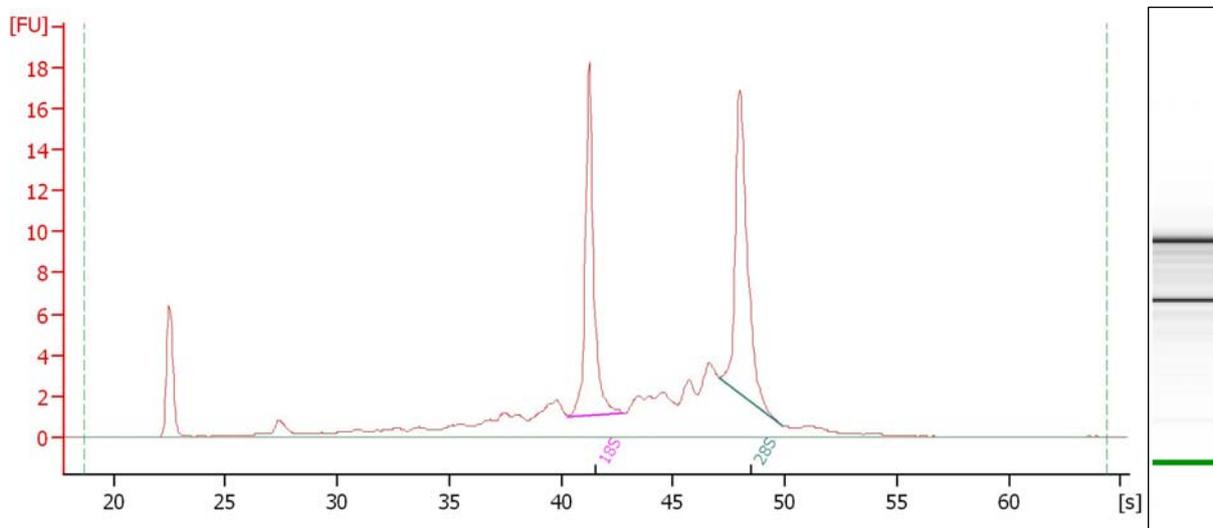
RNA integrity number (RIN): 10,0

Patient 4, Tag 7, Kontrolle PCI-13

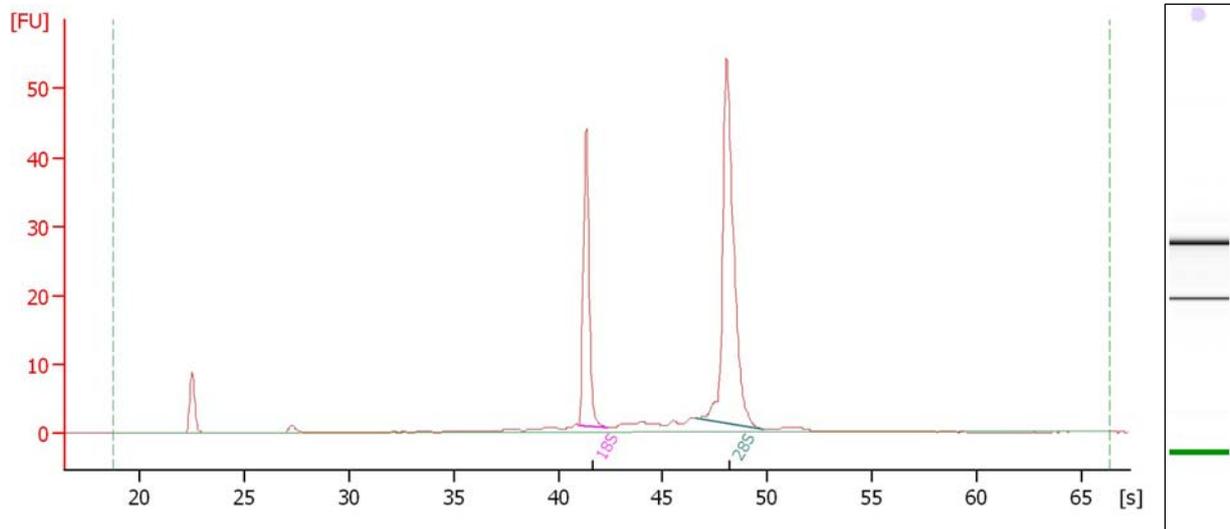
RNA integrity number (RIN): 9,3

Patient 4, Tag 14, Kokultur PCI-13+hMSC

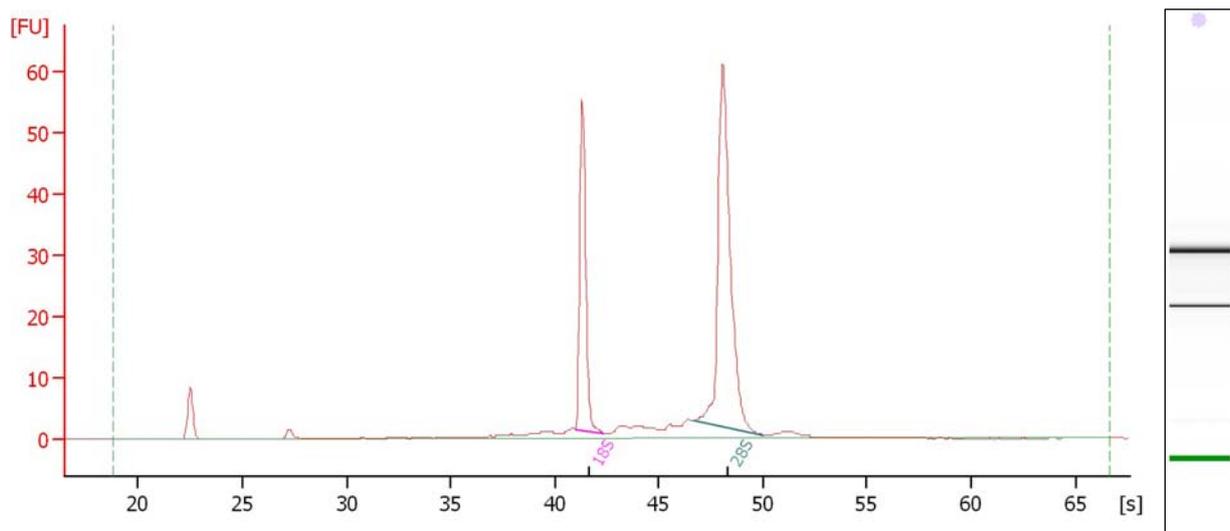
RNA integrity number (RIN): 9,8

Patient 4, Tag 14, Kontrolle PCI-13

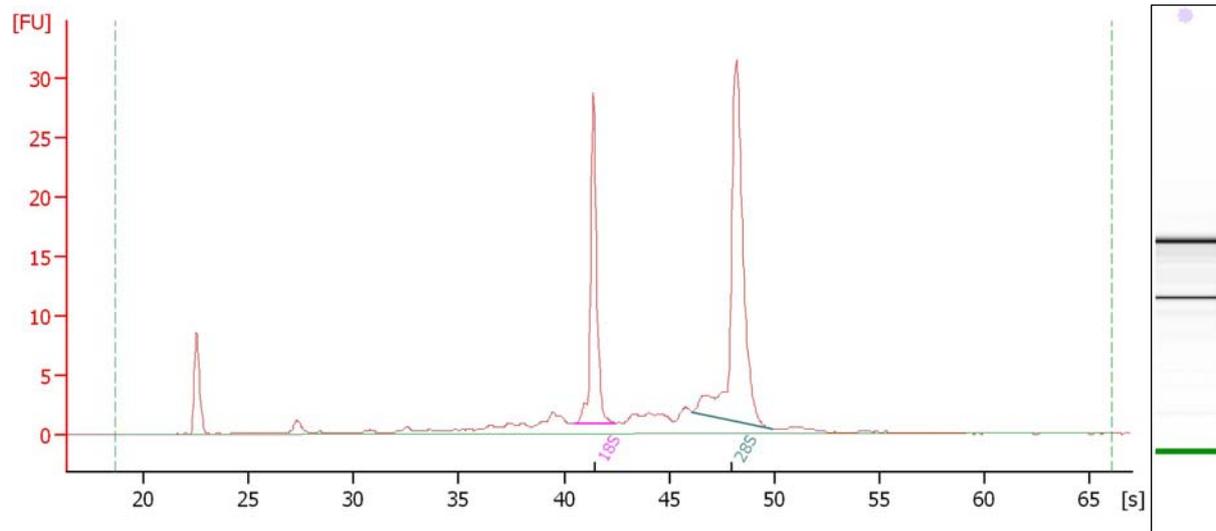
RNA integrity number (RIN): 7,5

Patient 5**Patient 5, Tag 4, Kokultur PCI-13+hMSC**

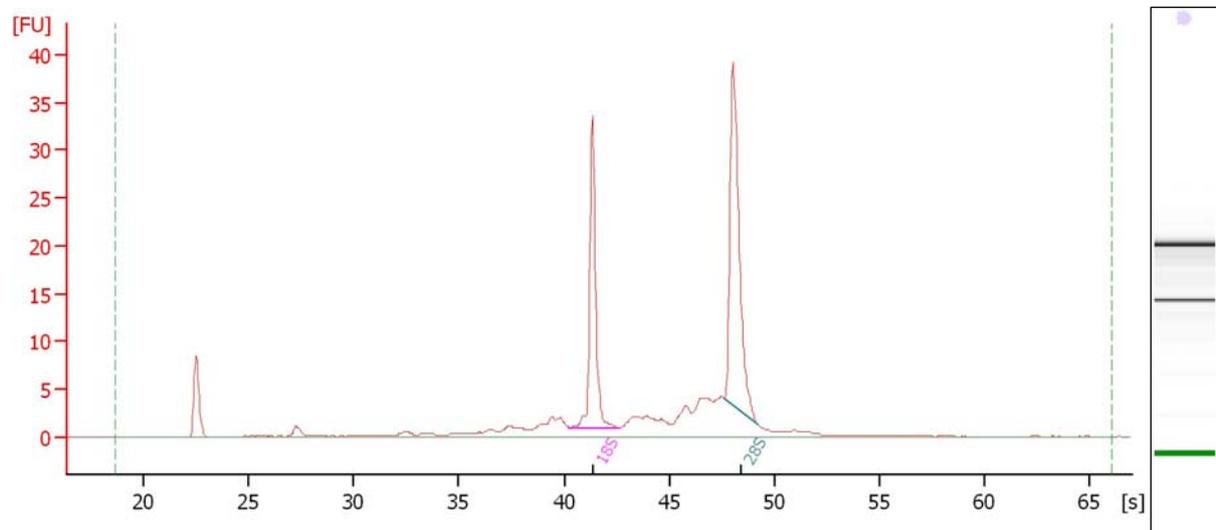
RNA integrity number (RIN): 10,0

Patient 5, Tag 4, Kontrolle PCI-13

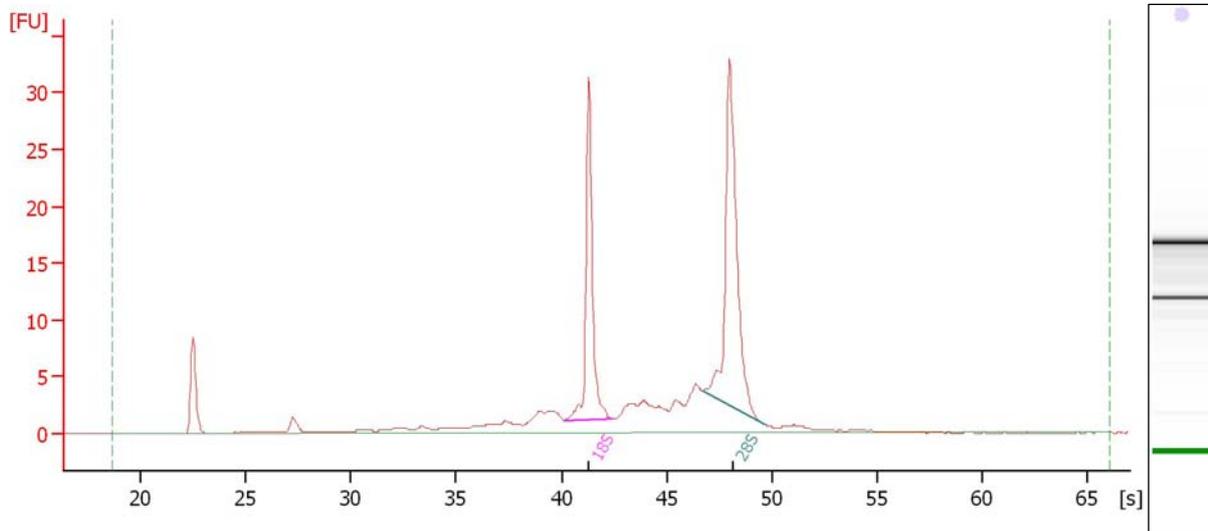
RNA integrity number (RIN): 9,9

Patient 5, Tag 7, Kokultur PCI-13+hMSC

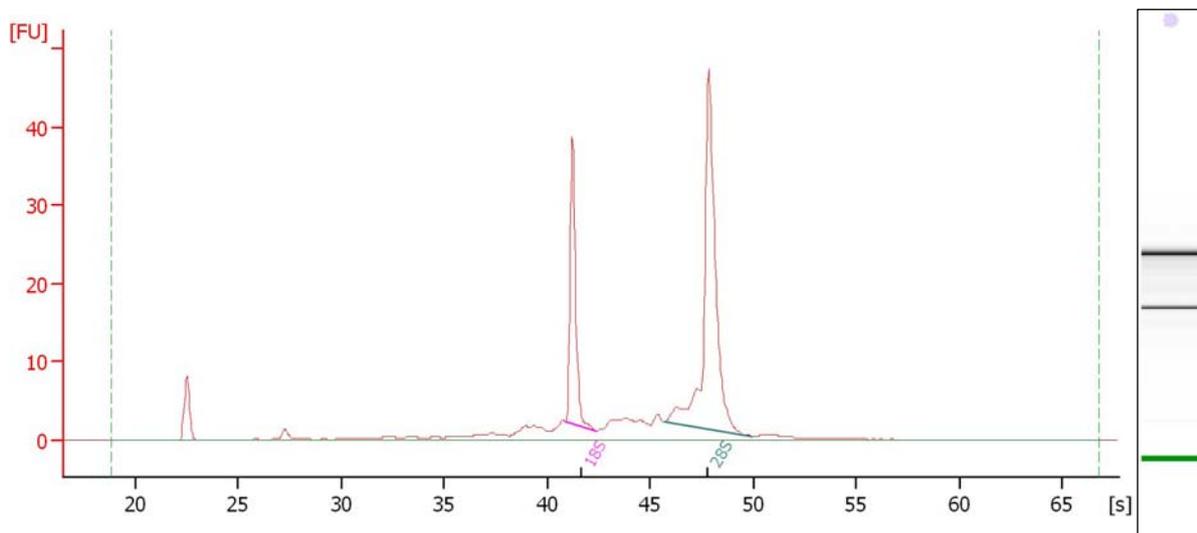
RNA integrity number (RIN): 9,2

Patient 5, Tag 7, Kontrolle PCI-13

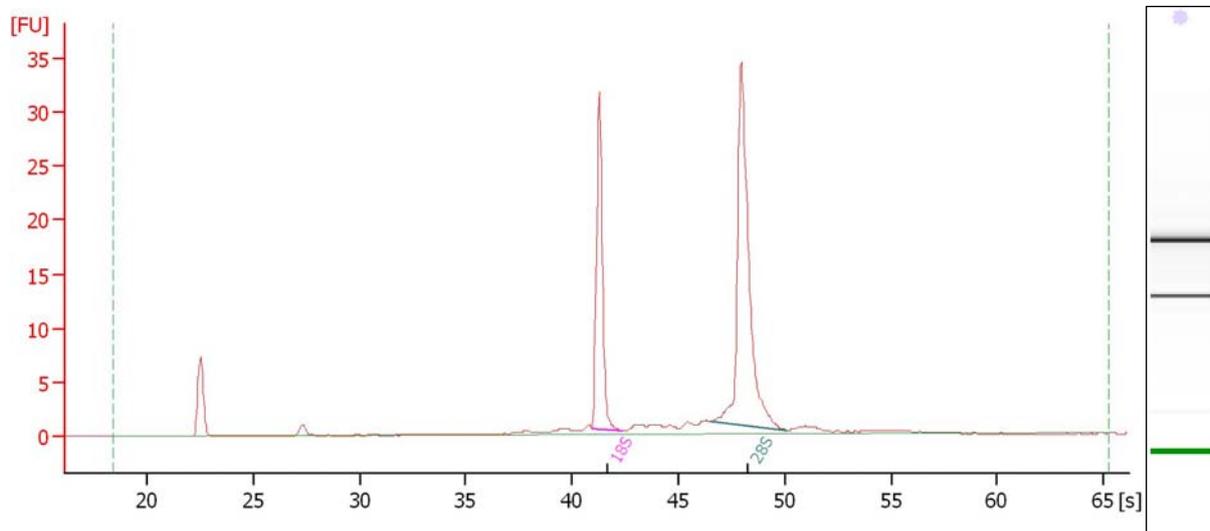
RNA integrity number (RIN): 9,0

Patient 5, Tag 14, Kokultur PCI-13+hMSC

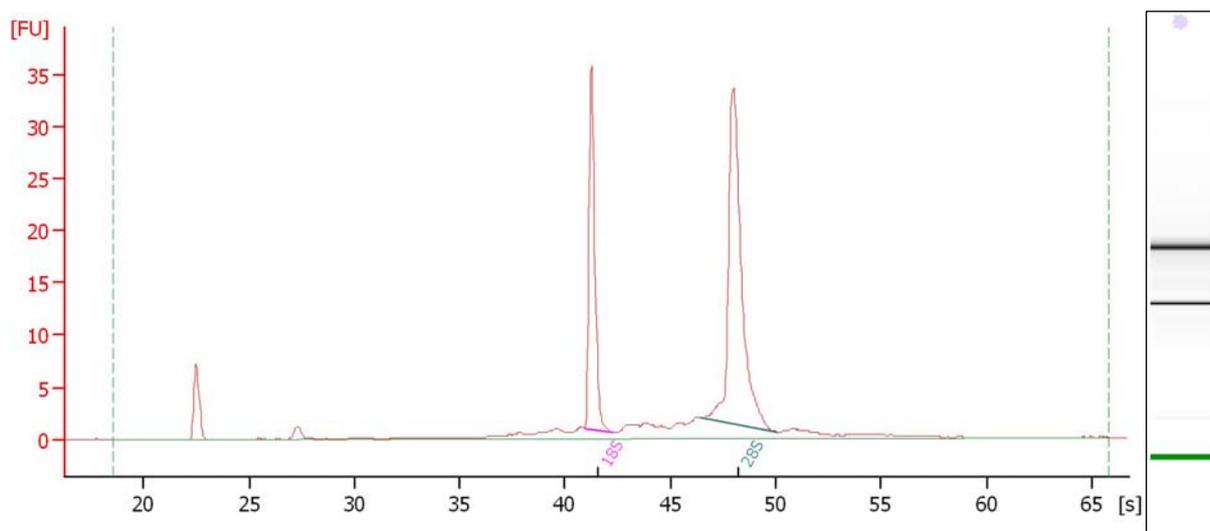
RNA integrity number (RIN): 9,3

Patient 5, Tag 14, Kontrolle PCI-13

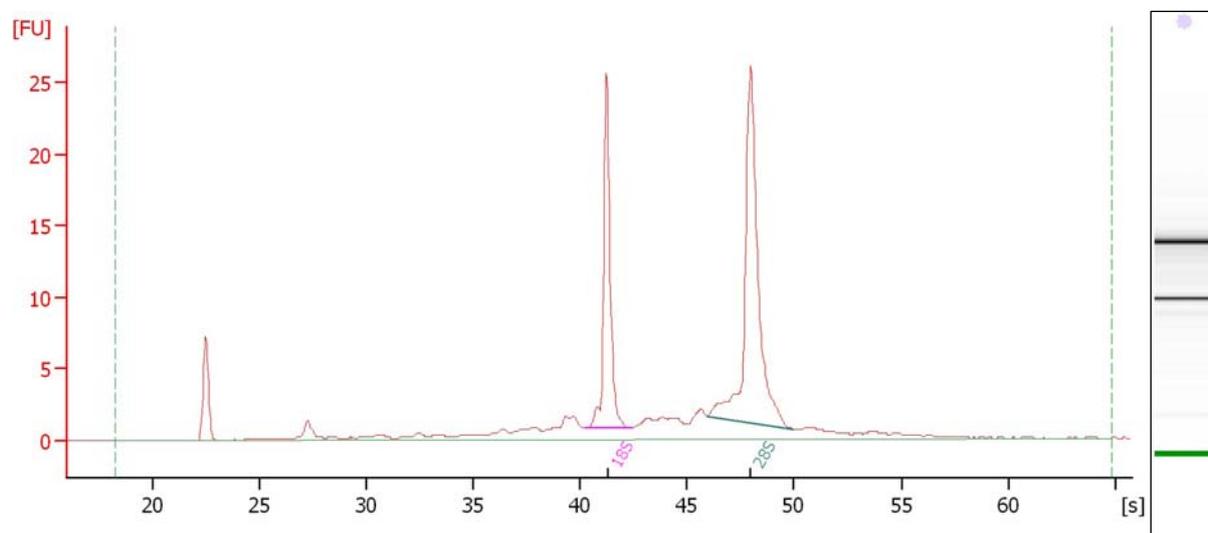
RNA integrity number (RIN): 8,7

Patient 6**Patient 6, Tag 4, Kokultur PCI-13+hMSC**

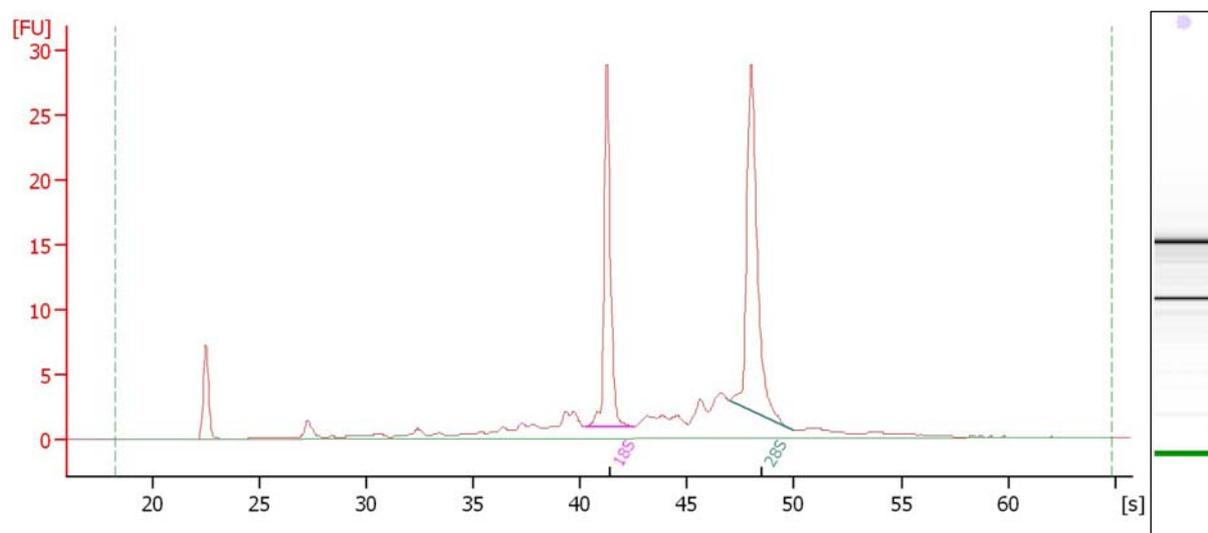
RNA integrity number (RIN): 10,0

Patient 6, Tag 4, Kontrolle PCI-13

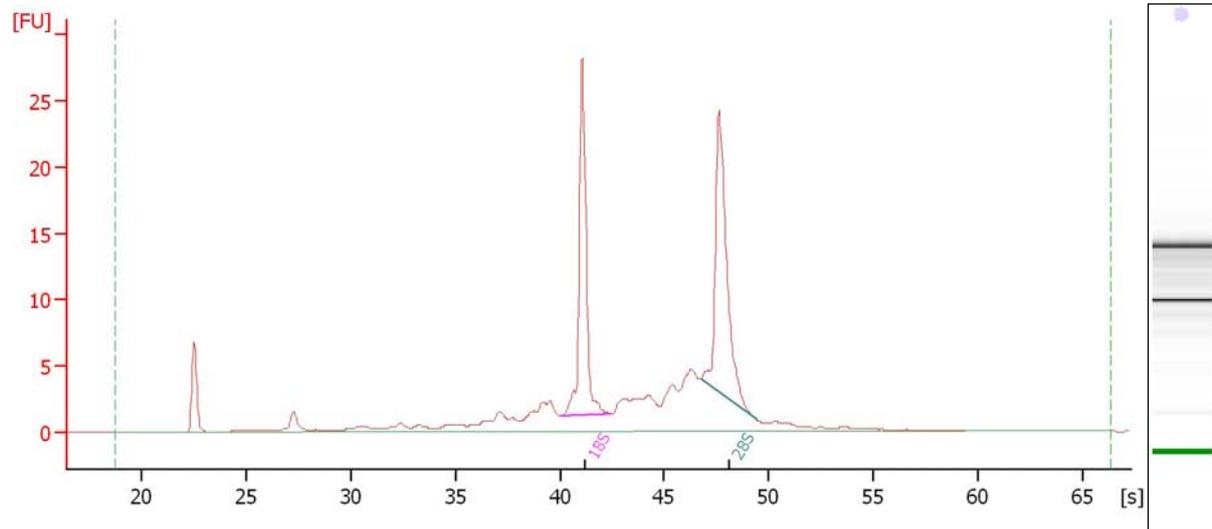
RNA integrity number (RIN): 9,7

Patient 6, Tag 7, Kokultur PCI-13+hMSC

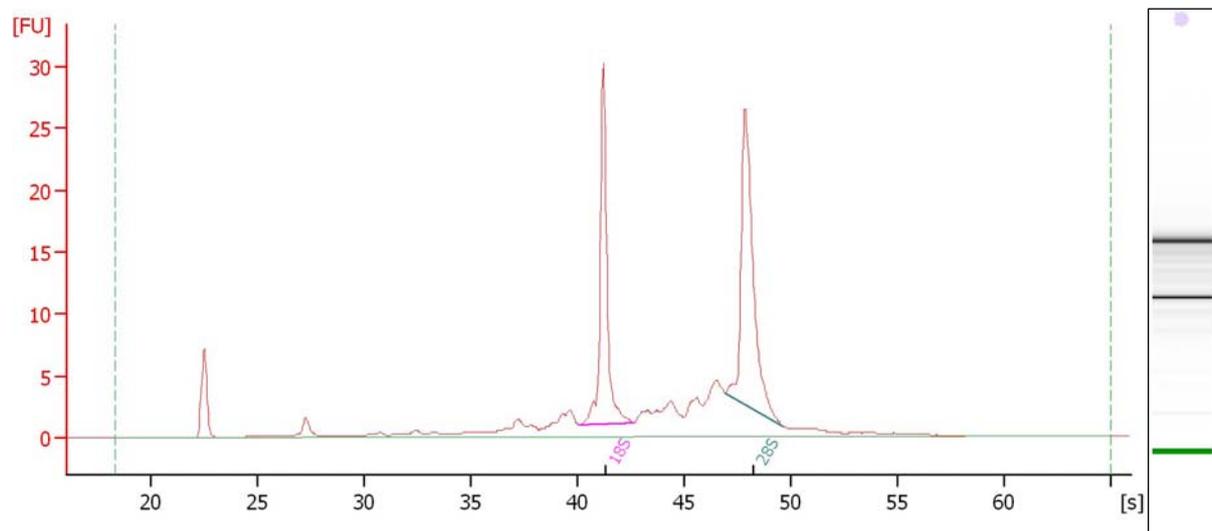
RNA integrity number (RIN): 9,2

Patient 6, Tag 7, Kontrolle PCI-13

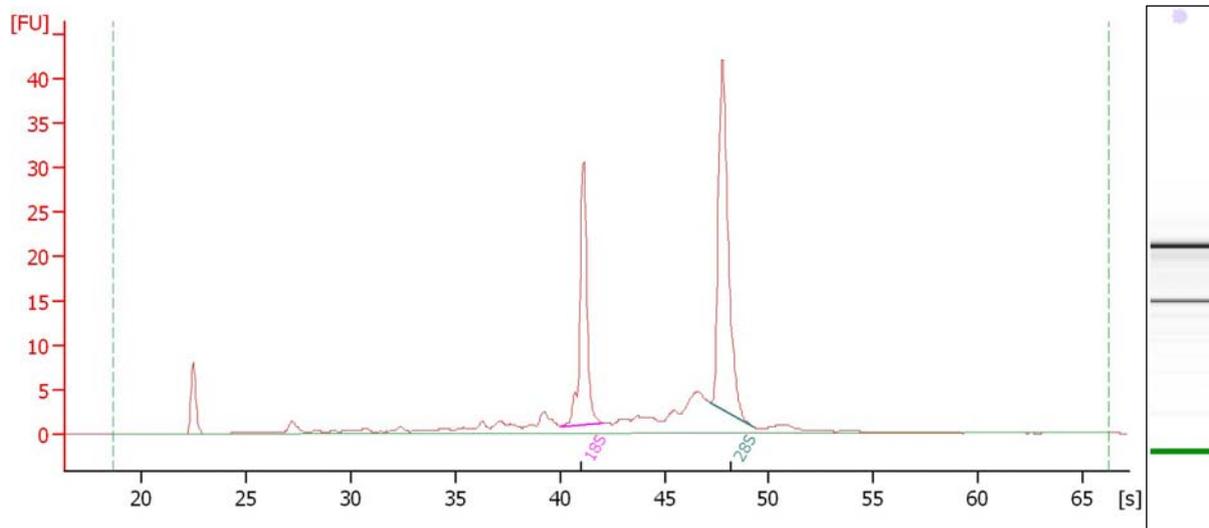
RNA integrity number (RIN): 8,7

Patient 6, Tag 14, Kokultur PCI-13+hMSC

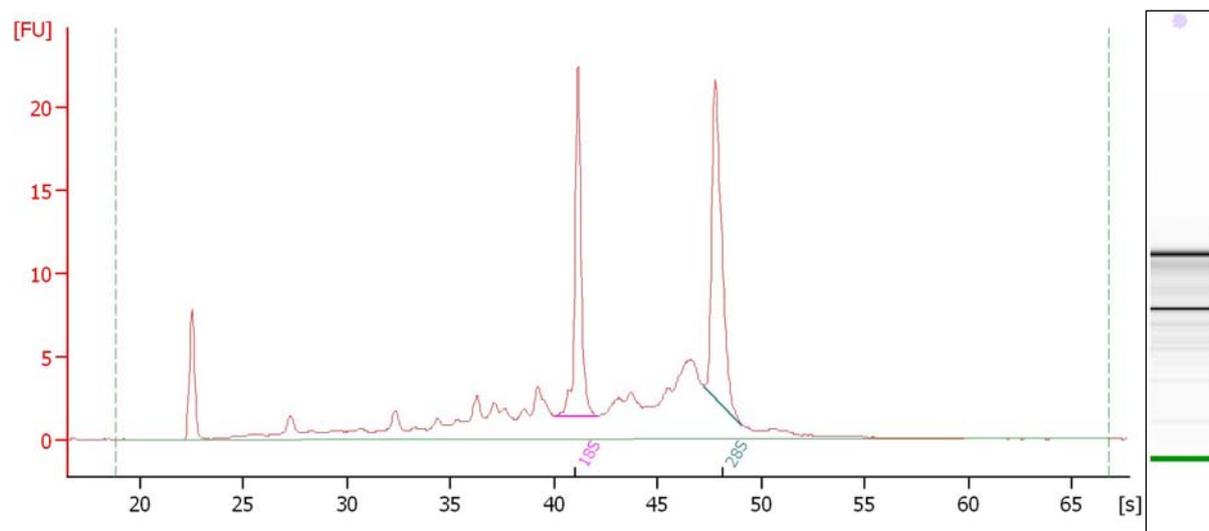
RNA integrity number (RIN): 8,8

Patient 6, Tag 14, Kontrolle PCI-13

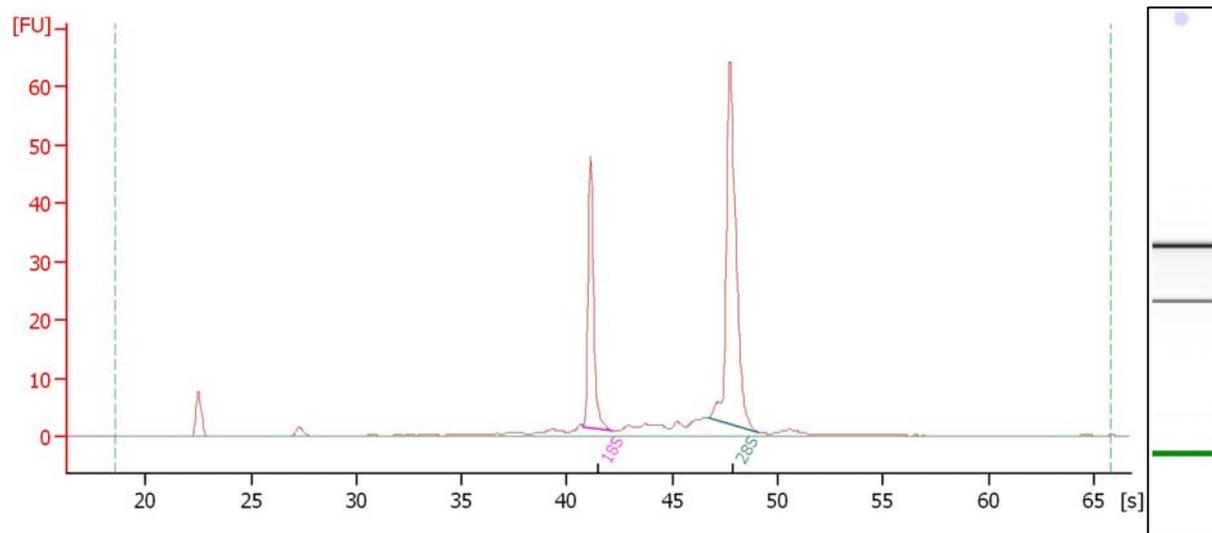
RNA integrity number (RIN): 8,2

Patient 7**Patient 7, Tag 4, Kokultur PCI-13+hMSC**

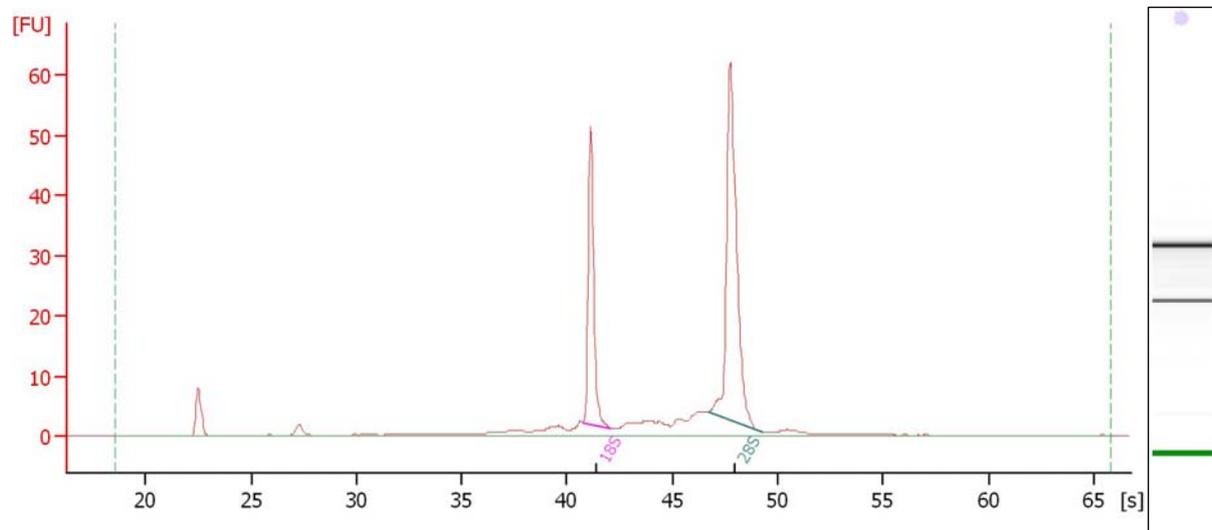
RNA integrity number (RIN): 9,0

Patient 7 Tag 4, Kontrolle PCI-13

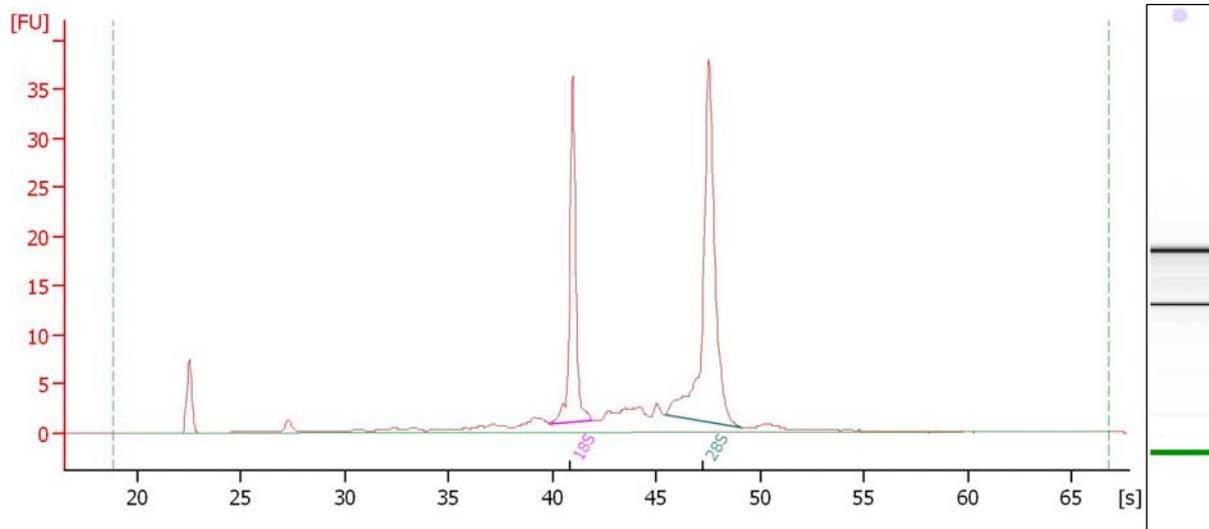
RNA integrity number (RIN): 7,4

Patient 7, Tag 7, Kokultur PCI-13+hMSC

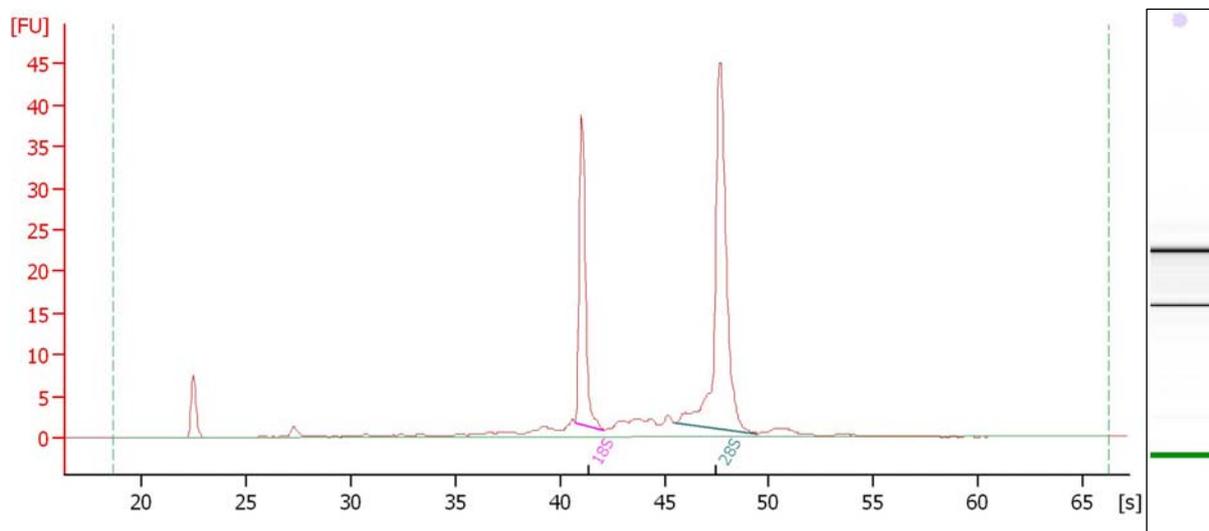
RNA integrity number (RIN): 10,0

Patient 7, Tag 7, Kontrolle PCI-13

RNA integrity number (RIN): 9,6

Patient 7, Tag 14, Kokultiv PCI-13+hMSC

RNA integrity number (RIN): 9,5

Patient 7, Tag 14, Kontrolle PCI-13

RNA integrity number (RIN): 9,0

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. F.–J. Kramer, für die Vergabe des Themas sowie die hervorragende und umfassende Betreuung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. H. Schliephake sehr herzlich für die konstruktive Förderung und Unterstützung der Arbeit.

Für die kompetente Beratung bei statistischen Fragestellungen gilt mein Dank Herrn Dr. rer. nat. K. Jung aus der Abteilung für medizinische Statistik.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. T. E. Reichert, dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität Regensburg, sowie Herrn Dr. rer. nat. R. Bauer und Herrn Dr. rer. nat. A. Dowejko aus selbiger Abteilung für die freundliche Bereitstellung der PCI-13-Zellen.

Ich danke den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, insbesondere Frau J. Schulz, für die stets freundliche Hilfsbereitschaft und außerordentlich nette Zusammenarbeit.

Mein Dank gilt ebenfalls dem Labor der Abteilung Hämatologie und Onkologie für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Durchflusszytometrie.

Lebenslauf

Am 09.06.1977 wurde ich als erstes von zwei Kindern der Fachzahnärztin für Kieferorthopädie Dr. Monika Fricke-Klengel, geb. Klengel, und des Zahnarztes Dr. Heiner Fricke in Göttingen geboren.

Von 1983-1989 besuchte ich die Grundschule und Orientierungsstufe der Wilhelm-Raabe-Schule in Eschershausen. Anschließend war ich Schüler des Campe-Gymnasiums in Holzminden und erlangte dort 1996 die allgemeine Hochschulreife.

Es folgte ein zweijähriger Wehrdienst als Zeitsoldat bei der Luftwaffe in Wunstorf, während dessen ich zum Reserveoffizier ausgebildet wurde und an einem Auslandseinsatz teilnahm.

Zum Wintersemester 1998 begann ich das Studium der Medizin an der Georg-August-Universität in Göttingen. Nach einem Praktikum in Newport/Isle of Wight, England, bestand ich im August 2000 die ärztliche Vorprüfung. Es folgte der erste Teil der ärztlichen Prüfung, den ich im August 2001 ebenfalls bestand. Den zweiten Teil der ärztlichen Prüfung absolvierte ich im März 2004 und durchlief im Anschluss Teile meines Praktischen Jahres in den Abteilungen Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und Unfallchirurgie so wie in der Abteilung Gastroenterologie an der Georg-August Universität Göttingen. Es folgte ein weiterer Abschnitt des Praktischen Jahres in den Abteilungen Endokrinologie und Gastroenterologie der Yale Medical School in New Haven/Connecticut. Im Juni 2005 bestand ich den dritten Teil der ärztlichen Prüfung mit der Gesamtnote „sehr gut“ und erwarb die Approbation als Arzt.

Meine Promotion zum Doktor der Medizin mit dem Titel „Eine lichtmikroskopische Untersuchung zum Auftreten der Extrazellulärmatrixkomponente Fibrillin-1 in Haut und Muskelfaszie sowie im Narbengewebe von Patienten mit rezidivierenden postoperativen Narbenhernien“ schloss ich im Juli 2005 in der Abteilung Histologie der Georg-August-Universität Göttingen bei Priv.-Doz. Dr. med. Fabio Quondamatteo mit der Note „sehr gut“ ab.

Von April 2005 bis Dezember 2008 absolvierte ich das Studium der Zahnheilkunde und erwarb nach bestandenem Staatsexamen die Approbation als Zahnarzt.

Im August 2005 erfolgte eine Anstellung als Assistenzarzt in der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Georg-August-Universität Göttingen. Während des

Studiums der Zahnheilkunde war ich zunächst als Teilzeitkraft beschäftigt, nach Abschluss des Studiums wurde die Tätigkeit auf eine Vollzeitbeschäftigung erweitert. Seit August 2007 bin ich mit der Fachzahnärztin für Kieferorthopädie Dr. Susanne Fricke-Zech, geb. Zech, verheiratet.