

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

**Einfluss von TGF- β auf die EMT-Marker-Expression in
Ko-Kulturen oraler Karzinomzellen mit mesenchymalen
Stromazellen**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
für Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Fabian Godek
aus
Bückeburg

Göttingen 2020

Dekan:

Prof. Dr. W. Brück

Referent/in:

Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. F. Böhrnsen

Ko-Referent/in:

Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung:

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Einfluss von TGF- β auf die EMT-Marker-Expression in Ko-Kulturen oraler Karzinomzellen mit mesenchymalen Stromazellen“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den _____

Unterschrift

Die Daten, auf denen die vorliegende Arbeit basiert, wurden teilweise publiziert:

Bohrnsen F, **Godek F**, Kiesel J, Kramer FJ, Brockmeyer P, Schliephake H (2017): Influence of TGF-beta1 on tumor transition in oral cancer cell and BMSC co-cultures J Craniomaxillofac Surg 45, 731-740

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Das Plattenepithelkarzinom	1
1.2 Tumor-Stroma-Mikroumgebung.....	2
1.3 Tumorproliferation und Metastasierung	3
1.4 Epitheliale-Mesenchymale-Transition	4
1.4.1 Die EMT-Marker Vimentin und E-Cadherin.....	5
1.4.2 Wnt-3 und β -Catenin.....	6
1.4.3 Snail1 und Twist	6
1.4.4 MMP-14.....	7
1.5 Regulierung von AKT-, Erk- und mTOR-Signalwegen im Rahmen der Tumorprogression	7
1.6 Tumor-Stroma-Analysen	9
1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit.....	11
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Materialien und Geräte.....	12
2.2 Allgemeine Zellkulturtechniken	13
2.2.1 Ablösen, Zentrifugieren und Passagieren	13
2.2.2 Kryokonservierung.....	14
2.3 Isolation und Kultivierung von MSC aus humanen Knochenmarkaspiraten.....	14
2.4 Kultivierung der humanen PEK-Zelllinie PCI-13	16
2.5 Differenzierung isolierter, humaner MSC	16
2.5.1 Osteogene und adipogene Differenzierung im Monolayer	16
2.5.2 Chondrogene Differenzierung im <i>Micro-Mass-Body</i>	17
2.6 Histochemische Analysen zur Charakterisierung der Differenzierung von humanen MSC.....	18
2.6.1 Osteogene Differenzierung	18
2.6.2 Sudan-III-Färbung zur Darstellung der adipogenen Differenzierung.....	19
2.6.3 Alcianblau-Färbung zur Darstellung der chondrogenen Differenzierung	19

Inhaltsverzeichnis

2.7	Charakterisierung isolierter MSC mittels Durchflusszytometrie.....	20
2.8	TGF- β_1 induzierte Transwell-Ko-Kultur-Differenzierung.....	20
2.8.1	Transwell-Ko-Kultur von MSC und PCI-13.....	20
2.9	Analyse der Proliferationscharakteristika von MSC und PCI-13	22
2.10	Darstellung zelltypspezifischer Proteinexpression mittels direkter Immunfluoreszenzfärbung	22
2.11	Darstellung zelltypspezifischer Genexpression mittels RT-qPCR	23
2.11.1	Sequenzspezifisches Primerdesign	23
2.11.2	RNA-Isolation.....	24
2.11.3	cDNA-Synthese mittels reverser-Transkriptase-Lösungen	25
2.11.4	qRT-PCR.....	25
2.12	Darstellung zelltypspezifischer Proteinexpression mittels <i>Antibody Array</i>	26
2.12.1	Protein-Isolation und Aufreinigung	26
2.12.2	Quantifizierung des Proteingehalts mittels <i>Bicinchoninic Acid Assay</i> (BCA)	26
2.12.3	Untersuchung des AKT-Signalwegs mittels PathScan [®]	27
2.13	Statistische Auswertung.....	28
3	Ergebnisse	29
3.1	Charakterisierung humaner MSC mittels Durchflusszytometrie	29
3.2	Osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung humaner MSC.....	29
3.3	Proliferationscharakteristika von MSC und PCI-13	30
3.4	Monolayer-Differenzierung humaner MSC und PCI-13-Zellen unter dem Einfluss von TGF- β_1	31
3.4.1	IF-Proteinexpression von Vimentin und E-Cadherin in im Monolayer kultivierten PCI-13 und MSC	31
3.4.2	Genexpression von Mediatoren der Tumor-Stroma-Interaktion in im Monolayer kultivierten PCI-13 und MSC.....	33
3.4.3	Proteinanalyse des AKT-Signalwegs, der Apoptose und des Erk-Signalwegs in im Monolayer kultivierten PCI-13 und MSC	35
3.5	Ko-Kultur-Differenzierung humaner MSC und PCI-13-Zellen unter Einfluss von TGF- β_1	37
3.5.1	IF-Proteinexpression von Vimentin und E-Cadherin in ko-kultivierten PCI-13 und MSC	37
3.5.2	Genexpression von Mediatoren der Tumor-Stroma-Interaktion in ko- kultivierten PCI-13 und MSC	39

3.5.3	Proteinanalyse des AKT-Signalwegs, der Apoptose und des Erk-Signalwegs in ko-kultivierten PCI-13 und MSC.....	41
4	Diskussion	44
4.1	Tumor-Stroma-Interaktionen beeinflussen die Proliferation der PCI-13 Ko-Kulturen	44
4.1.1	Die Ko-Kultur zwischen PCI-13 und MSC ohne TGF- β verringert die Proliferation der PCI-13.....	45
4.2	TGF- β -Einfluss auf die Expression wichtiger EMT-Marker.....	45
4.2.1	TGF- β -Induktion nimmt einen progressiven Einfluss auf die EMT.....	46
4.2.2	TGF- β -Induktion führt zu Veränderung der MMP-14-Expression.....	49
4.3	Veränderung von Wnt-, AKT-, Erk- und mTOR-Signalwegen in MSC- und PCI Ko-Kulturen.....	49
4.3.1	Wnt-Signalweg in PCI-13 und MSC	49
4.3.2	AKT-Signalweg wird durch TGF- β_1 -Induktion und Ko-Kultivierung in PCI- 13 und MSC aktiviert.....	50
4.3.3	Erk-Signalweg wird durch TGF- β_1 -Induktion und Ko-Kultivierung in PCI-13 und MSC beeinflusst.....	51
4.3.4	mTOR-Signalweg in PCI-13 und MSC	51
4.4	Fazit.....	53
5	Zusammenfassung.....	54
6	Literaturverzeichnis.....	56

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Prozess der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition nach Kalluri und Weinberg (2009).	5
Abbildung 2: AKT-Signalweg und Erk-Kaskade	9
Abbildung 3: Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation.	15
Abbildung 4: Chondrogene Differenzierung von MSC im <i>Micro-Mass-Body</i>	18
Abbildung 5: Ausschnitt einer Multiwell-Platte mit Transwell-Ko-Kultur-Einsatz.	21
Abbildung 6: Eine repräsentative, durchflusszytometrische Analyse isolierter humaner MSC.	29
Abbildung 7: Osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung humaner MSC.	30
Abbildung 8: Täglicher Verdopplungsfaktor der PCI-13 und MSC.....	30
Abbildung 9: IF-Proteinexpression der PCI-13 Monolayer-Kulturen.....	31
Abbildung 10: IF-Proteinexpression der im Monolayer kultivierten MSC.....	32
Abbildung 11: qRT-PCR Analyse der im Monolayer kultivierten PCI-13	33
Abbildung 12: qRT-PCR Analyse der im Monolayer kultivierten MSC	34
Abbildung 13: Die Proteinlevelanalysen mittels Pathscan der im Monolayer kultivierten PCI-13	35
Abbildung 14: Die Proteinlevelanalysen mittels Pathscan der im Monolayer kultivierten MSC	36
Abbildung 15: IF-Proteinexpression der ko-kultivierten PCI-13.	37
Abbildung 16: IF-Proteinexpression der ko-kultivierten MSC.	38
Abbildung 17: qRT-PCR Analyse der ko-kultivierten PCI-13.....	39
Abbildung 18: qRT-PCR Analyse der ko-kultivierten MSC.....	40
Abbildung 19: Die Proteinlevelanalysen mittels Pathscan der ko-kultivierten PCI-13.....	41
Abbildung 20: Die Proteinlevelanalysen mittels Pathscan der ko-kultivierten MSC.....	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Materialien und Geräte	12
Tabelle 2: Trypsin/EDTA	13
Tabelle 3: MSC-Kultivierungsmedium	14
Tabelle 4: PCI-13 Kultivierungsmedium.....	16
Tabelle 5: Medium zur osteogenen Induktion	16
Tabelle 6: Medium zur adipogenen Induktion.....	16
Tabelle 7: Medium zum Erhalt der adipogenen Differenzierung	16
Tabelle 8: Medium zur chondrogenen Differenzierung	17
Tabelle 9: Citrat-Formaldehyd-Fixierlösung	18
Tabelle 10: Naphtol-Färbelösung	18
Tabelle 11: Sudan-III-Färbelösung.....	19
Tabelle 12: AB-Färbelösung.....	19
Tabelle 13: Verwendete Antikörper der durchflusszytometrischen MSC- Charakterisierung	20
Tabelle 14: Reduktionsmedium	20
Tabelle 15: Transwell-Ko-Kultur-Medium	21
Tabelle 16: Methanol-/Aceton-Fixierlösung	22
Tabelle 17: BSA-Blocking-Reagenz	22
Tabelle 18: Anti-Vimentin Antikörper (EPR3776)	22
Tabelle 19: Anti-E-Cadherin Antikörper (612130)	22
Tabelle 20: Fluoreszenzfarbstoff DAPI.....	22
Tabelle 21: Verwendete Primer für die RT-qPCR.....	24
Tabelle 22: RNeasy® Mini Kit.....	24
Tabelle 23: RNase-Free DNase Set	24
Tabelle 24: iScript™ cDNA Synthese Kit.....	25
Tabelle 25: qRT-PCR Reagenz.....	25
Tabelle 26: Bio-Plex™ Cell Lysis-Kit	26
Tabelle 27: Pierce™ BCA Protein Assay Kit.....	26
Tabelle 28: PathScan® AKT Signaling Antibody Array Kit.....	27
Tabelle 29: Proteinlevel-Expressionsniveau der im Monolayer kultivierten Zellen im Vergleich zur Ko-Kultur.	43

Abkürzungsverzeichnis

4E-BP1	4E-Bindungsprotein 1
AB	Alcianblau
ABB	<i>Array Blocking Buffer</i>
ADB	<i>Array Diluent Buffer</i>
AMPK α	AMP-aktivierte Proteinkinase α
AP	Alkalische Phosphatase
AWB	<i>Array Wash Buffer</i>
Bad	<i>Bcl-2-Associated Death Promoter</i>
BCA	<i>Bicinchoninic Acid Assay</i>
Bp	<i>Basepairs</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
CAF	<i>Cancer Associated Fibroblasts</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
DAC	<i>Detection Antibody Cocktail</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPBS	Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FITC	Fluorescein
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GSK-3	Glykogensynthase-Kinase 3
IF	Immunfluoreszenzfärbung
KK	Ko-Kultur
MET	Mesenchymale-Epitheliale-Transition
ML	Monolayer
MMB	<i>Micro-Mass-Body</i>
MMP	Matrix-Metalloproteinase
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäuren</i>
MSC	Mesenchymale Stromazelle(n)
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>

Abkürzungsverzeichnis

mTORC	mTOR Komplex
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PDK1	3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1
PE	Phycoerythrin
PEK	Plattenepithelkarzinom
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRAS40	<i>Proline-Rich AKT Substrate</i> 40 kDa
PTEN	Phosphatase- und Tensin-Homolog
RSK1	Ribosomale S6 Kinase 1
qRT-PCR	Qualitative reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
SMAD	<i>Small Mothers Against Decapentaplegic</i>
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
Wnt-3	<i>Wingless-Type MMTV Integration Site Family Member 3</i>

1 Einleitung

1.1 Das Plattenepithelkarzinom

Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs gehören mit weltweit jährlich mehr als 500.000 Neuerkrankungen zu den zehn häufigsten Tumoren (Jemal et al. 2011). Bei mehr als 90 % dieser Tumoren handelt es sich um Plattenepithelkarzinome (PEK) (Metelmann und Kaduk 2007). Lebensgewohnheiten wie Tabak- und Alkoholkonsum multiplizieren das Risiko, an einem solchen Tumor zu erkranken, wobei eine Prognose stark von der Tumorgroße sowie dem Vorhandensein von Lymphknoten- und Fernmetastasen abhängt (Hashibe et al. 2009; Jemal et al. 2011). Trotz kontinuierlicher Fortschritte in der Tumorbehandlung mittels Radiatio, Chemotherapie und weiterentwickelten chirurgischen Verfahren, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate auch heute noch bei ca. 50 % (Peitzsch et al. 2019). Damit hat sie sich in den letzten 40 Jahren kaum verändert (Kulasinghe et al. 2015). Die Erkrankung ist für die Patienten mit einer erheblichen Reduktion der subjektiv empfundenen Lebensqualität verbunden (Metelmann und Kaduk 2007). Aktuellere Behandlungsverfahren z. B. durch die Immuntherapie mit PD-1-Inhibitoren versprechen bei ca. 10-18 % der Patienten ein besseres Therapie-Ansprechverhalten mit längeren Überlebensraten und ein Aufrechterhalten der individuellen Lebensqualität. Da Tumorzellen durch Mutation und Selektion genetische Varianten entwickeln können, ist diese Wirkung jedoch häufig nicht dauerhaft (Syn et al. 2017). Dabei hängen Merkmale der Tumor-Mikroumgebung eng mit dem Ansprechen auf solche Immuntherapien zusammen (Ferris et al. 2016). So wird u. a. das invasive Potential eines Tumors durch Interaktionen mit der Tumormikroumgebung beeinflusst (Curry et al. 2014; Poggi et al. 2014; Turley et al. 2015). Es treten oftmals progressive interzelluläre Aktionen am invasiven Rand eines Tumors auf (Böhrnsen et al. 2015; Routray et al. 2014). Dies nimmt Einfluss auf die Immunantwort und Reaktion der gesunden Tumorumgebung und kann so zur Bildung von Tumorsuppressorzellen und regulatorischen T-Zellen führen. So kann die Effizienz von Mechanismen der autologen Antitumorabwehr zur Eliminierung neoplastischer Zellen eingeschränkt werden (Poggi et al. 2014; Turley et al. 2015).

Zur Analyse der Tumor-Mikroumgebung werden für wissenschaftliche Untersuchungen Tumorzelllinien verwendet, wobei eine Vielzahl von primären und metastasierten PEK-Zelllinien bekannt ist. Diese unterscheiden sich nach Geschlecht des Entnahmeträgers, TNM-Klassifikation und anatomischen Entnahmestellen wie z. B. aus Mundhöhle, Oropharynx, Larynx oder Gesichtshaut (Lin et al. 2007). Eine etablierte

Zelllinie stellt PCI-13 dar, die in dieser Dissertation verwendet wurde. Diese stammt ursprünglich aus dem PEK der oralen Mukosa eines 50 Jahre alten, männlichen Patienten. Dabei handelt es sich nach der *Union internationale contre le cancer* um einen T₃N₁M₀-Tumor (Heo et al. 1989). Hierbei bezeichnet das „T“ die räumliche Ausdehnung des Primärtumors, „N“ beschreibt ein Fehlen oder Vorhandensein regionärer Lymphknotenmetastasen und das „M“ beschreibt ein Fehlen oder Vorhandensein von Fernmetastasen. Der Ursprungstumor der in dieser Dissertation verwendeten Tumorzellen hatte eine Größe von 4 cm überschritten sowie eine unilaterale Lymphknotenmetastase gebildet, ohne dass Fernmetastasen vorgelegen haben.

1.2 Tumor-Stroma-Mikroumgebung

Neben den Tumorzellen finden sich in der Mikroumgebung einer Neoplasie auch Fibroblasten, mesenchymale Stromazellen (MSC), vaskulären Endothelzellen und Immunzellen, einschließlich T-Zellen, Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten (Hanahan und Coussens 2012). Im Verbund werden diese Zellen oft als Tumor-Stroma bezeichnet und bilden zusammen mit der extrazellulären Matrix die Tumor-Mikroumgebung. Interaktionen zwischen MSC und Tumorzellen finden sich oftmals in diesen Bereichen der Tumorproliferationszonen am invasiven Rand des Tumors (Routray et al. 2014). MSC werden in nahezu allen mesodermalen Geweben des fetalen und erwachsenen Körpers einschließlich Knochenmark, Fettgewebe und anderen stromareichen Organen gefunden (Collins und Thebaud 2014; Hass et al. 2011; Rallapalli et al. 2009; Rotter et al. 2008). Im Zuge operativer Eingriffe können diese Zellen aus dem Knochenmark des Beckenkamms gewonnen werden und wurden bereits detailliert charakterisiert (Pittenger et al. 1999). Die *International Society for Cell Therapy* definierte 2006 Minimalkriterien zur MSC-Charakterisierung (Dominici et al. 2006). Diese sind Kunststoffadhärenz, spezifische Oberflächencharakteristika (*cluster of differentiation*, CD; CD73⁺, CD90⁺, CD105⁺, CD34⁻, CD45⁻) und die Fähigkeit, sich in Adipozyten, Chondrozyten und Osteozyten zu differenzieren (Horwitz et al. 2005; Lv et al. 2014). Zu den Aufgaben der MSC gehören die Produktion und Sekretion verschiedener Komponenten der extrazellulären Matrix (Turley et al. 2015). Indem sie sich in Knochen-, Knorpel-, Muskel-, Sehnen-, Fett- und Stromagewebe differenzieren (Pittenger et al. 1999), beteiligen sich MSC aber auch an der Geweberegeneration und -heilung nach Trauma, in Folge natürlicher Alterungsprozesse oder Krankheit (Turley et al. 2015). Darüber hinaus erfolgt bereits der klinische Einsatz von

Mesenchymalen Stroma- und Stammzellen zur Therapie von onkologischen Erkrankungen wie Leukämie, Lymphomen und Myelomen (Steinberg et al. 2015) sowie im Rahmen der Graft-versus-Host Erkrankung. Aufgrund ihrer immunmodulierenden Aktivität sind MSC in der Lage, die Proliferation und Funktion von T-Zellen, B-Zellen, Dendritischen Zellen und natürlichen Killerzellen zu hemmen (Zhao et al. 2019). Um ihre Wirkung zu entfalten, produzieren MSC u. a. eine Vielzahl von Zytokinen, zu denen auch *Transforming Growth Factor beta 1* (TGF- β_1) zählt (Eggenhofer et al. 2014). So können MSC zusätzlich Einfluss auf die Interaktion zwischen Tumor und Tumor-Stroma gewinnen. Es konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von MSC und die Interaktionen zwischen Tumorgewebe und Tumor-Mikroumgebung das invasive Potential von PEK hemmen können (Böhrnsen et al. 2015). Hierfür müssen die MSC Umbau- und Transitionsprozesse durchlaufen, um an ihren Wirkungsort zu gelangen (Korbling und Estrov 2003). Diese Prozesse werden durch inter- und intrazelluläre Signalwege wie den *Wingless-type MMTV integration site family*(Wnt)- β -Catenin-Signalweg modelliert und können hierdurch fördernd oder hemmend auf die Tumor- und Stromazellproliferation wirken (Böhrnsen et al. 2015; Curry et al. 2014).

1.3 Tumorproliferation und Metastasierung

Nach Hanahan und Weinberg bedarf die Entstehung und Proliferation von Tumoren sechs Kennzeichen (Hanahan und Weinberg 2000, 2011): (1) Unbegrenzt Potential zur Zellteilung, (2) Eigenversorgung mit Wachstumsfaktoren, (3) Resistenz gegenüber Anti-Wachstumssignalen, (4) die Fähigkeit, sich der Apoptose zu entziehen, (5) erhöhte Angiogenese und (6) invasives Wachstum bzw. Metastasierung.

Zentrale Prozesse wie invasives Wachstum und Metastasierung sind entscheidende Schritte während der Tumorprogression (Zhang et al. 2016) und können durch den Prozess einer Invasivitäts-Metastasierungs-Kaskade beschrieben werden (Fidler 2003; Talmadge und Fidler 2010): Durch invasives Wachstum gelangen überlebensfähige Tumorzellen in umliegende Gewebe wie z. B. Blut- und Lymphgefäße, werden durch diese Gefäße in den Organismus transportiert und siedeln sich anschließend in einem fernen Gewebe wieder an (Hanahan und Weinberg 2000). Eine besonders massive epitheliale Zellproliferation und Angiogenese gelten als Kennzeichen für eine Initiierung und ein frühes Wachstum epithelialer Karzinome (Hanahan und Weinberg 2000).

Dieser Metastasierungsprozess wird durch verschiedene Signalmoleküle und Zytokine beeinflusst (Lamouille et al. 2014), zu denen unter anderem auch Proteine der

TGF- β -Superfamilie gehören (Yingling et al. 2004). TGF- β_1 ist ein Wachstumsfaktor, der je nach Zelltyp und Wirkdauer spezifische zelluläre Effekte wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose reguliert (Oshimori und Fuchs 2012). Hierbei wirkt der TGF- β_1 -Signalweg über das Onkogen STAT3, das in PEK des Kopf-Hals-Bereichs häufig verstärkt exprimiert ist (Chen et al. 2010). Je nach zellulärem Kontext kann TGF- β_1 das Tumorwachstum hemmen, also als Tumorsuppressor fungieren, oder aber auch das Tumorwachstum fördern, also als Tumorpromotor wirken (Massague 2012). In physiologischen Epithelzellen wirkt es hemmend auf Zellproliferation, Differenzierung und Motilität und fördert die Apoptose (Leef und Thomas 2013; Massague 2012). In Karzinomen wirkt die vermehrte Sezernierung von TGF- β_1 jedoch tumorproliferativ (Molinolo et al. 2009), indem Invasivität und Metastasierung gefördert werden (Nagaraj und Datta 2010). TGF- β_1 kann zudem zu einem Verlust der Zellkontakte durch Abbau der Zonula occludens und der Adhärenzkontakte führen, die β -Catenin im Cytoplasma stabilisieren und somit nukleäre Translationsprozesse und die Expression von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) modellieren (Masszi et al. 2003; Sun L et al. 2008). Somit nimmt TGF- β Einfluss auf Invasivität und Metastasierung, die ebenfalls durch Interaktionen zwischen Tumor und Tumor-Stroma beeinflusst werden.

Im Metastasierungsprozess kommt darüber hinaus der Basalmembran eine besondere Rolle zu, da sie als Barriere der Tumorprogression gilt. Eine Beschädigung, ein Verlust bzw. ein Überwinden dieser Membran durch z. B. die o. g. Prozesse erleichtert eine Tumordinvasion und begünstigt einen sich anschließenden Metastasierungsprozess. Ein Schlüsselereignis dabei ist der epithelial-mesenchymale Übergang, bei dem epitheliale Zellen mesenchymale Eigenschaften gewinnen. Dieser Übergang wird auch als Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) bezeichnet.

1.4 Epitheliale-Mesenchymale-Transition

Die EMT ist ein bereits in der Embryologie auftretendes Ereignis (Typ 1 EMT), läuft aber auch bei Entzündungen und Fibrose (Typ 2 EMT) sowie bei Invasivitäts- und Metastasierungsprozessen (Typ 3 EMT) ab (Kalluri und Weinberg 2009). Hierbei gewinnen epitheliale Zellen (1) Motilität, (2) verändern die Zelladhäsion untereinander und (3) modellieren die extrazelluläre Matrix um (Curry et al. 2014). Epitheliale Zellverbände verlieren hierbei ihre stationäre Polarität und gewinnen mesenchymale Eigenschaften.

Dadurch gewinnen Zellen der EMT eine gesteigerte Migrationsfähigkeit, eine verstärkte Invasivität und eine erhöhte Apoptose-Resistenz (Kalluri und Neilson 2003).

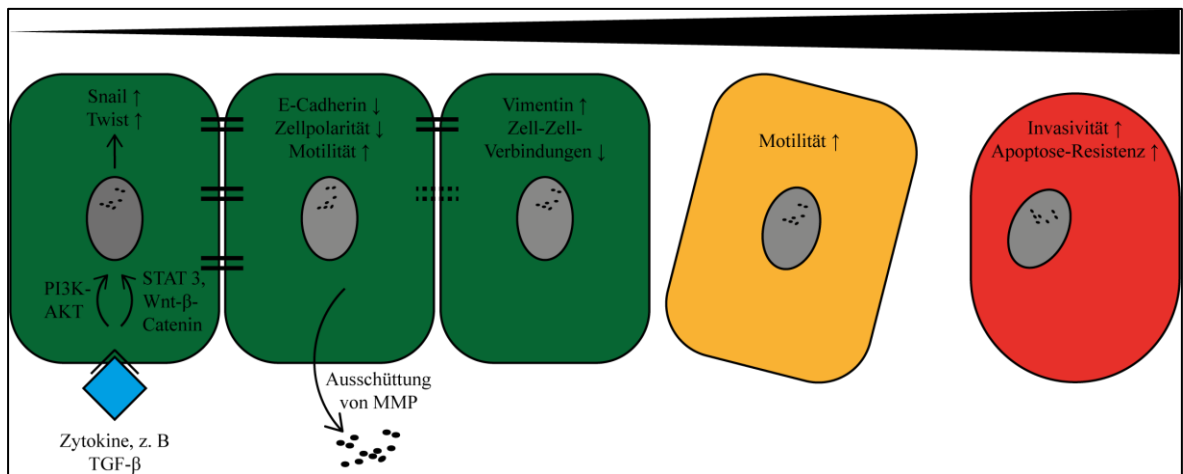


Abbildung 1: Prozess der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition nach Kalluri und Weinberg (2009).

Im Rahmen von EMT assoziierten Prozessen zwischen Tumor und Stroma zeigen sich verschiedene proliferative und apoptotische Signalwege sowie Kaskaden beeinflusst (Böhrnsen et al. 2015). Beschreibend hierfür sind u. a. verschiedene Markerproteine.

1.4.1 Die EMT-Marker Vimentin und E-Cadherin

Vimentin ist ein Intermediärfilamentprotein und wird normalerweise in Zellen mesenchymalen Ursprungs wie z. B. Myofibroblasten, Chondrozyten, Makrophagen und Endothelzellen exprimiert (Korita et al. 2010). In mesenchymalen Zellen kommt Vimentin für eine Reihe von zellulären Funktionen wie Zelladhäsion, Migration und Signalübertragung eine entscheidende Bedeutung zu (Ivaska et al. 2007). Auch in Tumorgewebe kann Vimentin nachgewiesen werden (Satelli und Li 2011). Der Verlust von E-Cadherin und die Zunahme mesenchymaler Marker wie Vimentin werden als Kennzeichen der oben beschriebenen EMT gedeutet (Guo Y et al. 2013; Ozguven et al. 2011; Tiwari et al. 2012).

E-Cadherin ist ein Typ 1 Transmembran-Protein, das wichtig bei der Vermittlung der Zellpolarität und -integrität ist. Über extrazelluläre Ca^{2+} -Bindungsstellen sorgt E-Cadherin für eine interzelluläre Stabilität und bildet eine epitheliale Barriere (van Roy 2014). In fortgeschrittenen Tumoren geht die E-Cadherin-Expression häufig verloren, was mit einer höheren Inzidenz von Metastasen und Rezidiven in Verbindung gebracht wird (Berx und van Roy 2009; Birchmeier und Behrens 1994). Zusammen mit β -Catenin bildet E-Cadherin einen Komplex auf der Zellmembran, der die Zell-Zell-Adhäsion fördert, zur Strukturbildung des geschichteten oralen Plattenepithels beiträgt und die Zelldissoziation

verhindert. Eine Komplexauflösung fördert wiederum eine Zellmigration und -invasivität (Hulsken et al. 1994).

1.4.2 Wnt-3 und β -Catenin

Wnt-3 ist entscheidend an der Zellproliferation, -differenzierung, -adhäsion und -migration beteiligt. Dieses kann sowohl β -Catenin abhängig (kanonisch) als auch unabhängig (nicht-kanonisch) verlaufen (Anastas und Moon 2013). Hierbei spielt der Wnt- β -Catenin-Signalweg eine zentrale Rolle bei der Signalgebung der Embryonalentwicklung, wobei eine Überexpression des Signalweges in enger Beziehung zu den meisten Tumoren steht (Shukla et al. 2016). β -Catenin ist ein Protein, das je nach zellulärer Lokalisation unterschiedliche Funktionen erfüllt, die sich von Wechselwirkungen mit anderen zellulären Proteinen auf der Membran oder im Cytoplasma ableiten (Jamieson et al. 2012; Sharma et al. 2012). In nicht-stimulierten Zellen wird β -Catenin ständig abgebaut. Nach der Bindung von Wnt an einen Rezeptorkomplex kann sich β -Catenin in der Zelle stabilisieren und in den Nukleus gelangen. Hier wird es dann durch Transkriptionsfaktoren aufbereitet (Ramakrishnan und Cadigan 2017). In vielen Tumorarten konnten abnormale Aktivierungen bzw. Mutationen im kanonischen Wnt- β -Catenin-Signalweg nachgewiesen werden (Zhou und Hung 2005). Eine Aktivierung des Signalwegs bei PEK wirkt auf die Tumorzellen anti-apoptotisch und verstärkt dessen Invasivität (Yang F et al. 2006). Durch Wnt-3-Aktivierung können Zielgene wie z. B. Snail1 transkribiert werden (ten Berge et al. 2008), was als ein entscheidender Schritt während einer EMT und im Metastasierungsprozesses angesehen wird (Cai et al. 2013).

1.4.3 Snail1 und Twist

Snail1 ist ein Transkriptionsfaktor, der Zellinvasivität durch Zytokinregulierung mediiert (Lyons et al. 2008). Externe Stimuli durch z. B. TGF- β können die Snail1-Proteinaktivierung induzieren (Xu et al. 2010). Als EMT-Regulator fördert es die Überexpression von mesenchymalen Markern wie Vimentin und die Suppression epithelialer Marker wie E-Cadherin (Zeisberg und Neilson 2009) und schwächt bestehende Zell-Zell-Kontakte (Eastham et al. 2007). Snail1 ist in zahlreichen Tumortypen stark exprimiert und an der Tumorprogression, der Zellapoptose und der Zellmigration/-invasion beteiligt (Assani und Zhou 2019). Es konnte gezeigt werden, dass Snail gemeinsam mit Twist die PEK-Metastasierung synergistisch verstärkt (Yang MH et al. 2009)

Twist ist ein Basis Helix-Loop-Helix Protein, das eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung spielt, indem es die mesenchymale Zellspezifikation

und -differenzierung reguliert (Qin et al. 2012). Postnatal wird Twist unter normalen physiologischen Bedingungen weder exprimiert noch inaktiviert. Zunehmende Evidenz zeigt eine starke Korrelation zwischen der Reaktivierung von Twist und sowohl dem Fortschreiten als auch der Malignität von Tumoren (Xue und Hemmings 2012). In allen drei Formen der EMT wird Twist aktiviert und in Tumormetastasen vermehrt exprimiert (Zeisberg und Neilson 2009). Bei PEK-Patienten korreliert die Twist-Expression u. a. auch mit Lymphknotenmetastasen (Ou et al. 2008). Im Rahmen einer fortschreitenden EMT kommt es dann zu einer zunehmenden Desintegration, Motilität und Auflösung der interzellulären Adhäsion u. a. durch Matrix-Metalloproteinasen.

1.4.4 MMP-14

Matrix-Metalloproteinasen sind eine große Familie von Zink-abhängigen Endopeptidasen, die für die Remodellierung der extrazellulären Matrix von entscheidender Bedeutung sind (Egeblad und Werb 2002). Sie sind ebenso an der Aktivitätsmodulation von Signalmolekülen beteiligt und spielen eine große Rolle sowohl in normalen physiologischen, als auch in pathologischen Prozessen wie Metastasierung (Klein und Bischoff 2011). Insbesondere MMP-14 ist an vielen Zellprozessen beteiligt, zu denen Wundheilung, Angiogenese, Entzündungsprozesse, aber auch Tumorinvasion und Metastasierung gehören. Dies erfolgt durch Aktivierung von Wachstumsfaktoren oder Zytokinfreigabe aus der extrazellulären Matrix (Liotta und Kohn 2001; Mannello et al. 2005; Sternlicht und Werb 2001). Darüber hinaus spielt MMP-14 eine Schlüsselrolle bei der Tumorprogression und -dissemination (Deryugina und Quigley 2015). MMP-14 aktiviert MMP-2, dessen Expression oft mit einer erhöhten Tumoraggressivität und einer schlechteren Prognose verbunden ist (Bjorklund und Koivunen 2005; Mook et al. 2004).

1.5 Regulierung von AKT-, Erk- und mTOR-Signalwegen im Rahmen der Tumorprogression

Der Phosphoinositid-3 Kinase (PI3K)-AKT- und der *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR)-Signalweg sind sowohl unter physiologischen als auch unter pathologischen Bedingungen für viele Aspekte des Zellwachstums und -überlebens von entscheidender Bedeutung (Porta et al. 2014). Sie sind so miteinander verbunden, dass sie z. T. als ein einziger Signalweg angesehen werden können, der wiederum mit vielen anderen Signalwegen in starke Interaktion tritt (Abbildung 2). Dabei ist der PI3K-AKT-Signalweg

ein Schlüsselregulator für das Überleben bei zellulärem Stress (Datta et al. 1999). Aus diesem Grund scheint die Rolle dieses Signalwegs bei Tumoren von entscheidender Bedeutung zu sein, wobei zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, -überleben, -wachstum und -motilität reguliert werden. AKT 1/2 sind ubiquitär exprimierte Proteinkinasen, die über die 3-Phosphoinositid-abhängige Proteinkinase 1 (PDK1) aktiviert wird und dessen Aktivierung in vielen Krebsarten sowie als phosphoryliertes AKT in PEK des Kopf-Hals-Bereichs analysiert werden konnte (Brazil und Hemmings 2001; Engelman et al. 2006; Stegeman et al. 2012). Ein Antagonist des AKT-Signalweges ist das Phosphatase- und Tensin-Homolog (PTEN), das eine Lipidphosphatase ist und als wichtiger Tumorsuppressor gilt (Cully et al. 2006).

mTOR ist eine Kernkomponente der zwei makromolekularen Komplexe mTOR-Komplex (mTORC)-1 und mTORC2 (Wullschleger et al. 2006). Der mTOR-Signalweg ist bei der Regulierung des Zellwachstums, der Zellproliferation und des Zellmetabolismus beteiligt (Lapante und Sabatini 2012). Das AKT-Signal stimuliert mTORC1, die p70 S6 Kinase zu aktivieren und das 4E-Bindungsprotein 1 (4E-BP1) zu inhibieren (Lapante und Sabatini 2012). 4E-BP1 ist bei seiner Überexpression in der Lage, die Zellgröße zu verringern, den Zellzyklus zu hemmen und die Tumorphathogenität zu unterdrücken (Avdulov et al. 2004; Fingar et al. 2002; Fingar et al. 2004; Lynch et al. 2004). Dabei ist *Proline-rich AKT substrate* 40 kDa (PRAS40) eine Komponente des mTORC1 (Vander Haar et al. 2007) und wird mit der Regulierung von Zellüberleben und Apoptose in Verbindung gebracht (Saito et al. 2004). Das *Bcl-2-associated death promoter* (Bad)-Protein ist ein pro-apoptotisches Mitglied der Bcl-2-Gen-Familie, das in die Initiierung der Apoptose involviert ist (Adachi und Imai 2002). Die Glykogensynthase-Kinase3 (GSK-3) besteht aus 2 Isoformen, GSK-3 α und GSK-3 β (Mukai et al. 2002). Die Phosphorylierung von Bad, GSK-3 α und GSK-3 β durch AKT inhibiert deren Funktionen und fördert so das Zellüberleben (Cross et al. 1995; Manning und Cantley 2007)

Im Rahmen einer gegenseitigen Regulation des AKT-Signalwegs (Abbildung 2) wird die extrazellulär signalregulierende Kinase (Erk)-Kaskade als ein entscheidender Regulator der Zellmotilität angesehen. Neben der Zellmotilität spielt der Erk-Signalweg auch eine entscheidende Rolle bei der Regulation verschiedener Zellfunktionen wie Zellproliferation, -differenzierung und -überleben als Reaktion auf extrazelluläre Signale (Johnson und Lapadat 2002; Nishida und Gotoh 1993). Weiterhin moduliert Erk direkt und indirekt die Expression und Funktion von Snail und Twist1 und induziert so die Expression von motilitätsfördernden und pro-invasiven Genen, die wiederum die Zellmotilität fördern

(Ichikawa et al. 2015; Shin et al. 2010) Darüber hinaus nimmt Erk direkten Einfluss auf onkogene Transformationsvorgänge (Kyriakis et al. 1992; Pages et al. 1993; Rommel et al. 1999; Sun H et al. 1993). So wird zum Beispiel die ribosomale S6 Kinase 1 (RSK1) durch Erk/2 aktiviert (Cargnello und Roux 2011; Roux und Blenis 2004). Diese phosphoryliert unter anderem das ribosomale Protein S6 und fördert somit Zellwachstum und Proliferation.

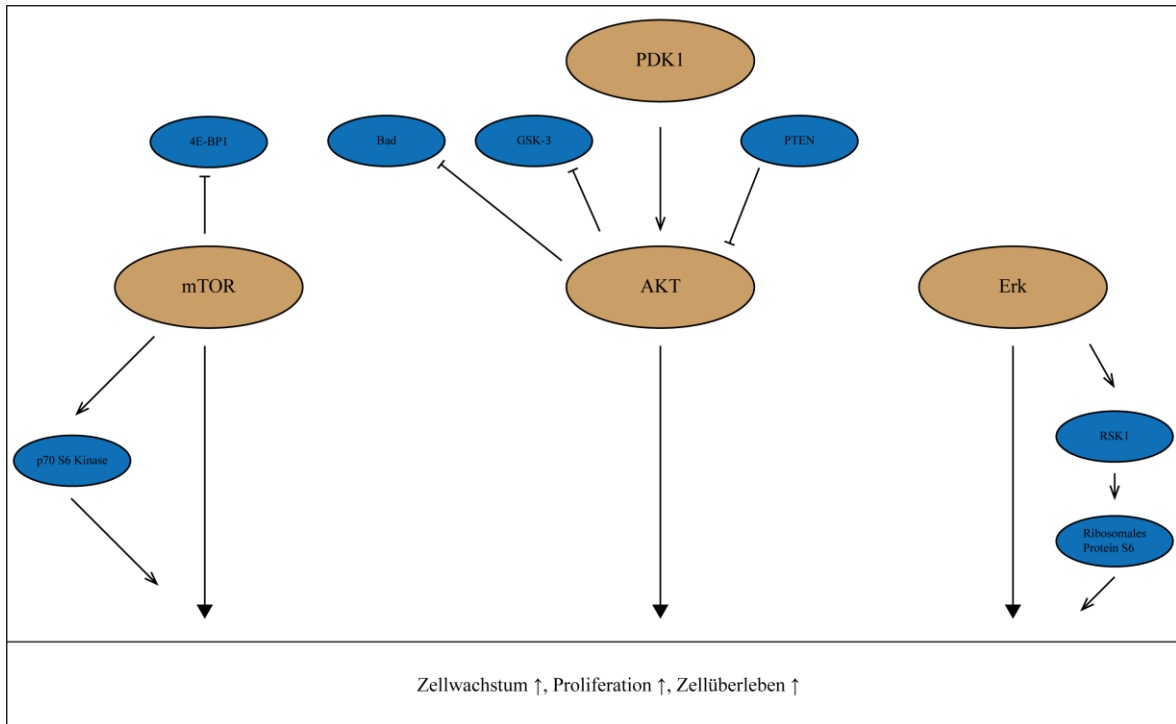


Abbildung 2: AKT-Signalweg und Erk-Kaskade nach Porta et al. (2014), Datta et al. (1999), Brazil und Hemmings (2001), Engelman et al. (2006), Stegeman et al. (2012), Cully et al. (2006), Wullschlegler et al. (2006), Laplante und Sabatini (2012), Avdulov et al. (2004), Fingar et al. (2002), Lynch et al. (2004), Vander Haar et al. (2007), Saito et al. (2004), Adachi und Imai (2002), Mukai et al. (2002), Cross et al. (1995), Manning und Cantley (2007), Johnson und Lapadat (2002), Nishida und Gotoh (1993), Ichikawa et al. (2015), Shin et al. (2010), Kyriakis et al. (1992), Pages et al. (1993), Rommel et al. (1999), Sun H et al. (1993), Cargnello und Roux (2011), Roux und Blenis (2004).

1.6 Tumor-Stroma-Analysen

Die Komplexität einer Tumor-Mikroumgebung kann die klassische Monolayer-Differenzierung nur eingeschränkt wiedergeben. Humane Plattenepithelkarzinomzellen des Oropharynx wurden bereits mit anderen Zelllinien zur Simulation eines Tumor-Stromas kultiviert, wobei Änderungen in der Proliferation und der biologischen Aktivität gezeigt wurden (Ch'ng et al. 2006). Indirekte Ko-Kulturen, in denen MSC jeweils modellhaft als Tumor-Stroma dienten, wurden darüber hinaus mit natürlichen Killerzellen (Sotiropoulou et al. 2006) und Mammakarzinomzellen (Fierro et al. 2004) durchgeführt und konnten eine modifizierende Wirkung der MSC feststellen. Während im Monolayer-System ausschließlich eine Zellart kultiviert wird, können interzelluläre Aspekte der

Tumormikroumgebung nur eingeschränkt analysiert werden. Die direkte oder indirekte Ko-Kultur-Differenzierung bildet hier die Möglichkeit einer Ergänzung der Monolayer-Kultivierung (Böhrnsen et al. 2015; Boyera et al. 1993; Gache et al. 1998; Heneweer et al. 2005). Mit Hilfe der indirekten Ko-Kultur-/Transwelldifferenzierung können über eine semipermeable Membran (Porengröße: 0,4 μm *ThinCerts*) parakrine und Zell-Zell-Interaktionen in Annäherung an ein Tumor-Stroma-Mikromilieu analysiert werden. Darüber hinaus lassen sich sowohl Tumorzellen (PCI-13) als auch MSC unkompliziert einzeln isolieren und unter definierten Bedingungen molekularbiologische Analysen durchführen. Störanfällige Trennverfahren können so umgangen werden (Goers et al. 2014). In dieser Arbeit wurde daher das etablierte Modell der indirekten Ko-Kultur zur Analyse und Auswertung der miteinander interagierenden Zelltypen unter molekularbiologischen Gesichtspunkten verwendet.

1.7 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Die Interaktionen zwischen Tumorgewebe und Tumor-Mikroumgebung beeinflussen das invasive Potential von PEK. MSC sind in der Lage, assoziierte Marker einer Epithelial-Mesenchymalen Transition (EMT) zu beeinflussen und einen suppressiven Einfluss auf die EMT der oralen Plattenepithelkarzinomzelllinie PCI-13 auszuüben. Die EMT steht jedoch unter dem Einfluss der Tumor-Mikroumgebung, die sich aus verschiedenen, auch nicht-tumorösen Zellen wie Fibroblasten, mesenchymalen Zellen, vaskulären Endothelzellen und Immunzellen gemeinsam mit der Extrazellulären Matrix zusammensetzt. Die Wechselwirkungen zwischen Tumor und Tumor-Stroma werden u. a. durch Wachstumsfaktoren beeinflusst, bei denen TGF- β_1 eine entscheidende Rolle spielt. Je nach zellulärem Kontext wird dabei dem Zytokin TGF- β_1 sowohl tumorproliferative als auch tumorsuppressive Wirkungen zugeschrieben.

Ziel dieser Arbeit war es daher die parakrinen, indirekten Wechselwirkungen zwischen Tumor und Stromazellen zu analysieren und den Einfluss von TGF- β_1 auf die Epitheliale-Mesenchymale-Transition und die Expression wichtiger EMT-Marker sowie den AKT-, mTOR- und Erk1/2-Signalweg zu untersuchen. Hierfür wurden human MSC isoliert, charakterisiert und im Rahmen von Monolayer- und Ko-Kulturen mit PCI-13 untersucht. Neben der Analyse von Proliferationscharakteristika der MSC und PCI-13 erfolgte die Untersuchung von Markern der EMT (E-Cadherin, Vimentin Wnt-3, β -Catenin, Snail1, Twist und MMP-14) mittels Immunfluoreszenz und quantitative RT-qPCR Analysen. Genauere Betrachtung fanden auch die mit einer EMT assoziierten Signalwege von AKT, mTOR und Erk1/2 sowie deren nachgeschaltete Ziele S6, AMPK α , PRAS40, GSK-3 α , GSK-3 β , p70 S6, Bad, PTEN, PDK1, 4E-BP1 und RSK1.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

Tabelle 1: Verwendete Materialien und Geräte

Autoklav <i>Bioclav</i>	Schütt-Biotech, Göttingen
Chemilumineszenz LAS 4000	Fujifilm, Tokia, Japan
Durchflusszytometer <i>FACSCanto II</i>	BD, Franklin Lakes, USA
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrische Pipettierhilfe <i>Accu-Jet</i>	Brand, Wertheim
FluorPreserve	Merck, Darmstadt
Gefrierschrank -80°C	GFL, Burgwedel
Glasplättchen (Ø 12 mm)	Menzel, Braunschweig
Imaging Chambers	Zell-Kontakt, Nörten-Hardenberg
Kühlschrank 4°C, -20°C	Liebherr, Ochsenhausen
Latexhandschuhe <i>Gentle Skin sensitive</i>	Rösner-Mautby Meditrade, Kiefersfelden
Mikroliterpipetten <i>Eppendorf Reference</i> (10-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Mikroskop <i>AxioVert 200M</i>	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop <i>AxioVert 35</i>	Carl Zeiss, Oberkochen
Mikroskop Illuminator <i>HXP 120C</i>	Carl Zeiss, Oberkochen
Orbital Shaker <i>ThermoStar</i>	BMG Labtech, Ortenberg
Parafilm	American National Can, Chicago, USA
PathScan Glasplatte	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
PathScan Multi-Well-Abdichtung	Cell Signaling Technology, Cambridge, UK
PCR 96-Well-Probenplatte	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
PCR <i>iScript™ cDNA Synthese Kit</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
PCR Kunststoffolie	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
PCR <i>NanoDrop 1000</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
PCR Real-Time-Thermocycler MyIQ	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
PCR RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden
PCR <i>RNeasy® Mini Kit</i>	Qiagen, Hilden
PCR Thermocycler <i>Mastercycler Gradient</i>	Eppendorf, Hamburg
PCR Werkbank <i>Air clean 600</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Photometer <i>SpectraMax M2</i>	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
Pipette <i>Seriological Pipette</i> (10, 25 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Präzisionswaage <i>PM 460</i>	Mettler-Toledo, Gießen
Proteinanalyse <i>Bio-Plex™ Cell Lysis Kit</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Proteinanalyse <i>PathScan® Antibody Array Kit</i>	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Proteinanalyse <i>Pierce™ BCA Protein Assay Kit</i>	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Software <i>AxioVision 4.8</i>	Carl Zeiss, Oberkochen
Software <i>BD FACSDiva</i>	BD, Franklin Lakes, USA
Software <i>CORELDraw X6</i>	Corel, Ottawa, Canada
Software <i>Endnote X7.4</i>	Thomson Reuters, New York, USA
Software <i>FlowJo 10.1</i>	FlowJo, Ashland, USA
Software <i>GraphPad PRISM</i>	GraphPad Software, La Jolla, USA
Software <i>ImageJ</i>	NIH, Bethesda, USA
Software <i>Imagereader LAS-4000</i>	Fujifilm, Tokia, Japan
Software <i>IQ5</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Software <i>NanoDrop 1000</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Vortexer <i>MS2 Minishaker</i>	IKA-Werke, Staufen
Wasserbad <i>WB10</i>	Memmert, Schwabach
Zellkultur 6-Well-Kulturplatte	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkultur 6-Well-ThinCerts	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkultur <i>Eppendorf-Cup 1,5 ml</i>	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur Falcon (15, 50 ml)	BD, Franklin Lakes, USA

Material und Methoden

Zellkultur Gewebekulturflaschen (25-175 cm ²)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur Gewebekulturschale (Ø 6 cm)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur Inkubator <i>CO₂-Incubator</i>	Sanyo, Moriguchi, Japan
Zellkultur Kryoröhrchen (2ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkultur <i>Mr. Frosty</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zellkultur Präparationsbesteck (steril)	Hu-Friedy, Frankfurt a. M.
Zellkultur Werkbank <i>EN 12469</i>	Clean Air Systems, Chennai, Indien
Zellzählung CASY [®] Probenbecher	Roche, Basel, Schweiz
Zellzählung CASY [®] -System Casy 1 Modell TT	Roche, Basel, Schweiz
Zentrifuge <i>Centrifuge 5415 R</i>	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge <i>Centrifuge 5417 C</i>	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge <i>Hermle Z400K</i>	Hermle, Wehingen
Zentrifuge <i>Megafuge 1.0</i>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge <i>Sigma 2K15C</i>	Sigma Laborzentrifugen, Osterode im Harz

2.2 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle verwendeten Zellen wurden bei 37°C und 5,5 % CO₂-Begasung in einem Zellkulturinkubator (CO₂-Incubator, Sanyo, München) kultiviert. Es wurden stets autoklavierte, sterilisierte Materialien und Lösungen verwendet. Alle Arbeiten wurden unter sterilen Werkbänken (EN 12469, Clean Air Systems, Chennai, India) durchgeführt, wobei die Kultivierung der verwendeten Zellen auf Gewebekulturplastik (Sarstedt, Nümbrecht) erfolgte.

2.2.1 Ablösen, Zentrifugieren und Passagieren

Tabelle 2: Trypsin/EDTA

0,25 % (v/v)	Trypsin	Pan-Biotech, Aidenbach
0,02 % (v/v)	Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Pan-Biotech, Aidenbach
Trypsin und EDTA wurden in Dulbecco's Phosphat-gepufferte Salzlösung (DPBS, Pan-Biotech, Aidenbach) gelöst und anschließend steril filtriert.		

Bei 80-90 %iger Zellkonfluenz wurden die verwendeten Zellen in die nächste Passage überführt. Das jeweilig verwendete Medium wurde vorsichtig abgesaugt und die Zellen zweimal mit DPBS gewaschen, um Mediumrückstände zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen mit einem geringen Flüssigkeitsfilm Trypsin/EDTA (Tabelle 2) bedeckt und bei 37°C und 5,5 % CO₂-Begasung für 10 min inkubiert. Das Abheben und Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche (Sarstedt, Nümbrecht) wurde unter einem Lichtmikroskop (Axiovert 35, Carl Zeiss, Oberkochen) kontrolliert. Mit serumhaltigem Medium wurde die Wirkung des Trypsins gestoppt, die Zellen mit Hilfe einer 10 ml-Pipette (Sarstedt, Nümbrecht) in ein 15 ml Falcon (BD, Franklin Lakes, USA) überführt und anschließend 5 min bei 500 x g zentrifugiert (Zentrifuge Sigma 2K15C, Osterode am Harz).

Der Überstand wurde entfernt und das gebildete Zellpellet in 10 ml Kultivierungsmedium resuspendiert. Im Anschluss erfolgte eine Zellzählung und die Zellen wurden entweder kryokonserviert oder in einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen pro cm^2 auf Gewebekulturflaschen ausplattiert.

2.2.2 Kryokonservierung

Die verwendeten Zellen wurden von der Gewebekulturoberfläche abgelöst, mit DPBS gewaschen, zentrifugiert und in 1 ml Medium zur Kryokonservierung (10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde in Kultivierungsmedium gelöst und anschließend steril filtriert) resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in ein Kryoröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt und dieses zunächst bei -80°C und im Anschluss zur Langzeitkryokonservierung in flüssigen Stickstoff (-196°C) überführt.

Zur Überführung in die Zellkultur wurden kryokonservierte Proben im 37°C warmen Wasserbad (WB10, Memmert, Schwabach) zügig aufgetaut, in 10 ml Kultivierungsmedium überführt und für 5 min bei $250 \times g$ zentrifugiert. Anschließend wurde der Mediumüberstand verworfen und die Zellen in 10 ml Kultivierungsmedium resuspendiert, sowie Zellzahl und -vitalität bestimmt. Die Zellen wurden im Anschluss in einer Dichte von 5×10^4 Zellen pro cm^2 auf Gewebekulturflaschen ausplattiert werden.

2.3 **Isolation und Kultivierung von MSC aus humanen Knochenmarkspiraten**

Tabelle 3: MSC-Kultivierungsmedium

1000 ml	DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
10 % (v/v)	Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
1 % (v/v)	MEM Non-Essential Amino Acids	PAN-Biotech, Aidenbach
1 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)	PAN-Biotech, Aidenbach
1 % (v/v)	10 mM 2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA

Die Isolation von MSC erfolgte aus der Spongiosa von Beckenkammpräparationen/-aspiraten von acht Patienten im Alter von 11 bis 61 Jahren. Eine jeweilige Einverständniserklärung der Patienten und das Votum der zuständigen Ethikkommission der Georg-August-Universität lagen vor (Nummer des Ethikantrags: 15/10/01). Es war von keinem der Patienten eine chronische Entzündung, Infektion, Tumorerkrankung oder sonstige Erkrankung des Knochenmarks bekannt. Die aus dem Knochenmark gewonnenen Proben wurden mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation selektiert. Nach der Entnahme wurden die Proben mit 5000 i. E. Heparin (Rotexmedica,

Trittau) pro ml Aspirat versetzt, 1:1 mit 0,9 %iger Natrium-Chlorid-Lösung (NaCl; B. Braun, Melsungen) verdünnt und 6 ml dieser Verdünnung vorsichtig ohne Durchmischen über 3 ml vorgelegtes Lymphoprep™ (Axis-Shield, Oslo, Norwegen) in einem 15 ml Falcon überschichtet. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 20 min bei 800 x g und Raumtemperatur. Die im Grenzbereich der lymphozytären und erythrozytären Phasen auftretende Interphase (Abbildung 3) wurde mittels 5 ml-Pipette ohne Vermischen der einzelnen Phasen abgezogen und mit 5 ml NaCl in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 250 x g wurden der Überstand abgesaugt und die Zellen in einer 6-Well-Multiwell-Platte (Greiner Bio-One, Frickenhausen) mit 3 ml MSC-Kultivierungsmedium (Tabelle 3) pro Well ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium gewechselt, weitere Mediumwechsel erfolgten alle 48 bis 72 h. Bei Erreichen einer 80-90 %igen Zellkonfluenz wurden die MSC-Isolate gepoolt und in die Folgekultur überführt oder für eine spätere Verwendung kryokonserviert.

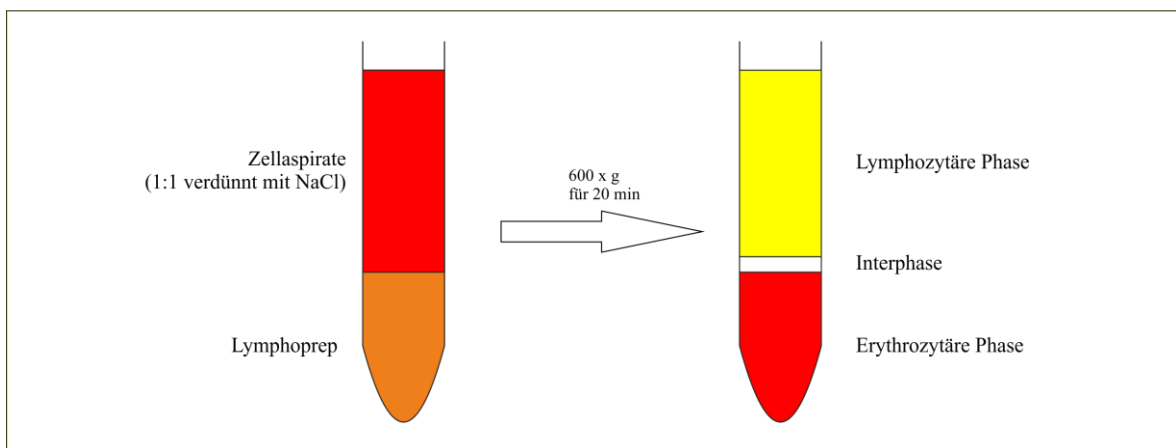


Abbildung 3: Darstellung der Dichtegradientenzentrifugation.

Die Kultivierung der MSC erfolgte im MSC-Kultivierungsmedium im Zellkulturinkubator bei 37°C unter Begasung mit 5,5 % CO₂. Hierfür wurden die MSC von der 6-Well-Oberfläche abgelöst, zentrifugiert, resuspendiert, gezählt und mit einer Dichte von 5×10^4 pro cm² in einer Zellkulturflasche ausplattiert. Die Anzucht der Zellen erfolgte über Nacht, nach spätestens 24 h konnte mikroskopisch eine Zelladhärenz festgestellt werden. Zellproliferation und -morphologie wurden täglich kontrolliert, ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 bis 72 h, im selben Zeitraum konnten auch erste Koloniebildungen (*colony forming units*) beobachtet werden. Nach ca. 10 bis 14 d erreichten die Zellen innerhalb der Kulturflasche eine 80-90 %ige Zellkonfluenz und konnten bei genügender Zellzahl für die Versuche verwendet werden.

2.4 Kultivierung der humanen PEK-Zelllinie PCI-13

Tabelle 4: PCI-13 Kultivierungsmedium

1000 ml	DMEM	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
10 % (v/v)	FKS	Biochrom, Berlin
1 % (v/v)	MEM Non-Essential Amino Acids	PAN-Biotech, Aidenbach
1 % (v/v)	Pen/Strep	PAN-Biotech, Aidenbach

Die Zellen der etablierten humanen Plattenepithelkarzinomlinie PCI-13 (Heo et al. 1989) wurden verwendet. Nach Auftauen aus der Kryokonservierung erfolgte die Proliferation der Zellen im PCI-13-Kultivierungsmedium (Tabelle 4) im Zellkulturinkubator bei 37°C unter Begasung mit 5,5 % CO₂. Nach spätestens 24 Stunden konnte mikroskopisch eine Zelladhärenz festgestellt werden. Zellproliferation und -morphologie wurden täglich kontrolliert, ein Mediumwechsel erfolgte alle 48 bis 72 Stunden. Nach ca. 7 bis 10 d erreichten die Zellen innerhalb der Kulturflasche eine 80-90 %ige Zellkonfluenz und konnten bei genügender Zellzahl für die Versuche verwendet werden.

2.5 Differenzierung isolierter, humaner MSC

2.5.1 Osteogene und adipogene Differenzierung im Monolayer

Tabelle 5: Medium zur osteogenen Induktion

0,1 µM	Dexamethason	Merk, Darmstadt
10 mM	β-Glycerophosphat	Sigma, München
300 µM	Vitamin C (steril)	Sigma, München
Die genannten Zusätze wurden in MSC-Kultivierungsmedium gelöst.		

Tabelle 6: Medium zur adipogenen Induktion

2 µM	Insulin	Sigma, München
500 µM	IBMX	Sigma, München
1 µM	Dexamethason	Merk, Darmstadt
200 µM	Indomethacin	Sigma, München
Die genannten Zusätze wurden in MSC-Kultivierungsmedium gelöst.		

Tabelle 7: Medium zum Erhalt der adipogenen Differenzierung

2 µM	Insulin	Sigma, München
Insulin wurde in MSC-Kultivierungsmedium gelöst.		

Zur Charakterisierung der MSC erfolgte die osteogene und adipogene Differenzierung im klassischen Monolayer (Meirelles Lda und Nardi 2003; Pittenger et al. 1999; Tropel et al. 2004). Die MSC wurden auf Gewebekulturschalen (Ø 6 cm, Sarstedt,

Nümbrecht) für die RNA-Isolierung und *Imaging Chambers* (Zell-Kontakt, Nörten-Hardenberg) für die histochemischen und immunhistochemischen Färbungen kultiviert. Die spezifische Induktion der MSC wurde ab einer Zellkonfluenz von 70-80 % durchgeführt. Für die osteogene Induktion wurden das Kultivierungsmedium durch das Medium zur osteogenen Induktion (Tabelle 5) ersetzt und die Zellen über einen Zeitraum von 25 Tagen differenziert. Ein Wechsel des osteogenen Induktionsmediums erfolgte alle vier Tage.

Für die adipogene Induktion wurde das Kultivierungsmedium durch das Medium zur adipogenen Induktion (Tabelle 6) ersetzt. Nach 3 Tagen Induktion folgte eine Stabilisierung der adipogenen Differenzierung durch eine Kultivierung mit dem Medium zum Erhalt der adipogenen Differenzierung (Tabelle 7) für 4 Tage. Die Induktions- und Stabilisierungsphase wurden jeweils zweimal wiederholt, abschließend erfolgte eine viertägige Differenzierung der MSC im Medium zum Erhalt der adipogenen Differenzierung.

Im Rahmen aller Differenzierungsversuche wurden nach 25 Tagen Proben für histochemische und immunhistochemische Färbungen entnommen.

2.5.2 Chondrogene Differenzierung im *Micro-Mass-Body*

Tabelle 8: Medium zur chondrogenen Differenzierung

1 %	IST+ Premix	B&D, Heidelberg
0,1 μM	Dexamethason	Merk, Darmstadt
1 mM	L-Prolin	Sigma, München
10 ng/ml	TGF- β_1	PeptoTech, Rocky Hill/NJ, USA
300 μM	Vitamin C (steril)	Sigma, München

Die genannten Zusätze wurden in MSC-Kultivierungsmedium gelöst.

Zur Charakterisierung erfolgte die chondrogene Differenzierung der MSC im klassischen *Micro-Mass-Body* (MMB; (Johnstone et al. 1998);

Abbildung 4) in Gegenwart von Serum und TGF- β_1 . Undifferenzierte Stammzellen wurden wie beschrieben von den Gewebekulturoberflächen abgelöst und in Medium zur chondrogenen Induktion (Tabelle 8) resuspendiert. Aliquotes von 0,5 ml mit je 2×10^5 Zellen wurden in 15 ml Falcons überführt und für 10 min bei $65 \times g$ zentrifugiert. Diese wurden im Anschluss bei 37°C und unter Begasung mit 5 % CO_2 im Inkubator inkubiert. Um einen guten Sauerstoffaustausch zu gewährleisten sowie externe Kontaminationen zu vermeiden, behielten die Röhrchen eine sterile luftdurchlässige Schutzkappe. Innerhalb von 24 Stunden nach Inkubation wurde ein Zellaggregat sichtbar, das im Verlauf der Differenzierung keine Adhärenz zur Wand des Röhrchens zeigte. Im Verlauf des Differenzierungszeitraums von

25 Tagen wurden das chondrogene Induktionsmedium alle vier Tage erneuert und Proben zur Erstellung von histologischen Kryopräparaten entnommen.

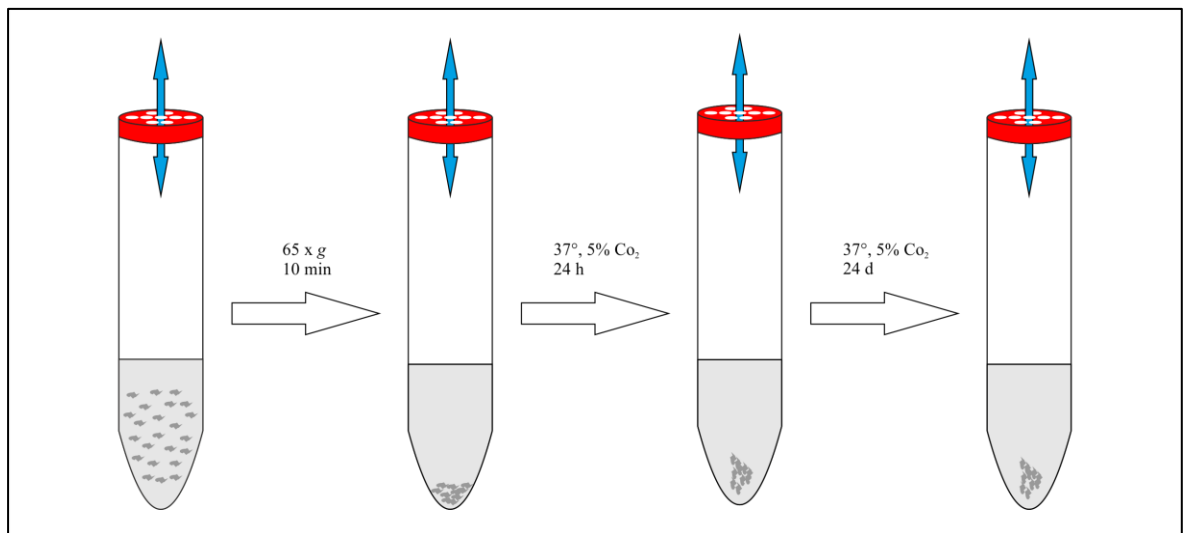


Abbildung 4: Chondrogene Differenzierung von MSC im *Micro-Mass-Body*.

2.6 Histochemische Analysen zur Charakterisierung der Differenzierung von humanen MSC

2.6.1 Osteogene Differenzierung

Der Nachweis einer osteogenen Differenzierung erfolgte histologisch durch die Auswertung der Expression alkalischer Phosphatase (AP, Sigma, München).

Tabelle 9: Citrat-Formaldehyd-Fixierlösung

2,5 ml	Citrat-Lösung	Sigma, München
6,5 ml	Aceton	Roth, Karlsruhe
0,8 ml	Formaldehyd 37 %	Merck, Darmstadt

Tabelle 10: Naphtol-Färbelösung

125 µl	Natrium-Nitrit-Lösung	Sigma, München
125 µl	Alkalische Phosphatase-Lösung	Sigma, München
125 µl	Naphthol-Lösung	Sigma, München
5,63 ml	<i>Aqua destillata</i>	Merck, Darmstadt

Durch doppeltes Waschen der Zellen mit DPBS wurden zunächst alle Mediumrückstände entfernt und die Zellen anschließend mit der Citrat-Formaldehyd-Fixierlösung (Tabelle 9) fixiert. Durch gründliches Spülen mit *Aqua destillata* wurde die Fixierlösung entfernt und die Probe für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit Naphthol-Färbelösung (Tabelle 10) inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Färbelösung rückstandslos abgesaugt und die Präparate mit *Aqua destillata* gewaschen. Die

Gegenfärbung der Präparate erfolgte mit Hämatoxylin. Abschließende wurden diese gewaschen und mit *FluorPreserve*TM (Merck, Darmstadt) eingedeckt und bei 4°C gelagert.

2.6.2 Sudan-III-Färbung zur Darstellung der adipogenen Differenzierung

Die Visualisierung intrazellulärer Lipidvakuolen wurde mit Sudan-III realisiert. Sudan-III ist ein in Kohlenwasserstoffen, Ölen, Fetten und Wachsen löslicher Azofarbstoff.

Tabelle 11: Sudan-III-Färbelösung

0,3 % (w/v)	Sudan-III	Sigma, München
Sudan-III wurde in 70 %igem Ethanol gelöst, 15 min auf 60°C erhitzt und anschließend steril filtriert.		

Durch doppeltes Waschen der Zellen mit DPBS wurden zunächst alle Mediumrückstände entfernt und anschließend die Sudan-III-Färbelösung (Tabelle 11) aufgebracht. Der Färbeprozess wurde unter dem Mikroskop beobachtet und kontrolliert. Nach 3 min wurde die Färbelösung abgesaugt und Rückstände restlos mit DPBS entfernt. Abschließend wurde das Präparat mit *FluorPreserve*TM eingedeckt und bei 4°C gelagert.

2.6.3 Alcianblau-Färbung zur Darstellung der chondrogenen Differenzierung

Zur Darstellung knorpelspezifischer Proteoglykane wurde der wasserlösliche Phthalocyaninfarbstoff Alcianblau (AB) verwendet.

Tabelle 12: AB-Färbelösung

154 mM	NaCl	Merck, Darmstadt
134 mM	MgCl	Merck, Darmstadt
0,05 % (w/v)	Alcianblau 8GX	Sigma, München
Die genannten Additive wurden in 3 %iger Essigsäure gelöst und anschließend auf einen pH-Wert 1,5 eingestellt.		

Durch doppeltes Waschen der Zellen mit DPBS wurden zunächst alle Mediumrückstände entfernt und die Präparate für 30 min mit 3,7 % (v/v) Formaldehydlösung fixiert. Im Anschluss wurden die Präparate erneut gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur mit AB-Färbelösung (Tabelle 12) gefärbt. Am nächsten Morgen wurde die Färbelösung abgenommen, die Zellen mit DPBS gewaschen und mit *FluorPreserve*TM eingedeckt. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

2.7 Charakterisierung isolierter MSC mittels Durchflusszytometrie

Tabelle 13: Verwendete Antikörper der durchflusszytometrischen MSC-Charakterisierung

Oberflächen-eigenschaft	Name	Gekoppelt	Hersteller
CD 34	gp105-120	PE gekoppelt	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach
CD 45	leukocyte common antigen	PE gekoppelt	BioLegend, San Diego, USA
CD 73	ecto-5'-nucleotidase	PE gekoppelt	BD, Franklin Lakes, USA
CD 90	Thy-1	PE gekoppelt	BioLegend, San Diego, USA
CD 105	endoglin	PE gekoppelt	BioLegend, San Diego, USA

Eine Oberflächencharakterisierung der MSC erfolgte mittels Durchflusszytometrie (*fluorescence activated cell sorting*, FACS). Hierzu wurden die zu analysierenden Zellen wie beschrieben von ihrer Gewebekulturoberfläche abgelöst und mit DPBS eine Zellsuspension von 1×10^5 Zellen pro 100 μl hergestellt. Im weiteren Verlauf wurden jeweils 100 μl dieser Zellsuspension mit je 2 μl eines monoklonalen Antikörpers Phycoerythrin (PE; BD, Franklin Lakes, USA) für 10 min bei 4°C inkubiert. Die Expression der in Tabelle 13 aufgelisteten Antikörper wurde untersucht. Für die FACS-Untersuchung wurden anschließend alle Proben mit DPBS auf ein einheitliches Volumen von 500 μl eingestellt und im Durchflusszytometer FACSCanto II (BD, Franklin Lakes, USA) analysiert. Die nachfolgende Auswertung erfolgte mit der Software BD FACSDiva (BD, Franklin Lakes, USA). Es wurden mindestens 10.000 Events aufgezeichnet und mittels eines einparametrischen Analyseprotokolls ausgewertet (FL1). Zelluläre Aggregate und Zellfragmente wurden durch Anpassen des Messfensters (FSC/SSC dotplot) ausgeschlossen. Die Erstellung der jeweiligen Histogramme erfolgte mit der Software FlowJo (FlowJo, Ashland, USA).

2.8 TGF- β_1 induzierte Transwell-Ko-Kultur-Differenzierung

2.8.1 Transwell-Ko-Kultur von MSC und PCI-13

Tabelle 14: Reduktionsmedium

1 %	FKS	Biochrom, Berlin
1 %	Pen/Strep	PAN-Biotech, Aidenbach
Die genannten Additive wurden in DMEM gelöst.		

Tabelle 15: Transwell-Ko-Kultur-Medium

20 ng/ml	TGF- β_1	PeproTech, Rocky Hill/NJ, USA
1 %	Pen/Strep	PAN-Biotech, Aidenbach
Die genannten Additive wurden in Panserin 401 (serumfrei; Pan-Biotech, Aidenbach) gelöst.		

Die Ko-Kultur erfolgte in 6-Well-Multiwell-Platten mit Membran-Ko-Kultureinsätzen (*ThinCerts*; Greiner Bio-One, Frickenhausen). Dabei wurden die PCI-13-Zellen auf dem Plattenboden und die MSC auf dem *ThinCert*-Boden jeweils als Monolayerkultur kultiviert. Über die semipermeable Membran (Porengröße: 0,4 μm) der *ThinCerts* war ein freier Austausch von Medium und Mediumbestandteilen zwischen Schalenboden und Einsatz gewährleistet (Abbildung 5).

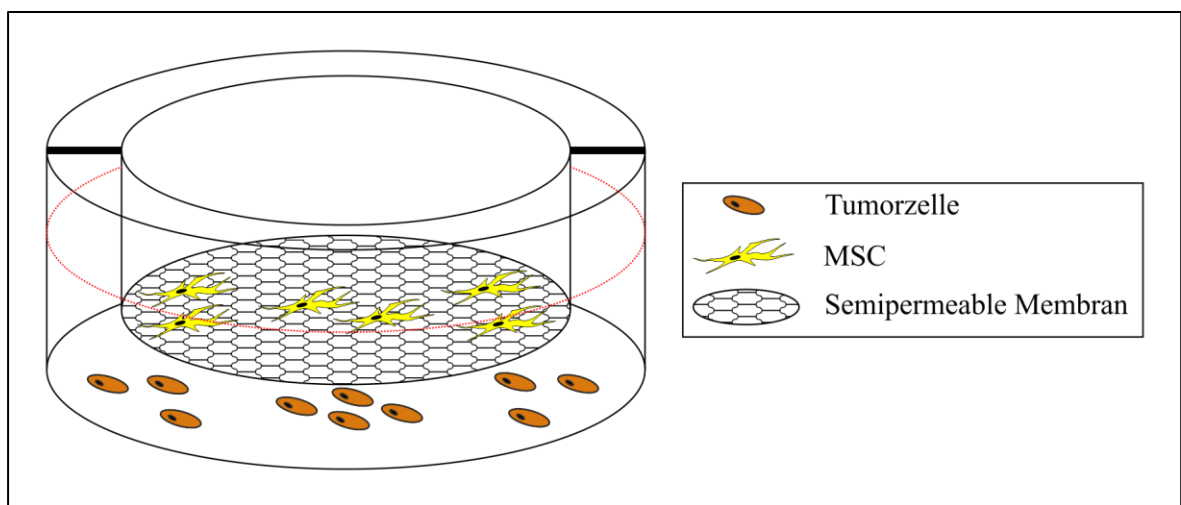


Abbildung 5: Ausschnitt einer Multiwell-Platte mit Transwell-Ko-Kultur-Einsatz.

Jeweils vor den Versuchen wurden MSC und PCI-13 für 8 bis 10 Tage getrennt voneinander kultiviert und in MSC- bzw. PCI-13-Kultivierungsmedium kultiviert, um eine ausreichende Zellzahl gewährleisten zu können. Vier Tage vor Versuchsbeginn wurden die Zellen wie beschrieben vom Schalenboden abgelöst und in die Ko-Kultur mit MSC-Kultivierungsmedium überführt. Einen Tag vor Versuchsbeginn erfolgte eine Mediumumstellung der Ko-Kultur auf Reduktionsmedium (Tabelle 14) für 24 h. Am Versuchsstart wurden die Ausgangsproben genommen und die restlichen Ko-Kulturen auf Transwell-Ko-Kultur-Medium (Tabelle 15) umgestellt, wobei durch die generelle Serumfreiheit des Panserin 401 gewährleistet wurde, dass nur die Zugabe des TGF- β_1 auf die ko-kultivierten Zellen wirken konnte. Weitere Probennahmen erfolgten an Tag 3 und 6.

2.9 Analyse der Proliferationscharakteristika von MSC und PCI-13

Die Evaluation der Proliferations- und Wachstumseigenschaften erfolgte mit Hilfe des Verdopplungsfaktors (V-Faktor). Für die Berechnung wurde folgende Formel zu Grunde gelegt:

$$v = 100 / (K_n / K_0 - 1)^n$$

K_n	= Zellzahl nach dem Kultivierungszeitraum n
K_0	= Initial plattierte Zellzahl
n	= Kultivierungszeitraum in Tagen
v	= V-Faktor, Auflösung der Gleichung nach v

Der V-Faktor wurde an verschiedenen Zeitpunkten während der Kultivierung bestimmt, quantifiziert und statistisch ausgewertet. Er beschreibt die Zunahme der Zellpopulationen als Verdopplungsfaktor innerhalb von 24 Stunden. Die Zellzählung erfolgte durch das vollautomatische, nicht-invasive CASY®-System Casy 1 Modell TT (150 µm Messkapillare, Roche, Basel, Schweiz). Hierfür wurden 100 µl der Zellsuspension in 10 ml der isotonen Elektrolytlösung CasyTon (Roche, Basel, Schweiz) in einem speziellen Casy Probenbecher (Roche, Basel, Schweiz) suspendiert. Anschließend konnte eine dreifache Zellzahlbestimmung nach dem Widerstandsmessprinzip vorgenommen werden. Beim Eindringen einer Zelle in die Messkapillare entstand durch Widerstandsänderung ein elektrischer Impuls, wobei die Anzahl der gemessenen Impulse der Zellzahl entsprach.

2.10 Darstellung zelltypspezifischer Proteinexpression mittels direkter Immunfluoreszenzfärbung

Tabelle 16: Methanol-/Aceton-Fixierlösung

70 ml	Methanol	Merck, Darmstadt
30 ml	Aceton	Merck, Darmstadt

Tabelle 17: BSA-Blocking-Reagenz

7,5 % (w/v)	Bovines Serum Albumin (BSA) in DPBS	Biochrom, Berlin
-------------	-------------------------------------	------------------

Tabelle 18: Anti-Vimentin Antikörper (EPR3776)

0,2 mg/ml	Antikörper Anti-Vimentin (1:100 in BSA)	Abcam, Cambridge, UK
-----------	---	----------------------

Tabelle 19: Anti-E-Cadherin Antikörper (612130)

0,25 mg/ml	Antikörper Anti-E-Cadherin (1:50 in BSA)	BD, Franklin Lakes, USA
------------	--	-------------------------

Tabelle 20: Fluoreszenzfarbstoff DAPI

20 mg/ml	4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) (1:1000 in BSA)	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
----------	--	-------------------------------

Die Immunfluoreszenzfärbung (IF) ist eine Methode hoher Auflösung, mit der die zelltypspezifische Proteinexpression dargestellt werden kann (Coons 1954). Bei der direkten Methode bindet ein fluoreszenzmarkiertes Immunglobulin unmittelbar an ein zellspezifisches Protein und markiert es so. Die Anregung der jeweiligen Alexa-Fluor- bzw. Fluorescein (FITC)-Fluoreszenz durch ultraviolettes Licht charakteristischer Wellenlängen führte zur spezifischen Illumineszenz des Antikörpers.

Die Zellen wurden zweimal mit DPBS gewaschen und anschließend für 5 min bei -20°C mit Methanol-/Aceton-Fixierlösung (Tabelle 16) fixiert. Nach erneut gründlichem Waschen mit DPBS wurden die Zellen in eine feuchte Kammer überführt. Alle folgenden Inkubationsschritte wurden in einer Dunkelkammer bei 37°C durchgeführt. Um die freien, unspezifischen Antikörperbindungsstellen zu binden, erfolgte für 30 min eine Blockung mit 7,5 % BSA-Blocking-Reagenz (Tabelle 17). Anschließend wurden die Proben mit $100\ \mu\text{l}$ der jeweiligen Antikörperlösung (Tabelle 18, Tabelle 19) für 1 h inkubiert. Nach erneuter gründlicher Spülung mit DPBS erfolgte zur Darstellung intranukleärer DNA eine Inkubation mit DAPI (Tabelle 20) für 15 min. Abschließend wurden die Zellen gründlich mit DPBS gewaschen und mit *FluorPreserve*TM auf einem Objektträger fixiert. Die Analyse und Auswertung der Proteinexpression erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskopie (Zeiss Axiovert 200M mit Zeiss Illuminator HXP 120C; Carl Zeiss, Oberkochen).

2.11 Darstellung zelltypspezifischer Genexpression mittels RT-qPCR

Mittels quantitativer Reverser Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-qPCR) wurde die Expression zelltypspezifischer *messenger* Ribonukleinsäuren (mRNA) nachgewiesen. Die aus MSC und PCI-13 isolierte RNA wurde aufgereinigt und mit Hilfe einer reversen Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die Amplifikation des primerspezifischen Genabschnitts erfolgte im Verlauf der PCR nach Anlagerung (*Annealing*) sequenzspezifischer Primerpaare an die cDNA. Die spezifische Genexpression wurde quantitativ bestimmt und statistisch ausgewertet.

2.11.1 Sequenzspezifisches Primerdesign

Mit Hilfe der Internetplattform des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI, Bethesda, USA, [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov); 27.08.2020) wurden die Sequenzen der zu untersuchenden Gene identifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass sie mindestens eine Intronsequenz voneinander getrennt waren, um kontaminierende

Material und Methoden

genomische DNA von spezifischen Amplifikationen unterscheiden zu können. Die Primer wurden anschließend von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) hergestellt. Eine detaillierte Beschreibung der verwendeten Primer und der primerspezifischen Reaktionsbedingungen findet sich in Tabelle 21.

Tabelle 21: Verwendete Primer für die RT-qPCR

Gen	<i>Forward Primer 5'-3'</i> <i>Reverse Primer 5'-3'</i>	Größe (Basepairs, bp)	Accessionnummer
GAPDH	5'- GAGTCAACGGATTGGTTCGT -3' 5'- GACAAGCTTCCCGTTCTCAG -3'	185 bp	NM_002046.5
E-Cadherin	5'- CGGAGAAGAGGACCAGGACT -3' 5'- GGTCAGTATCAGCCGCTTTC -3'	185 bp	NM_004360.4
Vimentin	5'- GGCTCGTCACCTTCGTGAAT -3' 5'- GAGAAATCCTGCTCTCCTCGC -3'	110 bp	NM_003380.3
WNT3	5'- GGCTGTGACTCGCATCATAA -3' 5'- CAGCAGGTCTTCACCTCACA -3'	245 bp	NM_030753.4
β-Catenin	5'- GAAACGGCTTTCAGTTGAGC -3' 5'- CTGGCCATATCCACCAGAGT -3'	166 bp	NM_001904.3
Snail1	5'- CAGTGCCTCGACCACTATGC -3' 5'- TGCTGGAAGGTAAACTCTGGATTA -3'	114 bp	NM_005985.3
Twist	5'- TTCTCGGTCTGGAGGATGGA -3' 5'- CAATGACATCTAGGTCTCCGGC -3'	102 bp	NM_000474.3
MMP-14	5'- GAGCTCAGGGCAGTGGATAG -3' 5'- GGTAGCCCGGTTCTACCTTC -3'	172 bp	NM_004995.3

2.11.2 RNA-Isolation

Tabelle 22: RNeasy® Mini Kit

Puffer RLT	Qiagen, Venlo, Netherlands
Puffer RW1	Qiagen, Venlo, Netherlands
Puffer RPE	Qiagen, Venlo, Netherlands

Tabelle 23: RNase-Free DNase Set

DNase-I-Lyophilisat (in 1,5 ml RNase & DNase freiem H ₂ O)	Qiagen, Venlo, Netherlands
Puffer RDD	Qiagen, Venlo, Netherlands
Das DNase-I-Lyophilisat wurde mit 1,5 ml RNase- und DNase-freiem H ₂ O (B. Braun, Melsungen) versetzt.	

Die Isolation zelltypspezifischer RNA erfolgte mit dem *RNeasy*® Mini Kit (Tabelle 22) und dem RNase-Free DNase Set (Tabelle 23) entsprechend den Herstellerempfehlungen. Die für die RNA-Isolation differenzierten Zellen wurden zweimal mit DPBS gewaschen, mit 350 µl RLT-Puffer und 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; Verhältnis 100:1) lysiert und die zellulären RNasen so denaturiert. Anschließend wurde das Lysat unter Verwendung steriler, RNase-freier Pipettierhilfen in ein Eppendorfgefäß überführt und entweder bei -80°C eingefroren oder direkt der RNA-Isolation zugeführt. Zur Aufbereitung wurde das Lysat mit 350 µl 70 %igem Ethanol (Merck, Darmstadt) versetzt, durchmischt

und unmittelbar auf die RNeasy® Mini-Säule gegeben. Über die Membran der RNeasy® Mini-Säule erfolgte die Aufreinigung der RNA-Probe. Verunreinigungen durch an die Membran gebundene DNA wurden durch Inkubation mit RNase-freier DNase für 15 min entfernt. Die Zugabe von 350 µl RW1-Puffer beendete den DNase-Verdau. Waschschritte mit 700 µl RW1-Puffer und 500 µl RPE-Puffer führten zur Aufreinigung der an der Membran gebundenen RNA. Diese wurde abschließend durch Zugabe von 40 µl RNase-freiem H₂O in ein RNase-freies Eppendorfgefäß eluiert. Die Gesamtkonzentration und Reinheit der RNA wurde spektralphotometrisch bei 260 nm und 280 nm ermittelt (NanoDrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA).

2.11.3 cDNA-Synthese mittels reverser-Transkriptase-Lösungen

Tabelle 24: iScript™ cDNA Synthese Kit

5X <i>iScript reaction mix</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
<i>iScript reverse transcriptase</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Die cDNA Synthese mittels reverser-Transkriptase-Reaktion erfolgte mit dem iScript™ cDNA Synthese Kit (Tabelle 24) gemäß den Herstellerangaben. So wurden 100 ng der isolierten RNA mit 4 µl 5X *iScript reaction mix*, 1 µl *iScript reverse transcriptase* und RNase- und DNase-freiem H₂O auf ein Endvolumen von 20 µl eingestellt. Die Inkubation erfolgte in einem Thermocycler (Eppendorf, Hamburg). Die entstandene cDNA wurde bei -20°C eingefroren oder direkt in einer Qualitativen reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (qRT-PCR) vervielfältigt.

2.11.4 qRT-PCR

Durch die Wiederholung von DNA-Denaturierung, Anlagerung von sequenzspezifischen Primern an die DNA (*Annealing*) und komplementärer Strangsynthese durch eine thermostabile DNA-Polymerase (*Extension*) erfolgt durch die PCR eine exponentielle Vervielfältigung eines durch den sequenzspezifischen Primer eingegrenzten Genabschnitts.

Tabelle 25: qRT-PCR Reagenz

	2X SensiFAST™ SYBR® & Fluorescein mix	Bioline, London, UK
10 µM	Primer forward	Siehe Tabelle 21
10 µM	Primer reverse	Siehe Tabelle 21

Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte gemäß den Herstellerangaben (Tabelle 25). Dabei wurden die Proben auf Eis in 96-Well-Probenplatten (Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA) verarbeitet. Für jeden Ansatz wurden 2 µl cDNA durch 10 µl 2X *Sensifast*

SYBR Green, 0,8 µl *forward* Primer, 0,8 µl *reverse* Primer und 6,4 µl RNase-, DNase-freies H₂O vervollständigt. Die cDNA-Proben wurden jeweils als Triplikate eingesetzt. Als Referenzgen diente Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Proben wurden in den PCR-Thermocycler überführt und für 2 min bei 95°C zur Polymerase-Aktivierung erhitzt. Anschließend durchliefen die Proben 45 Zyklen, in denen die nachfolgend genannten Schritte wiederholt wurden:

- 10 s Denaturierung der Proben bei 95°C
- 30 s Annealing der Primer und Extension des komplementären DNA-Strangs bei 60°C
- Fluoreszenzmessung

Nach Abkühlung auf 4°C wurden die Proben bei -20°C gelagert.

2.12 Darstellung zelltypspezifischer Proteinexpression mittels *Antibody Array*

2.12.1 Protein-Isolation und Aufreinigung

Tabelle 26: Bio-Plex™ Cell Lysis-Kit

Bio-Plex™ <i>Cell Wash Buffer</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Bio-Plex™ <i>Cell Lysis Buffer</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Bio-Plex™ <i>Cell Lysis Buffer, Factor 1 (250x)</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Bio-Plex™ <i>Cell Lysis Buffer, Factor 2</i>	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA

Die Isolation zelltypspezifischer Proteine erfolgte mit dem Bio-Plex™ Cell Lysis Kit (Tabelle 26) entsprechend den Herstellerempfehlungen. Die für die Isolation differenzierten Zellen wurden mit DPBS und Bio-Plex™ *Cell Wash Buffer* gewaschen. Anschließend erfolgte die Lysierung mit 200 µl einer Zell-Lysis-Lösung (5 ml Bio-Plex™ *Cell Lysis Buffer*, 20 µl Bio-Plex™ *Cell Lysis Buffer Factor 1*, 10 µl Bio-Plex™ *Cell Lysis Buffer Factor 2*, 20 µl Phenylmethylsulfonylfluorid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA; PMSF)) für 20 min bei 4°C auf einem Orbital-Shaker (BMG Labtech, Offenburg). Danach konnte das Lysat eines Wells mittels Eppendorf-Pipette in ein Eppendorf-Cup überführt werden, um dann bei 4.500 x g bei 4°C zentrifugiert zu werden. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei -80°C eingelagert.

2.12.2 Quantifizierung des Proteingehalts mittels *Bicinchoninic Acid Assay (BCA)*

Tabelle 27: Pierce™ BCA Protein Assay Kit

BCA Reagent A	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
BCA Reagent B	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Albumin Standard Ampullen (2 mg/ml)	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA

Zur kalorimetrischen Detektion und Quantifizierung des Gesamt-Proteingehalts wurde das Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Tabelle 27) verwendet. 25 µl des Lysats und des Standards wurden in eine 96-Well-Multiwell-Platte (Greiner Bio-One, Frickenhausen) pipettiert, 200 µl BCA Working Reagent (Verhältnis Reagent A zu Reagent B 50:1) hinzugegeben und auf einem Orbital Shaker (ThermoStar, BMG Labtech, Offenburg) für 30 s bei Raumtemperatur vermischt. Anschließend wurde bei 37°C für 30 min inkubiert. Nachdem die Platte wieder auf Raumtemperatur abgekühlt war, erfolgte die kalorimetrische Detektion und Quantifizierung des Gesamt-Proteingehalts bei einer Wellenlänge von 562 nm im Photometer (SpectraMax M2 Multi-Mode Microplate Reader, Sunnyvale, USA).

2.12.3 Untersuchung des AKT-Signalwegs mittels PathScan®

Tabelle 28: *PathScan® AKT Signaling Antibody Array Kit*

20X Array Wash Buffer (AWB)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Array Blocking Buffer (ABB)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Array Diluent Buffer (ADB)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
10X Detection Antibody Cocktail (DAC)	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
10X HRP-linked Streptavidin	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
20X LumiGLO® Reagent A	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
20X Peroxid Reagent B	Cell Signaling Technology, Danvers, USA

Die Darstellung zelltypspezifischer Proteinexpression innerhalb des AKT-Signalweges wurde mittels *PathScan® AKT Signaling Antibody Array Kit* (Tabelle 28) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurde die Multi-Well-Abdichtung (Cell Signaling Technology, Cambridge, UK) so auf der Glasplatte (Cell Signaling Technology, Cambridge, UK) fixiert, dass die Nitro-Cellulose Felder in das Innere der Wells zeigten. Jedes Well wurde dann mit 100 µl ABB für 15 min bei Raumtemperatur auf einem Orbitalshaker (THERMOstar®; BMG Labtech, Offenburg) inkubiert. Nachdem der Puffer vorsichtig ausgeklopft worden war, wurden 75 µl des gewonnenen Lysats (2.12.1) in je ein Well gegeben und bei Raumtemperatur für 2 h auf einem Orbitalshaker inkubiert. Der Well-Inhalt wurde verworfen und es erfolgte eine gründliche Waschung mit 1X AWB (150 µl 10X AWB verdünnt in 1350 µl ADB). Anschließend wurden 75 µl 1X DAC (150 µl 10X DAC verdünnt in 1350 µl ADB) in jedes Well gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Es erfolgte eine erneute gründliche Waschung mit AWB. Nachdem der Well-Inhalt verworfen wurde, wurden 75 µl 1X HRP-linked Streptavidin (150 µl 10X HRP-linked Streptavidin verdünnt in 1350 µl ADB) in die Wells pipettiert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde erneut mit AWB gründlich gewaschen. Die Multi-Well-Abdeckung wurde entfernt und die Glasplatte in einem Bad aus AWB gespült. Anschließend wurden 0,5 ml 20X LumiGLO® und 0,5 ml 20X Peroxid in 9 ml deionisiertem

Wasser gelöst und die Glasplatte damit überdeckt. Die Glasplatte wurde unmittelbar danach in einer Kunststoff-Folie fixiert und der Chemiluminiscence-Auswertung überführt (LAS 4000, Fujifilm, Tokio, Japan).

2.13 Statistische Auswertung

Es wurden insgesamt drei Versuche (n=3) bei jeweils dreifacher Messwiederholung durchgeführt. Die erhobenen Zellzählungs-Triplikate für jeden Beobachtungstag wurden sowohl für MSC als auch für PCI-13 gemittelt. Die statistischen Analysen wurden mit Hilfe der Software GraphPad Prism (GraphPad Software, La Jolla, USA) durchgeführt und visualisiert. Die Expressionverhältnisse der qRT-PCR wurden über das $\Delta\Delta C_t$ des mathematischen Modells zur relativen Quantifizierung bestimmt (Livak und Schmittgen 2001). Unterschiede in der Genexpression wurden durch einen Kruskal-Wallis-Test bestimmt und multiple Vergleiche durch einen Dunn's Vergleichstest mit einem Alpha von 0,05 durchgeführt. Unterschiede in der relativen Proteinexpression der IF wurden mittels two-way Anova bestimmt. Die relative Proteinexpression der *Antibody*-Arrays wurde nach dem *Student's-t*-Test berechnet.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung humaner MSC mittels Durchflusszytometrie

Die durchgeführte Charakterisierung der gewonnenen humanen MSC mittels FACS ergab nach Auswertung gemittelt in mehr als 90 % eine homogene Positivität für die mesenchymalen Antigene CD73, CD90 und CD105. Als Kontrollantigene der hämatogenen Reihe ergab die Auswertung in mehr als 95 % eine homogene Negativität für die Antigene CD34 und CD45 (Abbildung 6).

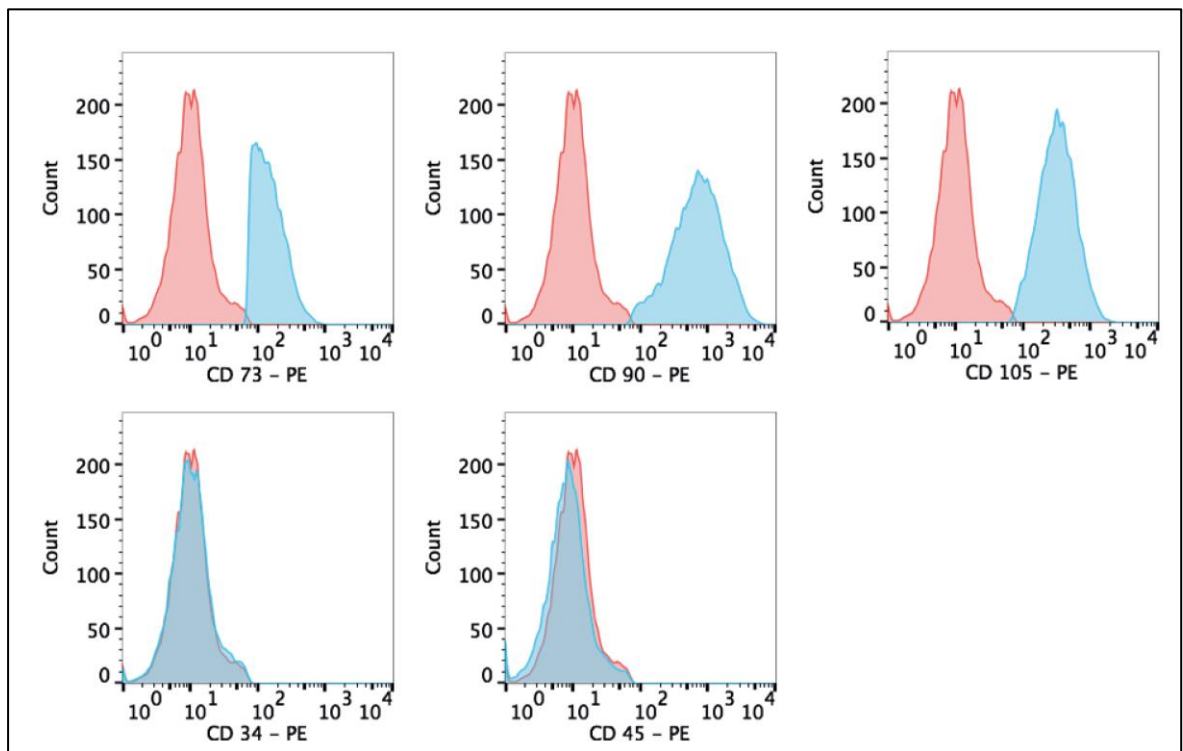


Abbildung 6: Eine repräsentative, durchflusszytometrische Analyse isolierter humaner MSC. Die Isotyp-Kontrollfärbung humaner Antikörper ist in hellrot, die spezifischen Marker sind in hellblau dargestellt.

3.2 Osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung humaner MSC

Die klassische osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung humaner MSC erfolgte im Monolayer- (2.5.1) bzw. MMB-System (2.5.2). Die Applikation des Mediums zur osteogenen Induktion führte in allen im klassischen Monolayer differenzierten MSC nach 25 Tagen zu einer positiven Alkalische-Phosphatase-Färbung (Abbildung 7A). Nach Applikation des Mediums zur adipogenen Induktion und des Mediums zum Erhalt der

adipogenen Induktion zeigten alle im klassischen Monolayer differenzierten MSC nach 25 Tagen eine positive Färbung für Sudan-III (Abbildung 7B). Nach Applikation des Mediums zur chondrogenen Induktion zeigten alle im klassischen MMB- System differenzierten MSC nach 25 Tagen eine positive Färbung für AB (Abbildung 7C).

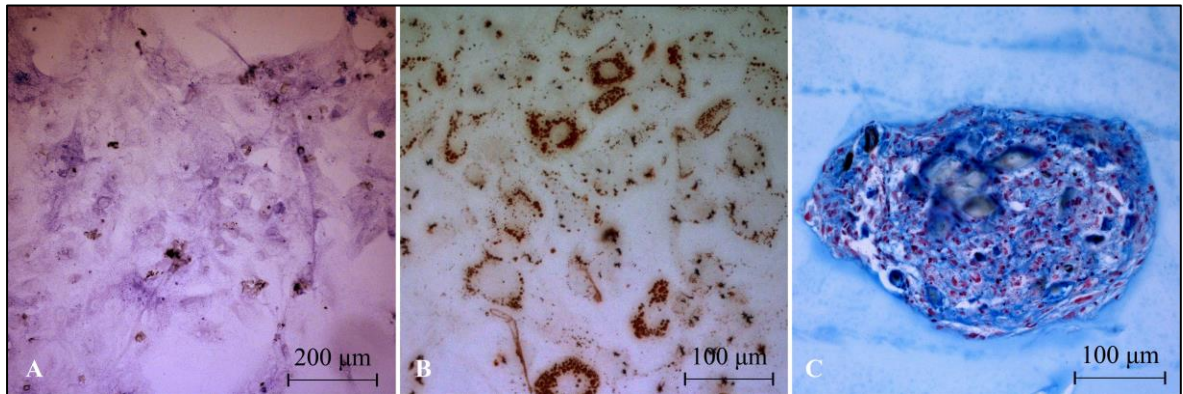


Abbildung 7: Osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung humaner MSC. (A) AP-Färbung. (B) Sudan-III-Färbung. (C) AB-Färbung.

3.3 Proliferationscharakteristika von MSC und PCI-13

MSC und PCI-13 demonstrierten stabile Proliferations- und Verdopplungseigenschaften *in vitro*. Ko-Kultivierung oder TGF- β_1 -Induktion führte bei den MSC zu keiner signifikanten Veränderung der Proliferationsseigenschaften. Hingegen zeigten die PCI-13 Ko-Kulturen eine signifikante Reduktion der Proliferation ($p = 0.0001$), die jedoch unter TGF- β_1 Einfluss aufgehoben wurde.

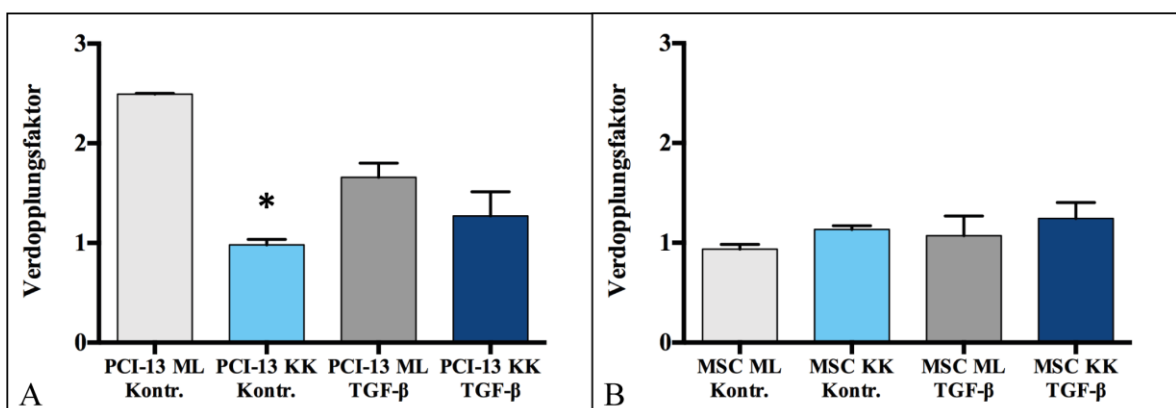


Abbildung 8: Täglicher Verdopplungsfaktor der PCI-13 und MSC. (A) Im Monolayer (ML) sowie in Ko-Kultur (KK) kultivierte PCI-13 und (B) im Monolayer sowie in Ko-Kultur kultivierte MSC (* = $p \leq 0.0001$).

3.4 Monolayer-Differenzierung humaner MSC und PCI-13-Zellen unter dem Einfluss von TGF- β_1

3.4.1 IF-Proteinexpression von Vimentin und E-Cadherin in im Monolayer kultivierten PCI-13 und MSC

In den PCI-13 Monolayer-Kulturen wurde über den gesamten Zeitraum der sechstägigen Differenzierung eine kontinuierliche Expression von Vimentin in allen Kulturen festgestellt. Die durchgeführte Quantifizierung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit TGF- β_1 induzierten PCI-13 und der Kontrollgruppe (Abbildung 9A). Eine kontinuierliche Expression des Transmembran-Proteins E-Cadherin konnte ebenfalls über den gesamten Zeitraum der sechstägigen Differenzierung gezeigt werden. (Abbildung 9B).

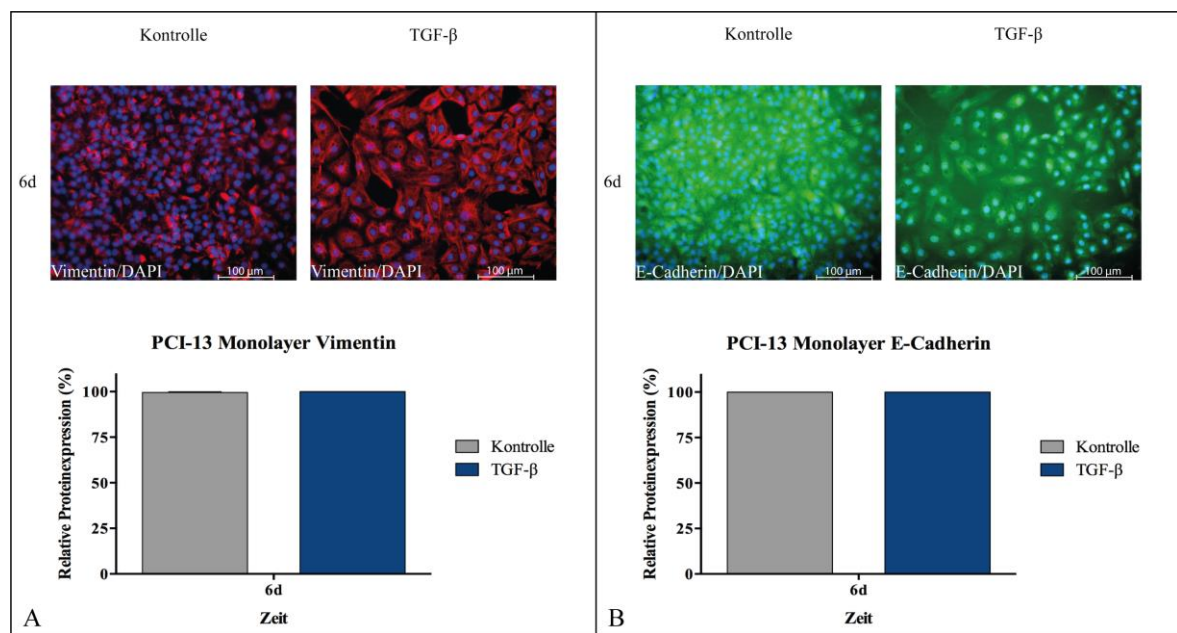


Abbildung 9: IF-Proteinexpression der PCI-13 Monolayer-Kulturen. Vimentin (A) ist mit Alexa Fluor 594 (rot), E-Cadherin (B) ist mit FITC (grün) und die Zellkerne sind mit DAPI (blau) dargestellt. Relative Proteinexpression in % (Bohrnsen et al. 2017). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

Ergebnisse

In den MSC Monolayer-Kulturen wurde über den gesamten Zeitraum der sechstägigen Differenzierung eine kontinuierliche Vimentin-Expression in allen Kulturen festgestellt. Die durchgeführte Quantifizierung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen der mit TGF- β_1 induzierten Gruppe und der Kontrollgruppe (Abbildung 10A). Auch in den MSC Monolayer-Kulturen konnte eine kontinuierliche E-Cadherin-Expression über den gesamten Zeitraum der sechstägigen Differenzierung gezeigt werden (Abbildung 10B).

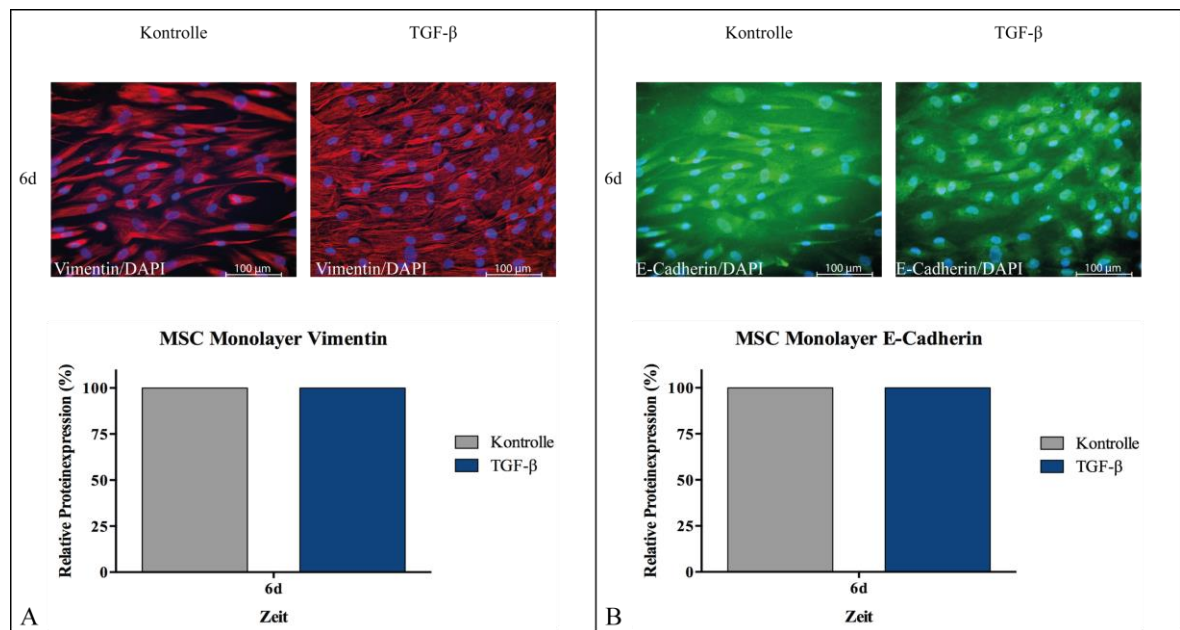


Abbildung 10: IF-Proteinexpression der im Monolayer kultivierten MSC. Vimentin (A) ist mit Alexa Fluor 594 (rot), E-Cadherin (B) ist mit FITC (grün) und die Zellkerne sind mit DAPI (blau) dargestellt. Relative Proteinexpression in % (Bohrnsen et al. 2017). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

3.4.2 Genexpression von Mediatoren der Tumor-Stroma-Interaktion in im Monolayer kultivierten PCI-13 und MSC

In den PCI-13 Monolayer-Kulturen zeigte sich nach sechstägiger Differenzierung mit TGF- β_1 die Expression von MMP-14 signifikant erhöht ($p = 0.01$). Weitere Analysen innerhalb der PCI-13 Monolayer-Kulturen ergaben jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Expression von E-Cadherin, Vimentin, Wnt-3, β -Catenin, Snail1 und Twist (Abbildung 11).

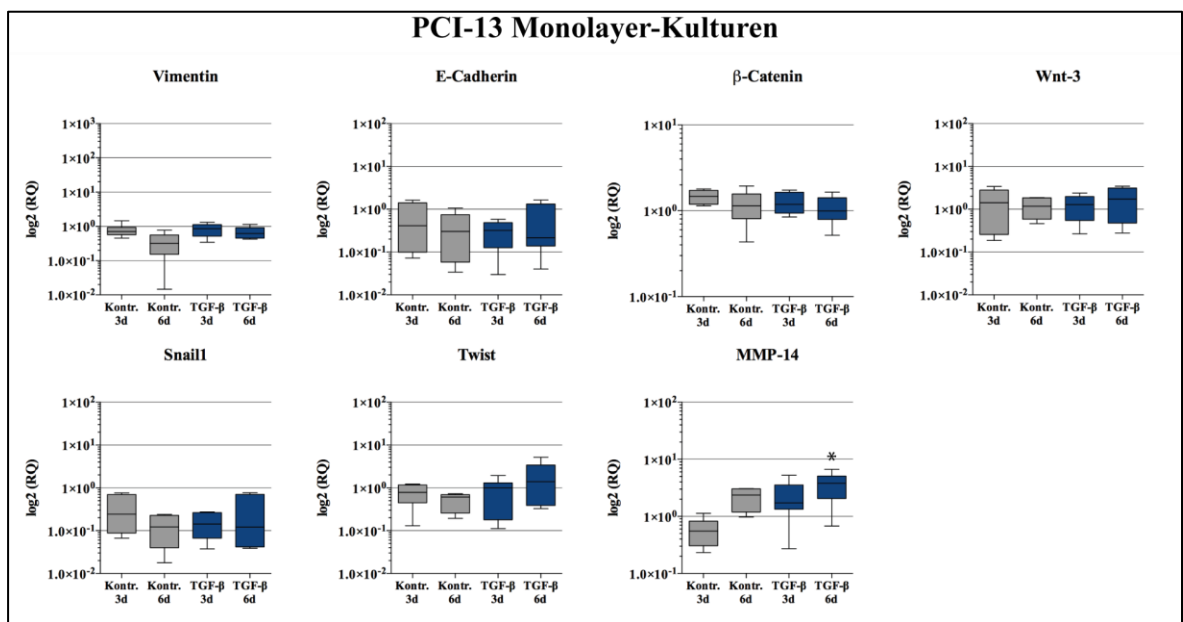


Abbildung 11: qRT-PCR Analyse der im Monolayer kultivierten PCI-13 (* = $p \leq 0.01$) (Bohrnsen et al. 2017). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

Ergebnisse

In den MSC Monolayer-Kulturen zeigte sich eine signifikante Reduzierung der Vimentin-Expression in den mit TGF- β_1 kultivierten Monolayer-Kulturen ($p = 0.04$). Darüber hinaus war die Snail1-Expression in den mit TGF- β_1 kultivierten Kulturen signifikant erhöht ($p = 0.007$). In der Expression von E-Cadherin, Wnt-3, β -Catenin, Snail1, Twist und MMP-14 konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 12).

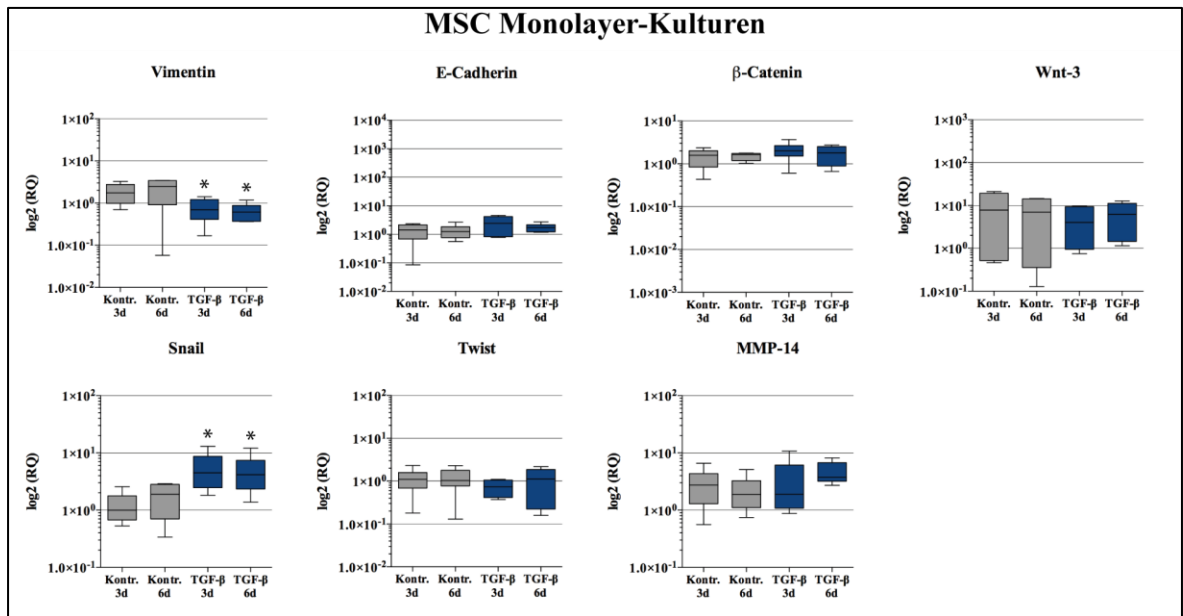


Abbildung 12: qRT-PCR Analyse der im Monolayer kultivierten MSC (* = $p \leq 0.04$) (Bohrnsen et al. 2017). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags..

3.4.3 Proteinanalyse des AKT-Signalwegs, der Apoptose und des Erk-Signalwegs in im Monolayer kultivierten PCI-13 und MSC

In den PCI-13 Monolayer-Kulturen konnten durch die Proteinanalysen am Ende der Beobachtungszeit signifikante Unterschiede in der phosphorylierten Proteinaktivität festgestellt werden. So war die Expression von AKT ($p = 0.006$), S6 ($p = 0.02$), AMPK α ($p = 0.01$), PRAS40 ($p = 0.02$), p70 S6 ($p = 0.049$), Bad ($p = 0.04$) und Erk1/2 ($p = 0.006$) in den mit TGF- β_1 induzierten Tumorzellen signifikant geringer als in der entsprechenden nicht-induzierten Kontrollgruppe (Abbildung 13).

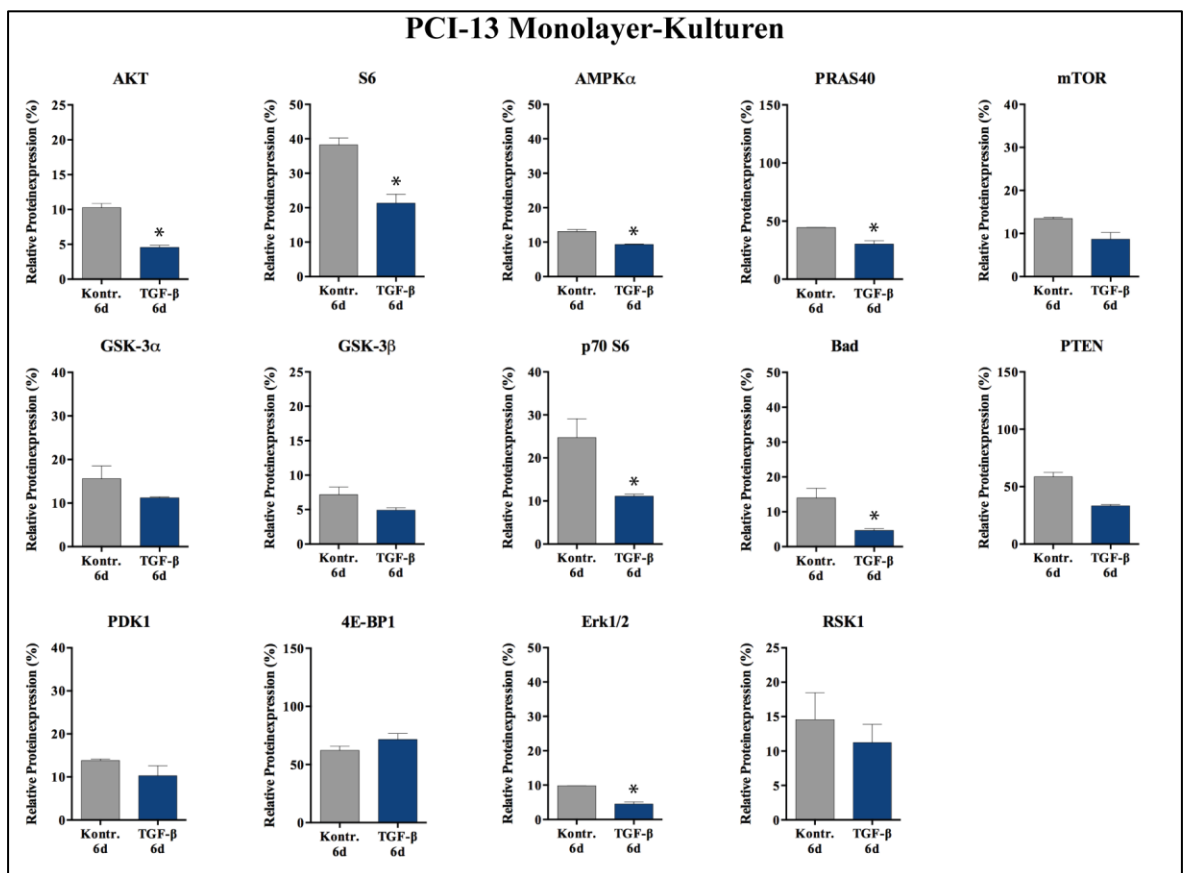


Abbildung 13: Die Proteinlevelanalysen mittels Pathscan der im Monolayer kultivierten PCI-13 (* = $p \leq 0.049$) (Bohrnsen et al. 2017). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

Ergebnisse

In den MSC Monolayer-Kulturen konnten durch die Proteinanalysen ebenfalls am Ende der Beobachtungszeit signifikante Unterschiede in der phosphorylierten Proteinaktivität festgestellt werden. So waren S6 ($p = 0.01$), mTOR ($p = 0.02$) und GSK-3 β ($p = 0.002$) in den mit TGF- β_1 induzierten Kulturen signifikant erhöht. Darüber hinaus konnte in den mit TGF- β_1 induzierten Kulturen eine signifikante Reduzierung der 4E-BP1 Expression gezeigt werden ($p = 0.01$; Abbildung 14).

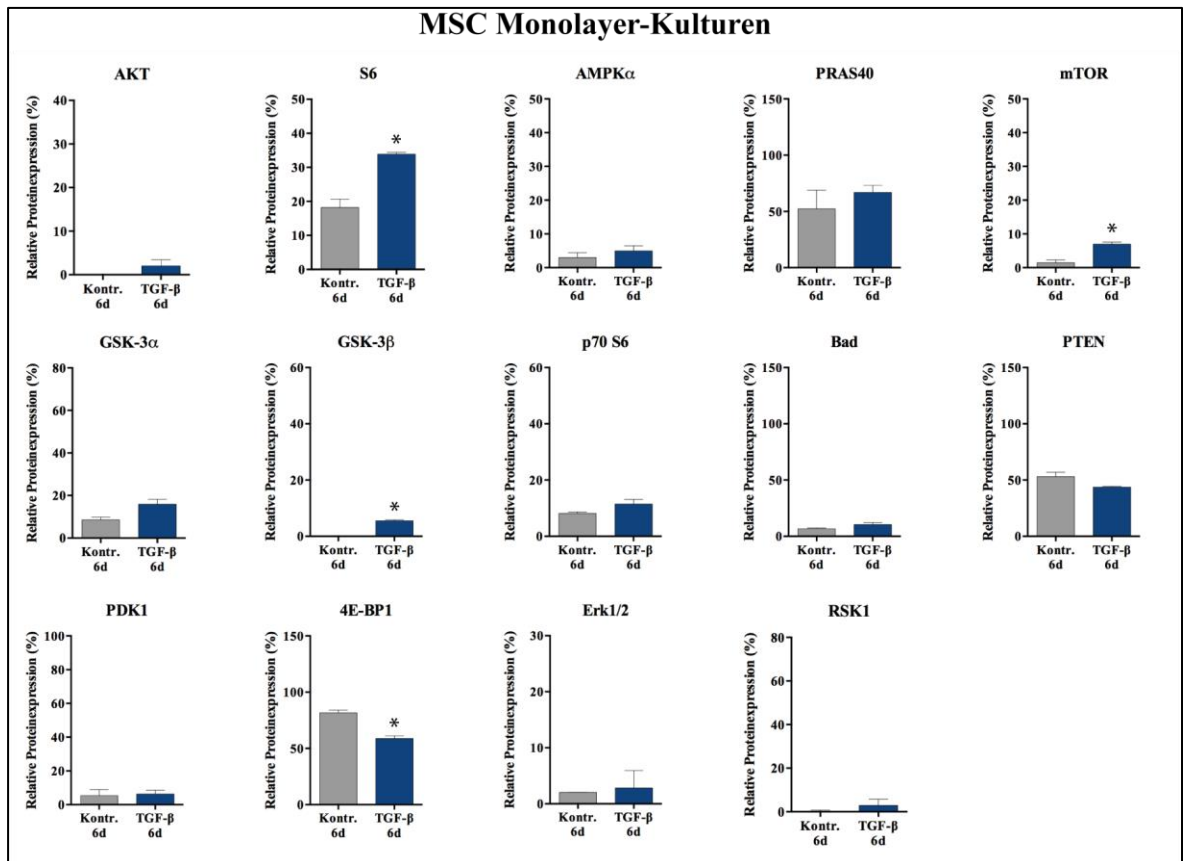


Abbildung 14: Die Proteinlevelanalysen mittels Pathscan der im Monolayer kultivierten MSC (* = $p \leq 0.02$) (Bohrnsen et al. 2017). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

3.5 Ko-Kultur-Differenzierung humaner MSC und PCI-13-Zellen unter Einfluss von TGF- β 1

3.5.1 IF-Proteinexpression von Vimentin und E-Cadherin in ko-kultivierten PCI-13 und MSC

In den PCI-13 Ko-Kulturen wurde über den gesamten Zeitraum der sechstägigen Differenzierung eine kontinuierliche Expression von Vimentin in allen Kulturen festgestellt, dessen Expressionsniveau jedoch im Vergleich zu den Monolayer-Kulturen signifikant geringer war ($p = 0.02$). Eine Induktion der Ko-Kultur mit TGF- β führte zu einer signifikant erhöhten Vimentin-Expression ($p = 0.0001$; Abbildung 15A). In den ko-kultivierten PCI-13 konnte darüber hinaus eine kontinuierliche E-Cadherin-Expression über den gesamten Zeitraum der sechstägigen Differenzierung gezeigt werden. Hier zeigte die durchgeführte Quantifizierung keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichs- und Kontrollgruppen (Abbildung 15B).

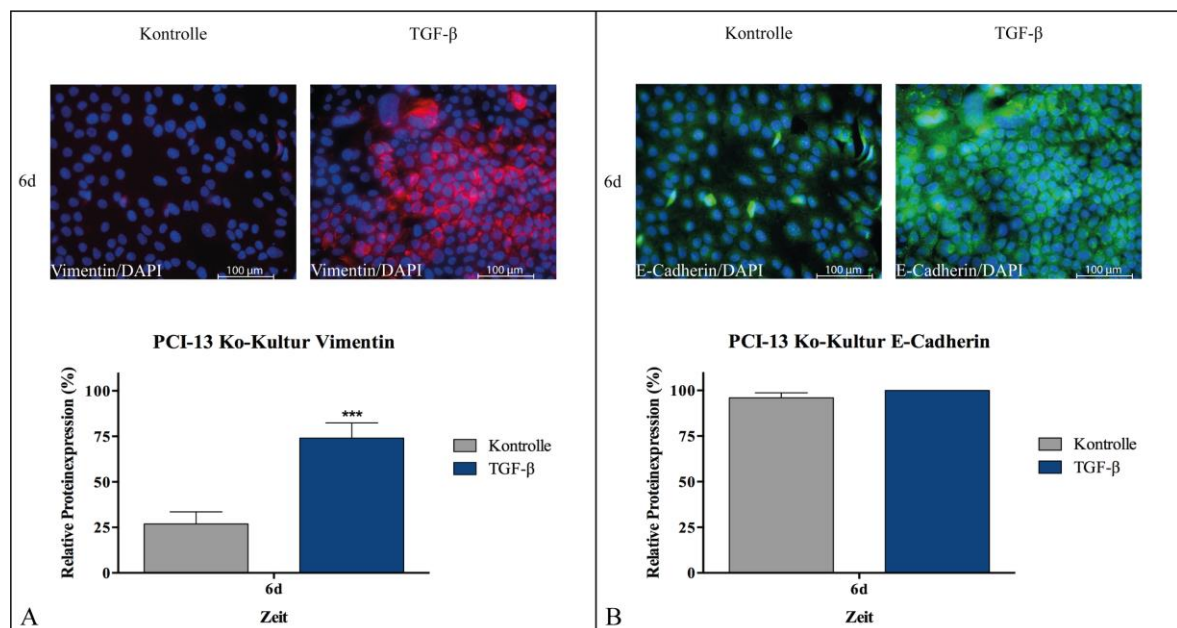


Abbildung 15: IF-Proteinexpression der ko-kultivierten PCI-13. Vimentin (A) ist mit Alexa Fluor 594 (rot), E-Cadherin (B) ist mit FITC (grün) und die Zellkerne sind mit DAPI (blau) dargestellt. Relative Proteinexpression in % (***) = $p \leq 0.0001$ (Bohrnsen et al. 2017). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

Ergebnisse

In den MSC Ko-Kulturen konnte die Expression des mesenchymalen Markers Vimentin (Abbildung 16A) und des epithelialen Markers E-Cadherin (Abbildung 16B) gezeigt werden. Dabei wurde über den gesamten Zeitraum der sechstägigen Differenzierung eine kontinuierliche Expression dieser Marker in allen Kulturen festgestellt. Die durchgeführte Quantifizierung ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den Vergleichs- und Kontrollgruppen. Wie schon in den Monolayer-Kulturen zeigte sich eine vergleichbare Veränderung der MSC-Zellmorphologie.

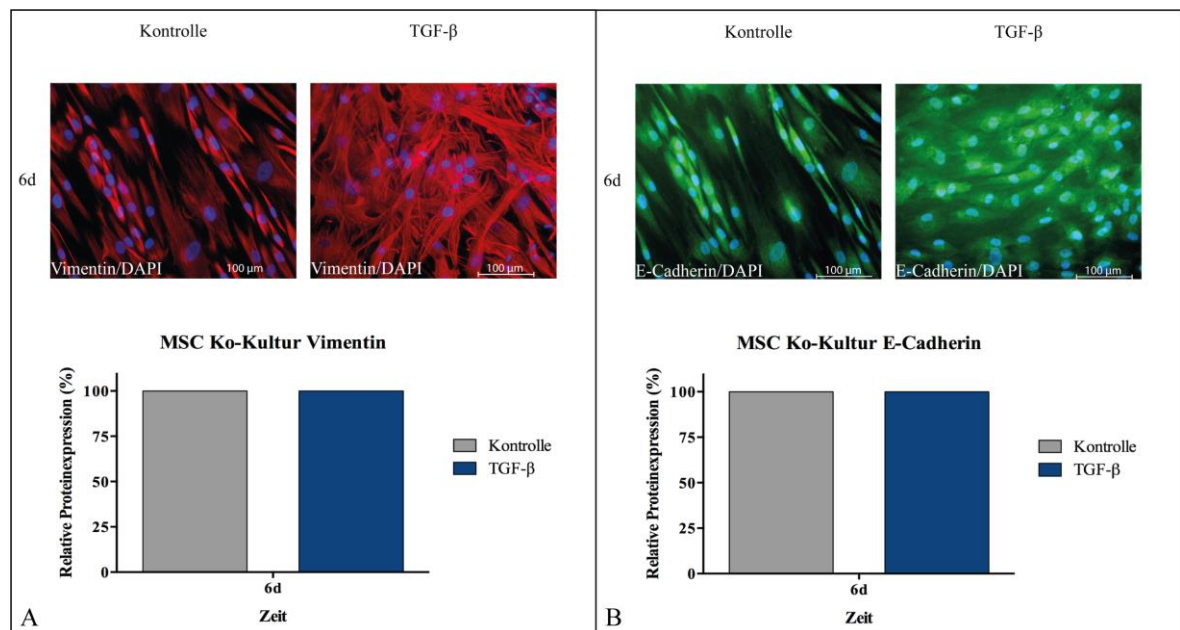


Abbildung 16: IF-Proteinexpression der ko-kultivierten MSC. Vimentin (A) ist mit Alexa Fluor 594 (rot), E-Cadherin (B) ist mit FITC (grün) und die Zellkerne sind mit DAPI (blau) dargestellt. Relative Proteinexpression in % (Bohrnsen et al. 2017). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

3.5.2 Genexpression von Mediatoren der Tumor-Stroma-Interaktion in ko-kultivierten PCI-13 und MSC

In den PCI-13 Ko-Kulturen zeigten die mit TGF- β_1 induzierten Zellen signifikant höhere Expressionen von Vimentin ($p = 0.003$), E-Cadherin ($p = 0.004$) und MMP-14 ($p = 0.002$). Darüber hinaus waren die *Expressionsniveaus* von Snail ($p = 0.01$), Twist ($p = 0.04$) und MMP-14 ($p = 0.003$) unter Ko-Kultur-Bedingungen im Vergleich zu den Monolayer-Kulturen signifikant erhöht. Keine Expressions-Unterschiede wurden bei Wnt-3 und β -Catenin festgestellt (Abbildung 17).

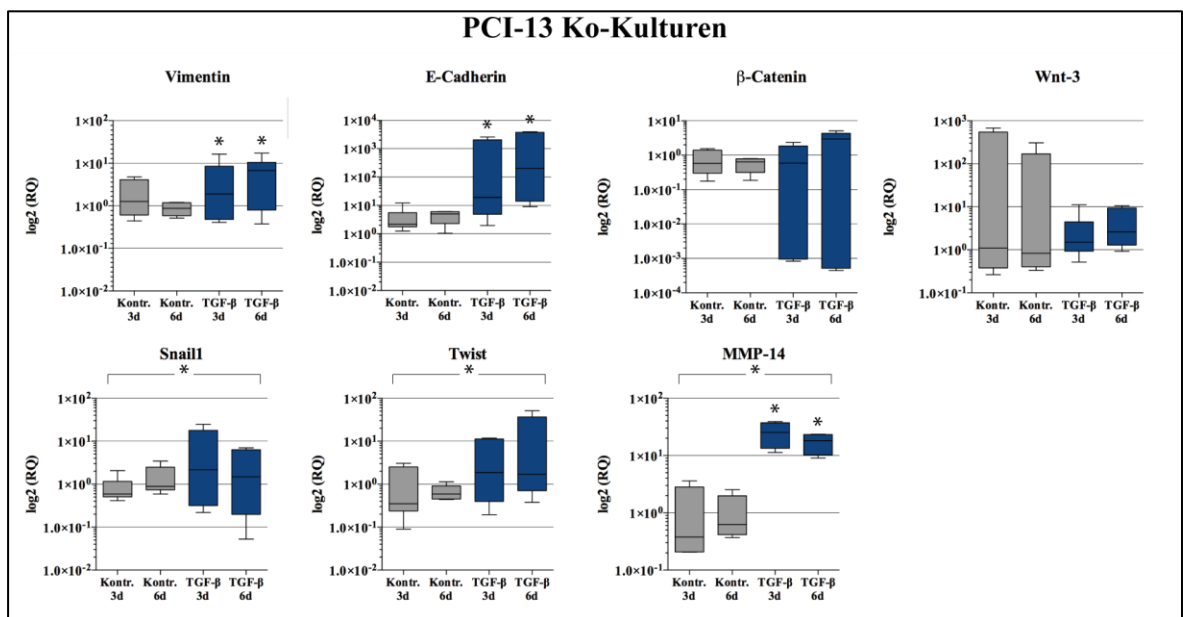


Abbildung 17: qRT-PCR Analyse der ko-kultivierten PCI-13 (*= $p \leq 0.04$) (Bohrnsen et al. 2017). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

Ergebnisse

In den MSC-Ko-Kulturen konnten die Analysen der qRT-PCR eine signifikante Erhöhung der E-Cadherin-Expression in den mit TGF- β_1 induzierten Kulturen zeigen ($p = 0.003$). Darüber hinaus war die Snail1-Expression in den mit TGF- β_1 induzierten Kulturen wie schon in den Monolayer-Kulturen signifikant erhöht ($p = 0.002$). Die in den Monolayer-Kulturen noch beobachtete signifikante Reduzierung von Vimentin ($p = 0.04$) wurde in den Ko-Kulturen nicht länger festgestellt. Ebenso verblieben die Expressionen von Wnt-3, β -Catenin, Twist und MMP-14 ohne signifikante Unterschiede (Abbildung 18).

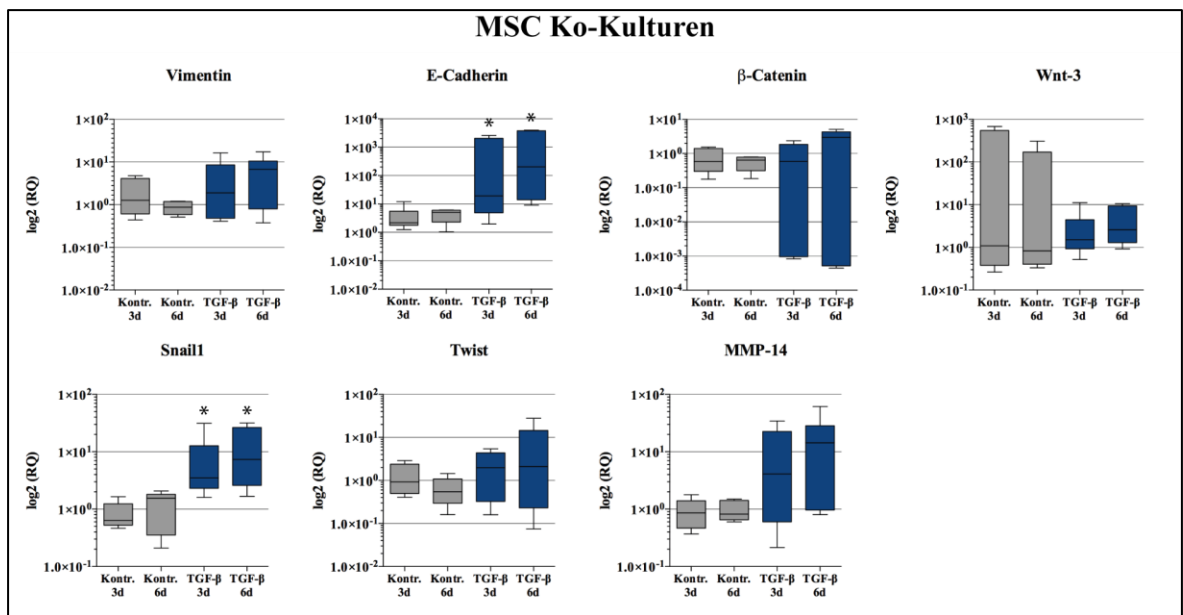


Abbildung 18: qRT-PCR Analyse der ko-kultivierten MSC (*= $p \leq 0.04$) (Bohrnsen et al. 2017). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

3.5.3 Proteinanalyse des AKT-Signalwegs, der Apoptose und des Erk-Signalwegs in ko-kultivierten PCI-13 und MSC

In den PCI-13 Ko-Kulturen zeigten sich die Expressionen von AMPK α ($p = 0.04$), PRAS40 ($p = 0.04$), GSK-3 α ($p = 0.045$) und 4E-BP1 ($p = 0.006$) in den mit TGF- β_1 induzierten Tumorzellen signifikant erhöht. Das *Expressionsniveau* von AMPK α ($p = 0.0001$), GSK-3 α ($p = 0.0003$), Bad ($p = 0.002$), PTEN ($p = 0.002$) und ERK1/2 ($p = 0.006$) war im Vergleich zu den Monolayer-Kulturen in den Ko-Kulturen signifikant höher. Das Expressionsniveau von S6 ($p = 0.02$) war in den Ko-Kulturen signifikant niedriger als in den Monolayer-Kulturen (Abbildung 19).

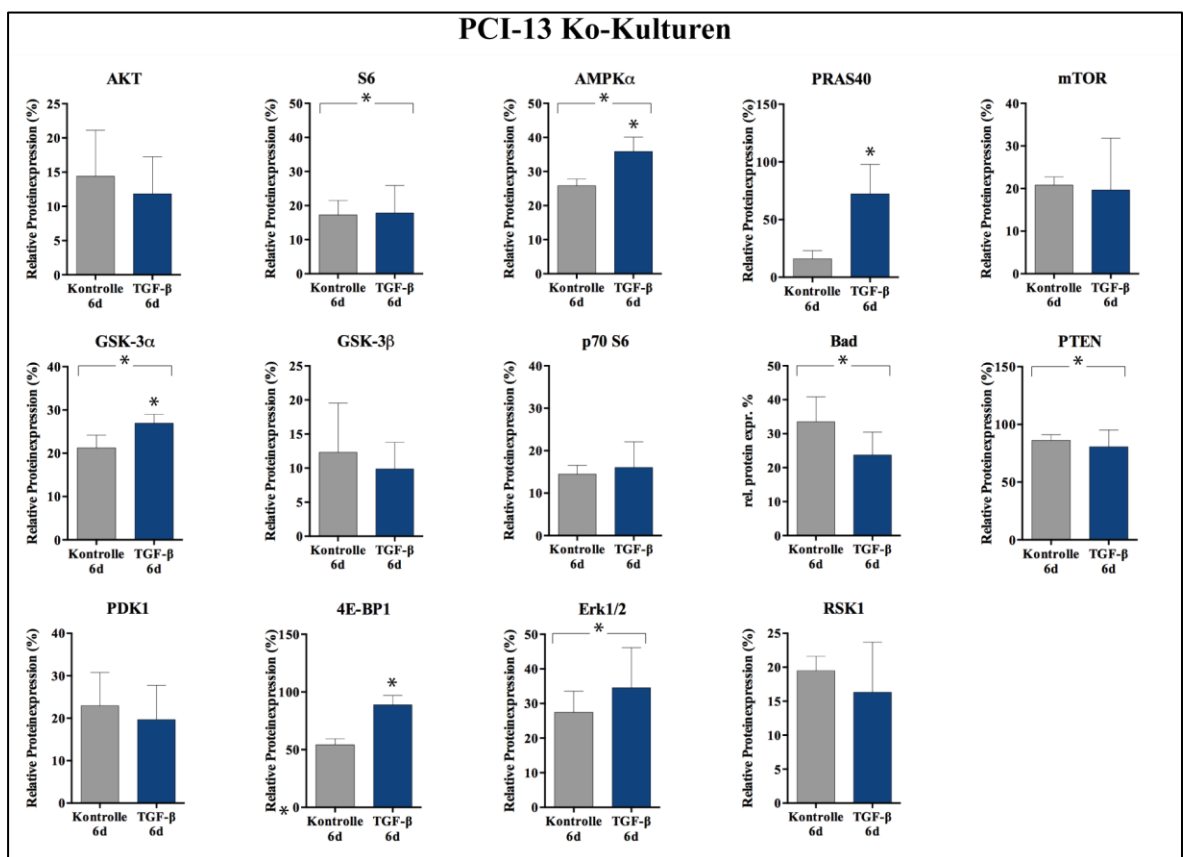


Abbildung 19: Die Proteinlevelanalysen mittels Pathscan der ko-kultivierten PCI-13. Relative Proteinexpression in % (* = $p \leq 0.045$) (Bohrnsen et al. 2017). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

Ergebnisse

In den MSC Ko-Kulturen konnte durch die Proteinanalysen gezeigt werden, dass die Aktivität von PRAS40 ($p = 0.0002$), GSK-3 α ($p = 0.01$) und GSK-3 β ($p = 0.01$) ebenso wie Bad ($p = 0.008$), PDK1 ($p = 0.001$) und 4E-BP1 ($p = 0.0002$) in TGF- β_1 induzierten Ko-Kulturen signifikant erhöht wurden. Auch in den MSC Ko-Kulturen konnten Unterschiede im *Expressionsniveau* beobachtet werden. So war das *Expressionsniveau* in den Ko-Kulturen von AKT ($p = 0.0009$), AMPK α ($p = 0.0006$), mTOR ($p = 0.002$), GSK-3 α ($p = 0.0002$), GSK-3 β ($p = 0.0005$), Bad ($p = 0.0001$), PTEN ($p = 0.0001$), PDK1 ($p = 0.0001$) und RSK1 ($p = 0.01$) im Vergleich zu den Monolayer-Kulturen signifikant höher (Abbildung 20).

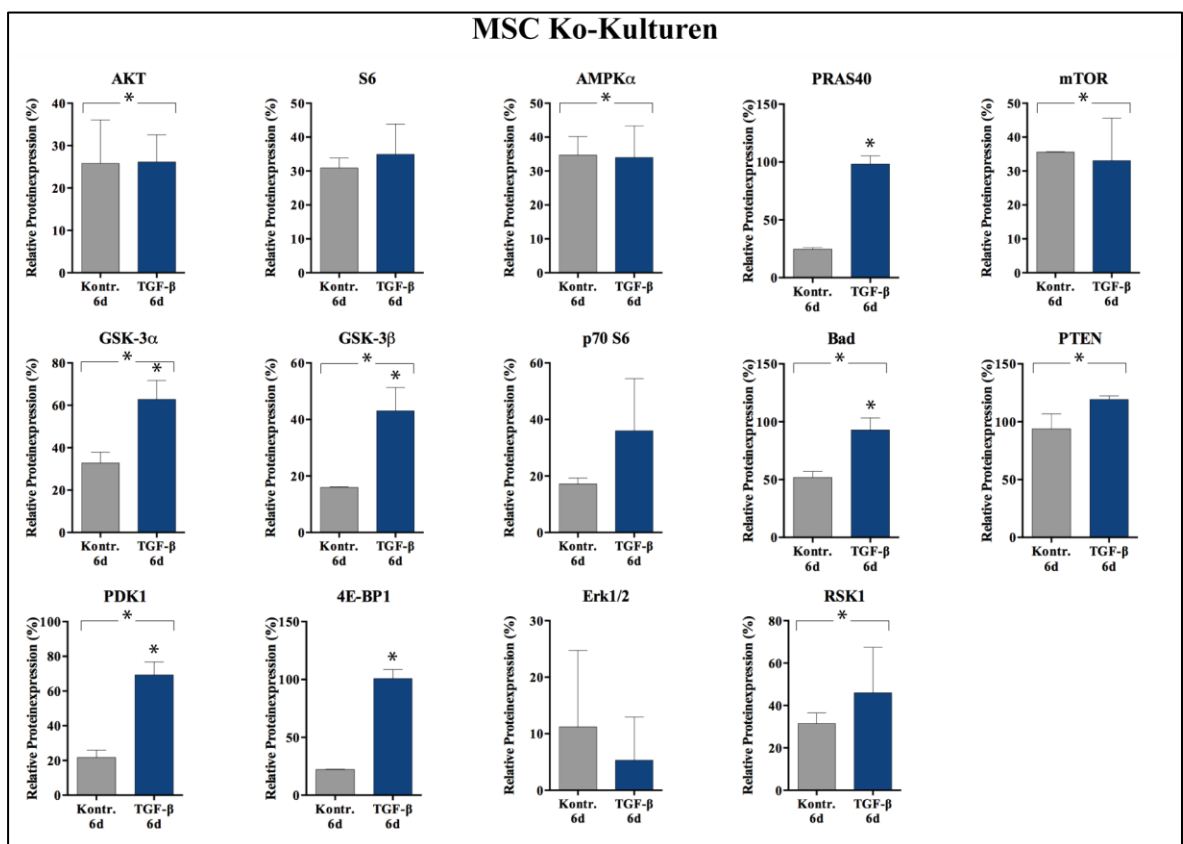


Abbildung 20: Die Proteinlevelanalysen mittels Pathscan der ko-kultivierten MSC. Relative Proteinexpression in % (* = $p \leq 0.01$) (Bohrnsen et al. 2017). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Elsevier-Verlags.

Ergebnisse

Zur besseren Darstellung verdeutlicht Tabelle 29 die unterschiedlichen Protein-Expressionsniveaus. Es werden die ko-kultivierten Zellen im Vergleich zu den Zellen, die im Monolayer kultiviert wurden in Relation gesetzt. Zu erkennen sind hierbei auch Unterschiede zwischen mit TGF- β_1 induzierten und nicht-induzierten Zellen.

Tabelle 29: Proteinlevel-Expressionsniveau der im Monolayer kultivierten Zellen im Vergleich zur Ko-Kultur.

Protein	PCI-13 Kontrolle	PCI-13 TGF- β_1	MSC Kontrolle	MSC TGF- β_1
AKT	=	=	↑	↑
S6	↓	=	↑	=
AMPK α	↑	↑	↑	↑
PRAS40	↓	=	=	↑
mTOR	↑	=	↑	↑
GSK-3 α	=	↑	↑	↑
GSK-3 β	=	↑	↑	↑
P70 S 6	=	=	↑	=
Bad	=	↑	↑	↑
PTEN	↑	↑	=	↑
PDK1	=	=	=	↑
4E-BP1	=	=	↓	=
Erk1/2	=	↑	=	=
RSK1	=	=	↑	=

Legende: =: Keine Unterschiede im Expressionsniveau messbar; ↑: Ko-kultivierte Zellen weisen im Vergleich zu den im Monolayer kultivierten Zellen ein höheres Expressionsniveau auf; ↓: Ko-kultivierte Zellen weisen im Vergleich zu den im Monolayer kultivierten Zellen ein niedrigeres Expressionsniveau auf.

4 Diskussion

4.1 Tumor-Stroma-Interaktionen beeinflussen die Proliferation der PCI-13 Ko-Kulturen

Durch Interaktionen eines Tumors mit der Tumor-Mikroumgebung kann das invasive Potential der Tumorzellen beeinflusst werden (Curry et al. 2014). Die Tumor-Mikroumgebung wird u. a. aus MSC gebildet (Hanahan und Coussens 2012). Interaktionen zwischen MSC und Tumorzellen finden sich oftmals in diesen Bereichen der Tumorproliferationszonen am invasiven Rand des Tumors (Routray et al. 2014). Diese progressiven, interzellulären Aktionen können Einfluss auf die Immunantwort und -reaktion der gesunden Tumorumgebung nehmen und so zur Bildung von Tumorsuppressorzellen und regulatorischen T-Zellen führen (Turley et al. 2015). So kann die Effizienz von Mechanismen der autologen Antitumorabwehr zur Eliminierung neoplastischer Zellen beeinflusst werden (Poggi et al. 2014; Turley et al. 2015). Durch parakrine *Cross-Talk*-Mechanismen, die inter- und intrazelluläre Signalwege modellieren, nehmen MSC Einfluss auf die Tumor- und Stromazellproliferation (Böhrens et al. 2015; Curry et al. 2014) und können pleomorphe Fähigkeiten der Tumorzellen aktivieren (Weinberg 2008). So werden Faktoren wie MMPs sezerniert, die zusätzlich zur Invasivität des Tumors beitragen. Hierdurch kann eine neue, metabolische Umgebung des Tumors geschaffen werden, die den hohen Energie- und anabolen Anforderungen des Tumors entspricht (Paget 1989).

Die Auswirkungen der MSC auf Tumorzellen und deren Progression werden in der Literatur jedoch differenziert beschrieben. Einige Studien berichten, dass durch den Einfluss der MSC die Größe der Tumorzellen zunimmt und die Fähigkeit zur Metastasierung erhöht wird (Luo et al. 2014; Roorda et al. 2010). Andere Quellen wiederum schildern, dass die Tumorzellproliferation durch direkten Zell-Zell-Kontakt, aber auch durch parakrine Signalwege reduziert werden kann (Böhrens et al. 2015; Chao et al. 2012; Kucerova et al. 2013).

Im Tumor-Stroma finden sich neben mesenchymalen Stromazellen auch Fibroblasten, vaskuläre Endothelzellen, Immunzellen und die extrazelluläre Matrix (Hanahan und Coussens 2012). Eine besondere Stellung in der Tumormikroumgebung nehmen Tumor assoziierte Fibroblasten oder *Cancer associated Fibroblasts* (CAF) ein (Bhome et al. 2015). Sie sind aktive Teilnehmer im Prozess der Tumorentstehung, da sie

Wachstum und Metastasierung der Tumorzellen fördern (Wheeler et al. 2014). Obwohl die Mehrzahl der CAF im Tumor-Stroma von stromalen Fibroblasten abstammen, stammt auch ein signifikanter Anteil der CAF in Tumoren von MSC aus dem Knochenmark ab (Chan et al. 2019). Durch die Sekretion von Zytokinen wie z. B. TGF- β können CAF pro-tumoröse Signale senden, die dann durch Stimulierung der Tumorzellproliferation und Angiogenese sowie Metastasenbildung durch die Verstärkung des Migrations- und Invasivitätspotentials der Tumorzellen zu einem erhöhten Tumorwachstum führen (Leef und Thomas 2013).

4.1.1 Die Ko-Kultur zwischen PCI-13 und MSC ohne TGF- β verringert die Proliferation der PCI-13

In dieser Studie war die Proliferation der ko-kultivierten, nicht-induzierten PCI-13 signifikant verringert. Hier scheinen die MSC ohne den Einfluss von TGF- β_1 in der Ko-Kultur einen suppressiven Einfluss auf die Proliferation der Tumorzellen zu nehmen. Dieses ist vergleichbar mit Ergebnissen, in denen die parakrinen Einflüsse von MSC in der Lage waren, eine Tumorzellproliferation zu reduzieren (Böhrens et al. 2015; Poggi et al. 2014; Turley et al. 2015). Die Induktion mit dem Zytokin TGF- β_1 hob den suppressiven Einfluss der Ko-Kultur auf die Proliferation der PCI-13 jedoch wieder auf. Insbesondere durch Chemokine und Wachstumsfaktoren werden die Tumor-Stroma-Interaktionen und die zelluläre Kommunikation beeinflusst. Als Wachstumsfaktor reguliert TGF- β_1 abhängig von Zelltyp und Wirkdauer Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose (Oshimori und Fuchs 2012). Je nach zellulärem Kontext kann TGF- β_1 als Tumorsuppressor aber auch als Tumorpromotor fungieren (Massague 2012). So kann es in physiologischen Epithelzellen hemmend auf Zellproliferation, Differenzierung und Motilität wirken und eine Apoptose fördern (Leef und Thomas 2013; Massague 2012). In Karzinomen jedoch wirkt die vermehrte Sezernierung von TGF- β tumorproliferativ (Molinolo et al. 2009), indem Invasivität und Metastasierung gefördert werden (Nagaraj und Datta 2010).

4.2 **TGF- β -Einfluss auf die Expression wichtiger EMT-Marker**

Ein Schlüsselereignis während der Tumorprogression ist die Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT), bei der epitheliale Zellen mesenchymale Eigenschaften gewinnen (Kalluri und Weinberg 2009). Zu diesen Eigenschaften gehören eine gesteigerte Motilität, eine veränderte Zelladhäsion und die Fähigkeit, die extrazelluläre Matrix zu modellieren (Curry et al. 2014). Durch die EMT gewinnen Zellen eine gesteigerte

Migrationsfähigkeit, eine verstärkte Invasivität und eine erhöhte Apoptose-Resistenz (Kalluri und Neilson 2003). Am invasiven Rand eines Tumors versuchen Tumorzellen, zelluläre und biochemische Regulationsmechanismen zu überwinden, die sie an einer weiteren Proliferation hindern (Poggi et al. 2014; Turley et al. 2015). Der mehrstufige Prozess der Invasion und Metastasierung wird häufig als Invasions-Metastasierungs-Kaskade bezeichnet (Fidler 2003; Talmadge und Fidler 2010): Es kommt zu einer Abfolge zellbiologischer Veränderungen, beginnend mit einem lokalen invasiven Wachstum und einer Intravasation von Tumorzellen in nahegelegene Blut- und Lymphgefäße. Im Rahmen der EMT verlieren Tumorzellen ihre interzellulären Verbindungen. So wird ein Transport einzelner, sich vom Haupttumor gelöster Tumorzellen durch das lymphatische und hämatogene System möglich. Gefolgt von einem Entweichen der Tumorzellen aus dem Lumen solcher Gefäße in das Parenchym von entfernten Geweben (Extravasation), erlangen die Tumorzellen durch den zur EMT reversen Prozess der Mesenchymalen-Epithelien-Transition (MET) an dieser Stelle ihren epithelialen Phänotyp zurück, bilden erneut feste Zell-Zell-Verbindungen aus und schränken ihre Beweglichkeit somit wieder ein. Durch die Bildung kleiner Gruppen von Tumorzellen (Mikrometastasen) und schließlich das Wachstum mikrometastatischer Läsionen zu makroskopischen Tumoren entsteht im Folgenden ein sekundärer Tumor (Gupta und Massague 2006). Signalwege und regulatorische Elemente der EMT sind aktueller Gegenstand der Untersuchungen (Nieto 2011). So konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung des EMT-Programms einen kritischen Mechanismus für die Etablierung eines malignen Phänotyps epithelialer Karzinome darstellt und dieser durch proliferative und apoptotische Signalwege sowie Kaskaden beeinflusst wird (Böhrnsen et al. 2015).

Verschiedene Signalmoleküle und Zytokine wie TGF- β_1 (Yingling et al. 2004) beeinflussen diesen beschriebenen Metastasierungsprozess (Lamouille et al. 2014). Bei TGF- β_1 handelt es sich um einen Wachstumsfaktor, der je nach Zelltyp und Wirkdauer spezifische zelluläre Effekte wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose reguliert (Oshimori und Fuchs 2012). Hierbei kann TGF- β_1 sowohl als Tumorsuppressor, als auch als Tumorpromotor agieren (Massague 2012).

4.2.1 TGF- β -Induktion nimmt einen progressiven Einfluss auf die EMT

Wie die Ergebnisse der IF-Proteinanalysen und der qRT-PCR zeigen, führte die Induktion mit TGF- β_1 in den PCI-13 Ko-Kulturen zu einem Anstieg der Vimentin-Expression. Für E-Cadherin konnte zwar in den IF-Analysen keine Expressionsunterschiede

beobachtet werden, die qRT-PCR-Analysen zeigten jedoch einen signifikanten Anstieg der E-Cadherin-Expression in den mit TGF- β_1 induzierten PCI-13- und MSC-Ko-Kulturen. Vimentin ist ein klassischer mesenchymaler Marker und E-Cadherin ein Marker für zelluläre Verbindungen (Satelli und Li 2011; van Roy 2014). In Tumorzellen sind ein Verlust von E-Cadherin und ein Anstieg von Vimentin die klassischen Marker der EMT (Eriksson et al. 2009; Zeisberg und Neilson 2009). In primären PEK-Tumoren wird eine geringe E-Cadherin-Expression und eine hohe Vimentin-Expression mit einem Anstieg ferner Metastasen assoziiert (Nijkamp et al. 2011). Eine Reduktion der E-Cadherin-Expression ist häufig assoziiert mit einer schlechten klinischen Prognose bei Patienten mit Kopf-Hals-Tumoren (Xing et al. 2013). Obwohl eher ein Verlust von E-Cadherin eine beginnende EMT nahelegt, ist seine Expression heterogen und kann sich in verschiedenen Teilen desselben Tumors unterscheiden (Casarsa et al. 2011; Hung et al. 2006; Smith et al. 2013). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass viele invasive und metastasierende Tumoren ein hohes Maß der E-Cadherin-Expression beibehalten (Christiansen und Rajasekaran 2006). So hemmt die Überexpression von E-Cadherin in der humanen Brustkrebszelllinie MDA-MB-435 die Zellmotilität und die invasive Kapazität nicht signifikant (Nieman et al. 1999). In ähnlicher Weise korreliert die hohe Expression von E-Cadherin positiv mit dem invasiven Wachstum und der Infiltration von Prostatakrebszellen (Putzke et al. 2011). Zudem zeigen Studien, dass die verstärkte Motilität und Invasion in Tumoren mit hoher E-Cadherin-Expression auf der Ko-Expression anderer Cadherine wie P-Cadherin (Ribeiro et al. 2013) und N-Cadherin (Hazan et al. 2000) beruht. So fördert die Überexpression von N-Cadherin oder P-Cadherin die Motilität und Invasion von Tumorzellen unabhängig der E-Cadherin-Expression (Ribeiro et al. 2013).

Wiederum war die Ko-Kultur aus PCI-13 und MSC ohne TGF- β_1 Einfluss in der Lage, einen eher EMT-hemmenden Einfluss zu nehmen, indem die Expression von Vimentin und E-Cadherin unverändert blieb. Die Induktion mit TGF- β_1 hob diesen Effekt jedoch auf und führte zu einer eher EMT-progressiven Wirkung, in dem die Expression der wichtigen EMT Marker Vimentin und E-Cadherin angehoben wurde. Die Abnahme der Vimentin-Expression in den MSC Monolayer-Kulturen unterstreicht den EMT-fördernden Einfluss der TGF- β_1 -Induktion. In PEK kann TGF- β_1 eine EMT fördern, indem die Transformation zu einem mesenchymalen Phänotyp und darüber hinaus die Expression von EMT-assoziierten Proteinen wie Snail1 und Twist gefördert werden (Massague 2012).

Snail1 und Twist beeinflussen E-Cadherin und Vimentin, indem Snail1 die Überexpression mesenchymaler Marker und die Suppression epithelialer Marker wie neben

E-Cadherin auch u. a. Claudine, Okkludine und Zytokeratine fördert (Zeisberg und Neilson 2009). Snail1 ist ein Transkriptionsfaktor, der in frühen Phasen einer EMT induziert wird (Sanchez-Tillo et al. 2012). Dabei werden Snail und Twist jedoch nur in 35 % der HNSCC und in 40 % des umgebenden Stromas exprimiert (Smith et al. 2013). In den Primärtumoren von PEK-Patienten korreliert die Snail1-Expression stark mit Metastasen und einer verschlechterten klinischen Prognose. Darüber hinaus geht die Snail1-Expression mit einem verstärkten histologischen *Grading* und einer starken Invasivität einher (Hayry et al. 2010), was zu einer niedrigeren Differenzierung des Tumors, lymphovaskulär-invasivem Wachstum und regionalen Metastasen führt (Mendelsohn et al. 2012). In MSC ist Snail1 für die Aufrechterhaltung eines undifferenzierten Zustands erforderlich, was ebenfalls durch TGF- β_1 gefördert werden kann (Batlle R et al. 2013). Die Induktion mit TGF- β_1 führte sowohl in den MSC-Monolayer-, als auch in MSC Ko-Kulturen zu einem Anstieg der Snail1-Expression. Darüber hinaus zeigten die Analysen der qRT-PCR ein signifikant höheres Expressionsniveau von Snail1 in den PCI-13 Ko-Kulturen im Vergleich zu den Monolayer-Kulturen. In den MSC verstärkt TGF- β_1 die Aufrechterhaltung eines undifferenzierten Zustands und wirkt damit tumorprogressiv auf das reine Tumor-Stroma (Batlle R et al. 2013). In Ko-Kultur mit PCI-13 konnte dieser Effekt wiederum aufgehoben werden. Das höhere Expressionsniveau von Snail1 in den PCI-13 Ko-Kulturen spricht für einen Progressionsbeginn innerhalb der ko-kultivierten Zellen. Dieser scheint jedoch durch den Einfluss der MSC auf die PCI-13 eingegrenzt zu werden.

Neben Snail1 gilt Twist als einer der wesentlichen Transkriptionsfaktoren, die eine EMT aktivieren können. Dieses geschieht entweder durch eine E-Cadherin-Suppression oder eine Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren wie Snail (Batlle E et al. 2000; Sanchez-Tillo et al. 2012). Unter physiologischen Bedingungen wird Twist nicht exprimiert. Es konnte jedoch eine starke Korrelation zwischen der Reaktivierung von Twist und sowohl dem Fortschreiten als auch der Malignität von Tumoren festgestellt werden (Xue und Hemmings 2012). Twist wird vermehrt in Tumormetastasen exprimiert (Zeisberg und Neilson 2009), wobei eine Reduktion der Expression von Twist mit Hemmung der Invasivität oraler PEK *in vitro* assoziiert wird (da Silva et al. 2014). So korreliert bei PEK-Patienten die Twist-Expression u. a. auch mit Lymphknotenmetastasen (Ou et al. 2008). Die Ko-Kultur zwischen PCI-13 und MSC führte in den Tumorzellen zu einem erhöhten Expressionsniveau von Twist im Vergleich zu den Monolayer-Kulturen. Wiederum könnte dieser Anstieg auf einen Progressionsbeginn innerhalb der ko-kultivierten Zellen hindeuten, der jedoch durch den hemmenden Einfluss der MSC auf die PCI-13 wie bei

Snail1 noch zurückgehalten wird. Im Rahmen einer unter vermehrter Snail1 und Twist Expression fortschreitenden EMT, kommt es zu einer zunehmenden Desintegration, Motilität und Auflösung der interzellulären Adhäsion u. a. durch Matrix-Metalloproteinasen. So könnte Twist auch zu den beobachteten Veränderungen der MMP-14-Expression beigetragen haben.

4.2.2 TGF- β -Induktion führt zu Veränderung der MMP-14-Expression

Bereits 1995 konnte die Expression von MMP-14 in PEK als eine der ersten Tumorentitäten gezeigt werden (Okada et al. 1995). Insgesamt ist in 75-100 % aller PEK MMP-14 nachweisbar (Birkedal-Hansen et al. 2000; Kurahara et al. 1999). Zusätzlich ist MMP-14 als ein Mitglied der membranständigen MMP-Familie in der Lage, MMP-2 zu aktivieren und so den Abbau der extrazellulären Matrix während der EMT zu fördern (Radisky und Radisky 2010). MMP-14 beeinflusst die Tumorinvasivität und Metastasierung entscheidend, in dem es das Durchtreten der Tumorzellen durch die Basalmembran indiziert (Jacob und Prekeris 2015). So korreliert ein höheres Niveau der MMP-14-Expression mit entfernten Metastasen und einer kürzeren Patienten-Überlebenszeit (Wang et al. 2014). Sowohl in den PCI-13, als auch in den MSC wurde die Expression von MMP-14 nachgewiesen. Sowohl in PCI-13 Monolayer-, als auch in PCI-13 Ko-Kulturen führte die Induktion mit TGF- β_1 zu signifikanten Anstiegen der MMP-14-Expression. Diese durch TGF- β_1 ausgelösten Expressionsanstiege können als Anzeichen für eine mögliche gesteigerte Invasivität und einer Korrelation zur Malignität angesehen werden (Jacob und Prekeris 2015).

4.3 **Veränderung von Wnt-, AKT-, Erk- und mTOR-Signalwegen in MSC- und PCI Ko-Kulturen**

4.3.1 Wnt-Signalweg in PCI-13 und MSC

Der kanonische Wnt-Weg beginnt mit dem Empfang von Signalmolekülen auf der Zellmembran. Bei aktivem Wnt-Signal wird GSK-3 β zu einer inaktiven Form phosphoryliert. Als Folge hiervon wird funktionelles β -Catenin im Cytosol akkumuliert und dann weiter in den Zellkern transportiert. Hier bindet es an die Promotorregion eines Zielgens wie z. B. Snail1 und aktiviert dessen Transkription (Easwaran et al. 1999; ten Berge et al. 2008). Zwischen dem Wnt- und TGF- β -Signalweg gibt es in vielen Bereichen Überschneidungen, die eine EMT fördern können (Zhang et al. 2016). So kann unter

TGF- β -Stimulation der WNT-Signalweg durch *Small mothers against decapentaplegic* (SMAD) unabhängige Signalwege aktiviert werden. In humanen Lungen-Fibroblasten inaktiviert TGF- β_1 das GSK-3 β , indem es ERK phosphoryliert (Caraci et al. 2008). GSK-3 β wiederum beeinflusst den TGF- β -Signalweg durch SMAD3-Phosphorylierung und löst seinen Abbau bei fehlendem intrazellulärem TGF- β Signal aus (Guo X et al. 2008).

Die Expression von Wnt-3 und β -Catenin als wichtige Marker des WNT-Signalweges zeigte sich in den vorliegenden Untersuchungen unverändert und konnte somit auch keinen Einfluss auf nachgeschaltete Ziele wie Snail1 nehmen. Auch wenn in vielen Tumorarten abnormale Aktivierungen bzw. Mutationen im kanonischen Wnt- β -Catenin-Signalweg nachgewiesen wurden (Zhou und Hung 2005), hatte weder die verwendete Kultivierungsmethode, noch die Induktion mit TGF- β_1 einen Einfluss auf den Wnt-Signalweg. Neben dem Wnt-Signalweg sind aber auch noch andere Signalwege wie die AKT-, Erk- und mTOR-Signalwege während der Tumorprogression relevant.

4.3.2 AKT-Signalweg wird durch TGF- β_1 -Induktion und Ko-Kultivierung in PCI-13 und MSC aktiviert

Eine Aktivierung des PI3K-AKT-Signalwegs wurde in Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs festgestellt (Engelman et al. 2006), erhöht das Überleben von Tumorzellen *in vitro* (Kim et al. 2005) und wird mit der Induktion einer EMT in Verbindung gebracht (Bruzzeze et al. 2011). Darüber hinaus werden Veränderungen dieses Signalwegs mit einer Tumorprogression und einem kürzeren Gesamtüberleben von Patienten mit PEK assoziiert (Kovacina et al. 2003; Theocharis et al. 2014; Wiza et al. 2012). So zeigten sich in den mit TGF- β_1 induzierten PCI-13 Monolayer-Kulturen signifikante Abnahmen der Expressionen von AKT, AMPK α und Bad. In den PCI-13 Ko-Kulturen führte die Induktion mit TGF- β_1 jedoch zu einer erhöhten Expression von AMPK α , GSK-3 α . Die TGF- β_1 -Induktion führte sowohl in den MSC Monolayer-Kulturen als auch in den MSC Ko-Kulturen dazu, dass GSK-3 β erhöht wurde. Darüber hinaus zeigte sich in den MSC Ko-Kulturen die Expression von GSK-3 α , Bad sowie PDK1 signifikant erhöht. In phosphorylierter Form konnte AKT in PEK des Kopf-Hals-Bereichs nachgewiesen werden (Brazil und Hemmings 2001; Engelman et al. 2006; Stegeman et al. 2012). Das Protein Bad ist als pro-apoptisches Mitglied der Bcl-2 Gen-Familie in die Initiierung einer Apoptose involviert (Adachi und Imai 2002). Über die Bedeutung von AMPK α in PEK ist aktuell Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Den Energiehaushalt der Zellen regulierend, sind Untereinheiten von AMPK α in verschiedenen Tumoren vermehrt exprimiert (Monteverde et al. 2015). Die

Phosphorylierung von Bad inhibiert seine Funktionen und fördert so das Zell-Überleben (Cross et al. 1995; Manning und Cantley 2007). Die Phosphorylierung von GSK-3 fördert das Zell-Überleben, indem es die eigenen Funktionen inhibiert (Cross et al. 1995; Manning und Cantley 2007). PDK1 aktiviert AKT und fördert damit eine Tumorprogression (Brazil und Hemmings 2001). Auch die höheren Expressionsniveaus in den PCI-13 Ko-Kulturen von AMPK α , GSK-3 α , Bad, PTEN ($p = 0.006$) deuten ebenfalls darauf hin, dass es zu vermehrten Aktivitäten im AKT-Signalweg kommt. Die höheren Expressionsniveaus in den MSC Ko-Kulturen von AKT, AMPK α , GSK-3 α/β , Bad, PTEN und PDK1 unterstreichen diese Annahme.

4.3.3 Erk-Signalweg wird durch TGF- β_1 -Induktion und Ko-Kultivierung in PCI-13 und MSC beeinflusst

Die Erk-Kaskade wird im Rahmen einer gegenseitigen Regulation des AKT-Signalwegs als ein entscheidender Regulator der Zellmotilität angesehen. Neben der Zellmotilität spielt der ERK-Signalweg auch eine entscheidende Rolle bei der Regulation verschiedener Zellfunktionen wie Zellproliferation, -differenzierung und -überleben als Reaktion auf extrazelluläre Signale (Johnson und Lapadat 2002; Nishida und Gotoh 1993). Erk1/2 ist direkt mit der Induktion von Zellproliferation und einer onkogenen Transformation assoziiert (Kyriakis et al. 1992; Pages et al. 1993; Sun H et al. 1993). So wird zum Beispiel die RSK1 durch Erk1/2 aktiviert (Cargnello und Roux 2011; Roux und Blenis 2004). Diese phosphoryliert unter anderem das ribosomale Protein S6 und fördert somit Zellwachstum und Proliferation. Die mit TGF- β_1 induzierten PCI-13 Monolayer-Kulturen zeigten jedoch signifikante Abnahmen der Expressionen von Erk1/2 und S6. Die TGF- β_1 -Induktion der MSC Monolayer-Kulturen führte dazu, dass S6 erhöht wurden. Die höheren Expressionsniveaus von Erk 1/2 ($p = 0.006$) in den PCI-13 Ko-Kulturen und die höheren Expressionsniveaus von RSK1 in den MSC Ko-Kulturen deuten wiederum ähnlich zum AKT-Signalweg darauf hin, dass es durch TGF- β_1 -Induktion und Ko-Kultivierung zu einem Beginn in der Aktivität der Erk-Kaskade kommt.

4.3.4 mTOR-Signalweg in PCI-13 und MSC

Der mTOR-Signalweg reguliert Zellwachstums, Zellproliferation und Zellmetabolismus (Laplane und Sabatini 2012). Dabei ist mTOR eine Kernkomponente der zwei makromolekularen Komplexe mTORC 1 und mTORC 2 (Wullschleger et al. 2006). Veränderungen der mTOR-Expression wurden mit einer Tumorprogression und einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit von 126 PEK-Patienten in Verbindung gebracht (Wiza et al.

2012). Insbesondere die Verbindungen zwischen mTOR und AKT-Signalwegen machen die Interkonnektivität und Komplexität der Tumor-Stroma-Interaktionen deutlich. Indem PRAS40 den AKT- und den mTOR-vermittelten-Signalweg verbindet, reguliert es zelluläres Wachstum und den zellulären Metabolismus. So geht eine verringerte Thr246-Phosphorylierung mit einer erhöhten Empfindlichkeit der Zellen auf proapoptische Stimuli einher (Madhunapantula et al. 2007). Das AKT-Signal stimuliert mTORC1, die p70 S6 Kinase zu aktivieren (Lapante und Sabatini 2012). 4E-BP1 ist bei seiner Überexpression in der Lage, die Zellgröße zu verringern, den Zellzyklus zu hemmen und die Tumorphogenität zu unterdrücken (Avdulov et al. 2004; Fingar et al. 2002; Fingar et al. 2004; Lynch et al. 2004). Die mit TGF- β_1 induzierten PCI-13 Monolayer-Kulturen zeigten signifikante Abnahmen der Expressionen von PRAS40 und p70 S6. In den PCI-13 Ko-Kulturen führte die Induktion mit TGF- β_1 jedoch zu einer erhöhten Expression von PRAS40 und 4E-BP1. Die TGF- β_1 -Induktion der MSC Monolayer-Kulturen führte dazu, dass mTOR erhöht wurde. In den MSC Ko-Kulturen war die Expression von PRAS40 und 4E-BP1 signifikant erhöht. Wie schon im AKT- und im Erk-Signalweg, deutet auch das höhere Expressionsniveaus von mTOR in den PCI-13 Ko-Kulturen darauf hin, dass es durch TGF- β_1 -Induktion und Ko-Kultivierung zu einem Beginn in der Aktivität des mTOR-Signalweges kommt.

4.4 Fazit

Aus den vorliegenden Untersuchungen lassen sich abschließend folgende Resultate beschreiben:

MSC scheinen in Ko-Kultur mit PCI-13 einen suppressiven Einfluss auf die Proliferation der Tumorzellen zu nehmen. Die Induktion mit dem Zytokin TGF- β_1 hebt diesen suppressiven Einfluss der Ko-Kultur auf die Proliferation der PCI-13 jedoch wieder auf.

Die Induktion mit TGF- β_1 führte zu einer EMT-progressiveren Wirkung, in dem der Wachstumsfaktor einen direkten Einfluss auf die Expression wichtiger EMT-Marker wie Vimentin, E-Cadherin, Snail1 und Twist nimmt.

Die Analyse der AKT-, Erk- und mTOR-Signalwege zeigt eine progressive Aktivierung dieser Signalwege durch TGF- β_1 . So scheint der AKT-Signalweg durch TGF- β_1 -Induktion und Ko-Kultivierung in PCI-13 und MSC aktiviert zu werden, was in den vorliegenden Untersuchungen u. a. zu einem Beginn des Erk- und mTOR-Signalwegs führen kann.

5 Zusammenfassung

Tumoren des Kopf-Hals-Bereichs gehören mit weltweit jährlich mehr als 500.000 Neuerkrankungen zu den zehn häufigsten Tumoren, wobei es sich bei mehr als 9 von 10 Tumoren um PEK handelt. Beeinflusst wird das invasive Potential eines Tumors u. a. durch Interaktionen mit der Tumormikroumgebung, die u. a. auch aus mesenchymalen Stromazellen (MSC) besteht. Um ihre Wirkung zu entfalten, produzieren MSC u. a. eine Vielzahl von Zytokinen, zu denen auch *Transforming Growth Factor beta 1* (TGF- β_1) zählt. TGF- β_1 ist ein Wachstumsfaktor, der je nach Zelltyp und Wirkdauer spezifische zelluläre Effekte wie Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose reguliert. So können MSC weiter Einfluss auf die Interaktion zwischen Tumor und Tumor-Stroma gewinnen. Es konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von MSC und die Interaktionen zwischen Tumorgewebe und Tumor-Mikroumgebung das invasive Potential von Plattenepithelkarzinomen (PEK) hemmen können.

Zentrale Prozesse wie invasives Wachstum und Metastasierung sind entscheidende Schritte während der Tumorprogression und können durch den Prozess einer Invasivitäts-Metastasierungs-Kaskade beschrieben werden. Ein Schlüsselereignis im Metastasierungsprozess ist der epithelial-mesenchymale Übergang, bei dem epitheliale Zellen mesenchymale Eigenschaften gewinnen. Dieser Übergang wird auch als Epitheliale-Mesenchymale-Transition (EMT) bezeichnet.

Die Analysen der vorliegenden Dissertation untersuchen, welchen Einfluss das Zytokin TGF- β_1 auf die Wechselwirkungen zwischen Tumor und Tumor-Stroma hat, wie sich diese auf die Tumorzellproliferation auswirken, wie wichtige EMT-Marker wie Vimentin, E-Cadherin, Snail1, Twist und Matrix-Metalloproteinase (MMP)-14 beeinflusst und wie die Marker des *Wingless-type MMTV integration site family member* (Wnt)-, AKT-, Erk- und *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR)-Signalwegs reguliert werden.

Hiefür wurden humane MSC aus dem Beckenkamm von acht Patienten isoliert, gepoolt und auf einer trans-well permeablen Membran mit Tumorzellen der etablierten PEK-Zelllinie PCI-13 ko-kultiviert und mit Monolayer-Kulturen verglichen. Monolayer- und Ko-Kulturen wurden mit TGF- β_1 induziert und mit nicht-induzierten Kulturen verglichen. Im Vorfeld der Versuche erfolgte zunächst eine Charakterisierung der MSC mittels FACS und eine osteogene, adipogene und chondrogene Differenzierung. Im Zuge der Experimente wurde die Expression von Vimentin und E-Cadherin durch IF-Analysen ausgewertet. Darüber hinaus wurden qualitative reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion (qRT-PCR) Analysen der Tumortransitions-Marker Vimentin, E-Cadherin, Wnt-3,

β -Catenin, Snail1, Twist und MMP-14 durchgeführt. Veränderungen im AKT-, Erk- und mTOR-Signalweg wurden durch Proteinanalysen mittels *Bicinchoninic Acid Assay* (BCA) und *PathScan*[®] untersucht.

MSC scheinen in Ko-Kultur mit PCI-13 einen suppressiven Einfluss auf die Proliferation der Tumorzellen zu nehmen. Die Induktion mit dem Zytokin TGF- β_1 hob diesen suppressiven Einfluss der Ko-Kultur auf die Proliferation der PCI-13 jedoch wieder auf. Die Induktion mit TGF- β_1 führte zu einer eher EMT-progressiven Wirkung, in dem die Zytokingabe einen direkten Einfluss auf die Expression wichtiger EMT-Marker wie Vimentin, E-Cadherin, Snail1 und Twist nahm.

Auch die Analyse der AKT-, Erk- und mTOR-Signalwege zeigte eine progressive Aktivierung dieser Signalwege durch TGF- β_1 . So wurde der AKT-Signalweg durch TGF- β_1 -Induktion und Ko-Kultivierung in PCI-13 und MSC aktiviert und es kam zu einem Beginn des Erk- und mTOR-Signalwegs. Damit wird insgesamt deutlich, dass der Einfluss von TGF- β_1 in der Ko-Kultur zwischen MSC und PCI-13 eine Tumorzellentwicklung fördern kann.

6 Literaturverzeichnis

Adachi M, Imai K (2002): The proapoptotic BH3-only protein BAD transduces cell death signals independently of its interaction with Bcl-2. *Cell death and differentiation* 9, 1240-1247

Anastas JN, Moon RT (2013): WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nature reviews. Cancer* 13, 11-26

Assani G, Zhou Y (2019): Effect of modulation of epithelial-mesenchymal transition regulators Snail1 and Snail2 on cancer cell radiosensitivity by targeting of the cell cycle, cell apoptosis and cell migration/invasion. *Oncology letters* 17, 23-30

Avdulov S, Li S, Michalek V, Burrichter D, Peterson M, Perlman DM, Manivel JC, Sonenberg N, Yee D, Bitterman PB et al. (2004): Activation of translation complex eIF4F is essential for the genesis and maintenance of the malignant phenotype in human mammary epithelial cells. *Cancer cell* 5, 553-563

Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, Garcia De Herreros A (2000): The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nature cell biology* 2, 84-89

Batlle R, Alba-Castellon L, Loubat-Casanovas J, Armenteros E, Franci C, Stanisavljevic J, Banderas R, Martin-Caballero J, Bonilla F, Baulida J et al. (2013): Snail1 controls TGF-beta responsiveness and differentiation of mesenchymal stem cells. *Oncogene* 32, 3381-3389

Berx G, van Roy F (2009): Involvement of members of the cadherin superfamily in cancer. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a003129

Bhome R, Bullock MD, Al Saihati HA, Goh RW, Primrose JN, Sayan AE, Mirnezami AH (2015): A top-down view of the tumor microenvironment: structure, cells and signaling. *Frontiers in cell and developmental biology* 3, 33

Birchmeier W, Behrens J (1994): Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochimica et biophysica 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 diseases* 6, 376-382

Bjorklund M, Koivunen E (2005): Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. *Biochimica et biophysica acta* 1755, 37-69

Böhrnsen F, Fricke M, Sander C, Leha A, Schliephake H, Kramer FJ (2015): Interactions of human MSC with head and neck squamous cell carcinoma cell line PCI-13 reduce markers of epithelia-mesenchymal transition. *Clin Oral Investig* 19, 1121-1128

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

Brazil DP, Hemmings BA (2001): Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends in biochemical sciences* 26, 657-664

Bruzzese F, Leone A, Rocco M, Carbone C, Piro G, Caraglia M, Di Gennaro E, Budillon A (2011): HDAC inhibitor vorinostat enhances the antitumor effect of gefitinib in squamous cell carcinoma of head and neck by modulating ErbB receptor expression and reverting EMT. *Journal of cellular physiology* 226, 2378-2390

Cai J, Guan H, Fang L, Yang Y, Zhu X, Yuan J, Wu J, Li M (2013): MicroRNA-374a activates Wnt/beta-catenin signaling to promote breast cancer metastasis. *The Journal of clinical investigation* 123, 566-579

Caraci F, Gili E, Calafiore M, Failla M, La Rosa C, Crimi N, Sortino MA, Nicoletti F, Copani A, Vancheri C (2008): TGF-beta1 targets the GSK-3beta/beta-catenin pathway via ERK activation in the transition of human lung fibroblasts into myofibroblasts. *Pharmacological research* 57, 274-282

Cargnello M, Roux PP (2011): Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 75, 50-83

Casarsa C, Bassani N, Ambrogi F, Zabucchi G, Boracchi P, Biganzoli E, Coradini D (2011): Epithelial-to-mesenchymal transition, cell polarity and stemness-associated features in malignant pleural mesothelioma. *Cancer letters* 302, 136-143

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 international* 6, 28

Chan TS, Shaked Y, Tsai KK (2019): Targeting the interplay between cancer fibroblasts, mesenchymal stem cells, and cancer stem cells in desmoplastic cancers. *Frontiers in oncology* 9, 688

Chao KC, Yang HT, Chen MW (2012): Human umbilical cord mesenchymal stem cells suppress breast cancer tumourigenesis through direct cell-cell contact and internalization. *Journal of cellular and molecular medicine* 16, 1803-1815

Chen YW, Chen KH, Huang PI, Chen YC, Chiou GY, Lo WL, Tseng LM, Hsu HS, Chang KW, Chiou SH (2010): Cucurbitacin I suppressed stem-like property and enhanced radiation-induced apoptosis in head and neck squamous carcinoma--derived CD44(+)/ALDH1(+) cells. *Molecular cancer therapeutics* 9, 2879-2892

Christiansen JJ, Rajasekaran AK (2006): Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer research* 66, 8319-8326

Collins JJ, Thebaud B (2014): Lung mesenchymal stromal cells in development and disease: to serve and protect? *Antioxidants & redox signaling* 21, 1849-1862

Coons AH (1954): Labelled antigens and antibodies. *Annual review of microbiology* 8, 333-352

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA (1995): Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378, 785-789

Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW (2006): Beyond PTEN mutations: the PI3K pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nature reviews. Cancer* 6, 184-192

Curry JM, Sprandio J, Cognetti D, Luginbuhl A, Bar-ad V, Pribitkin E, Tuluc M (2014): Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Seminars in oncology* 41, 217-234

da Silva SD, Alaoui-Jamali MA, Soares FA, Carraro DM, Brentani HP, Hier M, Rogatto SR, Kowalski LP (2014): TWIST1 is a molecular marker for a poor prognosis in oral cancer and represents a potential therapeutic target. *Cancer* 120, 352-362

Datta SR, Brunet A, Greenberg ME (1999): Cellular survival: a play in three Akts. *Genes & development* 13, 2905-2927

Deryugina EI, Quigley JP (2015): Tumor angiogenesis: MMP-mediated induction of intravasation- and metastasis-sustaining neovasculature. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 44-46, 94-112

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317

Eastham AM, Spencer H, Soncin F, Ritson S, Merry CL, Stern PL, Ward CM (2007): Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation. *Cancer research* 67, 11254-11262

Easwaran V, Pishvaian M, Salimuddin, Byers S (1999): Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. *Current biology : CB* 9, 1415-1418

Egeblad M, Werb Z (2002): New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nature reviews. Cancer* 2, 161-174

Eggenhofer E, Luk F, Dahlke MH, Hoogduijn MJ (2014): The life and fate of mesenchymal stem cells. *Frontiers in immunology* 5, 148

Engelman JA, Luo J, Cantley LC (2006): The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature reviews. Genetics* 7, 606-619

Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari HM, Goldman RD (2009): Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *The Journal of clinical investigation* 119, 1763-1771

Ferris RL, Blumenschein G, Jr., Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, Harrington K, Kasper S, Vokes EE, Even C et al. (2016): Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England journal of medicine* 375, 1856-1867

Fidler IJ (2003): The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nature reviews. Cancer* 3, 453-458

Fierro FA, Sierralta WD, Epanan MJ, Minguell JJ (2004): Marrow-derived mesenchymal stem cells: role in epithelial tumor cell determination. *Clinical & experimental metastasis* 21, 313-319

Fingar DC, Salama S, Tsou C, Harlow E, Blenis J (2002): Mammalian cell size is controlled by mTOR and its downstream targets S6K1 and 4EBP1/eIF4E. *Genes & development* 16, 1472-1487

Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C, Blenis J (2004): mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Molecular and cellular biology* 24, 200-216

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 cellular & developmental biology. Animal* 34, 347-351

Goers L, Freemont P, Polizzi KM (2014): Co-culture systems and technologies: taking synthetic biology to the next level. *J R Soc Interface* 11

Guo X, Ramirez A, Waddell DS, Li Z, Liu X, Wang XF (2008): Axin and GSK3- control Smad3 protein stability and modulate TGF- signaling. *Genes & development* 22, 106-120

Guo Y, Yin J, Zha L, Wang Z (2013): Clinicopathological significance of platelet-derived growth factor B, platelet-derived growth factor receptor-beta, and E-cadherin expression in gastric carcinoma. *Contemporary oncology (Poznan, Poland)* 17, 150-155

Gupta GP, Massague J (2006): Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679-695

Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70

Hanahan D, Weinberg RA (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674

Hanahan D, Coussens LM (2012): Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer cell* 21, 309-322

Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, Dal Maso L, Daudt AW, Fabianova E et al. (2009): Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18, 541-550

Hass R, Kasper C, Bohm S, Jacobs R (2011): Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell communication and signaling : CCS* 9, 12

- Hayry V, Makinen LK, Atula T, Sariola H, Makitie A, Leivo I, Keski-Santti H, Lundin J, Haglund C, Hagstrom J (2010): Bmi-1 expression predicts prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. *British journal of cancer* 102, 892-897
- Hazan RB, Phillips GR, Qiao RF, Norton L, Aaronson SA (2000): Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis. *The Journal of cell biology* 148, 779-790
- 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 research* 49, 5167-5175
- Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A (2005): Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 7, 393-395
- Hulsken J, Birchmeier W, Behrens J (1994): E-cadherin and APC compete for the interaction with beta-catenin and the cytoskeleton. *The Journal of cell biology* 127, 2061-2069
- Hung KF, Chang CS, Liu CJ, Lui MT, Cheng CY, Kao SY (2006): Differential expression of E-cadherin in metastatic lesions comparing to primary oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 35, 589-594
- Ichikawa K, Kubota Y, Nakamura T, Weng JS, Tomida T, Saito H, Takekawa M (2015): MCRIP1, an ERK substrate, mediates ERK-induced gene silencing during epithelial-mesenchymal transition by regulating the co-repressor CtBP. *Molecular cell* 58, 35-46
- Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE (2007): Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Experimental cell research* 313, 2050-2062
- Jacob A, Prekeris R (2015): The regulation of MMP targeting to invadopodia during cancer metastasis. *Frontiers in cell and developmental biology* 3, 4
- Jamieson C, Sharma M, Henderson BR (2012): Wnt signaling from membrane to nucleus: beta-catenin caught in a loop. *The international journal of biochemistry & cell biology* 44, 847-850
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011): Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians* 61, 69-90
- Johnson GL, Lapadat R (2002): Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. *Science (New York, N.Y.)* 298, 1911-1912

- Johnstone B, Hering TM, Caplan AI, Goldberg VM, Yoo JU (1998): In vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells. *Experimental cell research* 238, 265-272
- Kalluri R, Neilson EG (2003): Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation* 112, 1776-1784
- Kalluri R, Weinberg RA (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* 119, 1420-1428
- Kim IA, Bae SS, Fernandes A, Wu J, Muschel RJ, McKenna WG, Birnbaum MJ, Bernhard EJ (2005): Selective inhibition of Ras, phosphoinositide 3 kinase, and Akt isoforms increases the radiosensitivity of human carcinoma cell lines. *Cancer research* 65, 7902-7910
- Klein T, Bischoff R (2011): Active metalloproteases of the A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) family: biological function and structure. *Journal of proteome research* 10, 17-33
- Korbling M, Estrov Z (2003): Adult stem cells for tissue repair - a new therapeutic concept? *The New England journal of medicine* 349, 570-582
- Korita PV, Wakai T, Ajioka Y, Inoue M, Takamura M, Shirai Y, Hatakeyama K (2010): Aberrant expression of vimentin correlates with dedifferentiation and poor prognosis in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *Anticancer research* 30, 2279-2285
- Kovacina KS, Park GY, Bae SS, Guzzetta AW, Schaefer E, Birnbaum MJ, Roth RA (2003): Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *The Journal of biological chemistry* 278, 10189-10194
- Kucerova L, Skolekova S, Matuskova M, Bohac M, Kozovska Z (2013): Altered features and increased chemosensitivity of human breast cancer cells mediated by adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *BMC cancer* 13, 535
- Kulasinghe A, Perry C, Jovanovic L, Nelson C, Punyadeera C (2015): Circulating tumour cells in metastatic head and neck cancers. *International journal of cancer* 136, 2515-2523
- 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
- Kyriakis JM, App H, Zhang XF, Banerjee P, Brautigam DL, Rapp UR, Avruch J (1992): Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature* 358, 417-421
- Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014): Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology* 15, 178-196
- Laplane M, Sabatini DM (2012): mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149, 274-293
- Leef G, Thomas SM (2013): Molecular communication between tumor-associated fibroblasts and head and neck squamous cell carcinoma. *Oral oncology* 49, 381-386

- 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
- Liotta LA, Kohn EC (2001): The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature* 411, 375-379
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods (San Diego, Calif.)* 25, 402-408
- Luo J, Ok Lee S, Liang L, Huang CK, Li L, Wen S, Chang C (2014): Infiltrating bone marrow mesenchymal stem cells increase prostate cancer stem cell population and metastatic ability via secreting cytokines to suppress androgen receptor signaling. *Oncogene* 33, 2768-2778
- Lv FJ, Tuan RS, Cheung KM, Leung VY (2014): Concise review: the surface markers and identity of human mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 32, 1408-1419
- Lynch M, Fitzgerald C, Johnston KA, Wang S, Schmidt EV (2004): Activated eIF4E-binding protein slows G1 progression and blocks transformation by c-myc without inhibiting cell growth. *The Journal of biological chemistry* 279, 3327-3339
- Lyons JG, Patel V, Roue NC, Fok SY, Soon LL, Halliday GM, Gutkind JS (2008): Snail up-regulates proinflammatory mediators and inhibits differentiation in oral keratinocytes. *Cancer research* 68, 4525-4530
- Madhunapantula SV, Sharma A, Robertson GP (2007): PRAS40 deregulates apoptosis in malignant melanoma. *Cancer research* 67, 3626-3636
- Mannello F, Luchetti F, Falcieri E, Papa S (2005): Multiple roles of matrix metalloproteinases during apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 10, 19-24
- Manning BD, Cantley LC (2007): AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* 129, 1261-1274
- Massague J (2012): TGFbeta signalling in context. *Nature reviews. Molecular cell biology* 13, 616-630
- Masszi A, Di Ciano C, Sirokmany G, Arthur WT, Rotstein OD, Wang J, McCulloch CA, Rosivall L, Mucsi I, Kapus A (2003): Central role for Rho in TGF-beta1-induced alpha-smooth muscle actin expression during epithelial-mesenchymal transition. *American journal of physiology. Renal physiology* 284, F911-924
- Meirelles Lda S, Nardi NB (2003): Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *British journal of haematology* 123, 702-711

- Mendelsohn AH, Lai CK, Shintaku IP, Fishbein MC, Brugman K, Elashoff DA, Abemayor E, Dubinett SM, St John MA (2012): Snail as a novel marker for regional metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. *American journal of otolaryngology* 33, 6-13
- Metelmann H, Kaduk W: Tumoren in Kopf-Hals-Bereich. In: Horch H (Hrsg): *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*. Elsevier, München/Jena 2007
- Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS (2009): Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral oncology* 45, 324-334
- Monteverde T, Muthalagu N, Port J, Murphy DJ (2015): Evidence of cancer-promoting roles for AMPK and related kinases. *The FEBS journal* 282, 4658-4671
- Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ (2004): The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochimica et biophysica acta* 1705, 69-89
- Mukai F, Ishiguro K, Sano Y, Fujita SC (2002): Alternative splicing isoform of tau protein kinase I/glycogen synthase kinase 3beta. *Journal of neurochemistry* 81, 1073-1083
- Nagaraj NS, Datta PK (2010): Targeting the transforming growth factor-beta signaling pathway in human cancer. *Expert opinion on investigational drugs* 19, 77-91
- Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ (1999): N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *The Journal of cell biology* 147, 631-644
- Nieto MA (2011): The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 27, 347-376
- Nijkamp MM, Span PN, Hoogsteen IJ, van der Kogel AJ, Kaanders JH, Bussink J (2011): Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 99, 344-348
- Nishida E, Gotoh Y (1993): The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends in biochemical sciences* 18, 128-131
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 2730-2734
- Oshimori N, Fuchs E (2012): The harmonies played by TGF-beta in stem cell biology. *Cell stem cell* 11, 751-764
- Ou DL, Chien HF, Chen CL, Lin TC, Lin LI (2008): Role of Twist in head and neck carcinoma with lymph node metastasis. *Anticancer research* 28, 1355-1359
- Ozguven BY, Karacetin D, Kabukcuoglu F, Taskin T, Yener S (2011): Immunohistochemical study of E-cadherin and beta-catenin expression in colorectal

carcinomas. Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists 62, 19-24

Pages G, Lenormand P, L'Allemain G, Chambard JC, Meloche S, Pouyssegur J (1993): Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 8319-8323

Paget S (1989): The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. Cancer metastasis reviews 8, 98-101

Peitzsch C, Nathansen J, Schniewind SI, Schwarz F, Dubrowska A (2019): Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Identification, Characterization and Clinical Implications. Cancers 11(616), 1-24

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 (New York, N.Y.) 284, 143-147

Poggi A, Musso A, Dapino I, Zocchi MR (2014): Mechanisms of tumor escape from immune system: role of mesenchymal stromal cells. Immunology letters 159, 55-72

Porta C, Paglino C, Mosca A (2014): Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. Frontiers in oncology 4, 64

Putzke AP, Ventura AP, Bailey AM, Akture C, Opoku-Ansah J, Celiktas M, Hwang MS, Darling DS, Coleman IM, Nelson PS et al. (2011): Metastatic progression of prostate cancer and e-cadherin regulation by zeb1 and SRC family kinases. The American journal of pathology 179, 400-410

Qin Q, Xu Y, He T, Qin C, Xu J (2012): Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. Cell research 22, 90-106

Radisky ES, Radisky DC (2010): Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. Journal of mammary gland biology and neoplasia 15, 201-212

Rallapalli S, Bishi DK, Verma RS, Cherian KM, Guhathakurta S (2009): A multiplex PCR technique to characterize human bone marrow derived mesenchymal stem cells. Biotechnology letters 31, 1843-1850

Ramakrishnan AB, Cadigan KM (2017): Wnt target genes and where to find them. F1000Research 6, 746

Ribeiro AS, Sousa B, Carreto L, Mendes N, Nobre AR, Ricardo S, Albergaria A, Cameselle-Teijeiro JF, Gerhard R, Soderberg O et al. (2013): P-cadherin functional role is dependent on E-cadherin cellular context: a proof of concept using the breast cancer model. The Journal of pathology 229, 705-718

Rommel C, Clarke BA, Zimmermann S, Nunez L, Rossman R, Reid K, Moelling K, Yancopoulos GD, Glass DJ (1999): Differentiation stage-specific inhibition of the Raf-MEK-ERK pathway by Akt. Science (New York, N.Y.) 286, 1738-1741

Roorda BD, Elst A, Boer TG, Kamps WA, de Bont ES (2010): Mesenchymal stem cells contribute to tumor cell proliferation by direct cell-cell contact interactions. *Cancer investigation* 28, 526-534

Rotter N, Oder J, Schlenke P, Lindner U, Bohrsen F, Kramer J, Rohwedel J, Huss R, Brandau S, Wollenberg B et al. (2008): Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. *Stem cells and development* 17, 509-518

Routray S, Sunkavali A, Bari KA (2014): Carcinoma-associated fibroblasts, its implication in head and neck squamous cell carcinoma: a mini review. *Oral diseases* 20, 246-253

Roux PP, Blenis J (2004): ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 68, 320-344

Saito A, Narasimhan P, Hayashi T, Okuno S, Ferrand-Drake M, Chan PH (2004): Neuroprotective role of a proline-rich Akt substrate in apoptotic neuronal cell death after stroke: relationships with nerve growth factor. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 1584-1593

Sanchez-Tillo E, Liu Y, de Barrios O, Siles L, Fanlo L, Cuatrecasas M, Darling DS, Dean DC, Castells A, Postigo A (2012): EMT-activating transcription factors in cancer: beyond EMT and tumor invasiveness. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 69, 3429-3456

Satelli A, Li S (2011): Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 68, 3033-3046

Sharma M, Jamieson C, Johnson M, Molloy MP, Henderson BR (2012): Specific armadillo repeat sequences facilitate beta-catenin nuclear transport in live cells via direct binding to nucleoporins Nup62, Nup153, and RanBP2/Nup358. *The Journal of biological chemistry* 287, 819-831

Shin S, Dimitri CA, Yoon SO, Dowdle W, Blenis J (2010): ERK2 but not ERK1 induces epithelial-to-mesenchymal transformation via DEF motif-dependent signaling events. *Molecular cell* 38, 114-127

Shukla S, Sinha S, Khan S, Kumar S, Singh K, Mitra K, Maurya R, Meeran SM (2016): Cucurbitacin B inhibits the stemness and metastatic abilities of NSCLC via downregulation of canonical Wnt/beta-catenin signaling axis. *Scientific reports* 6, 21860

Smith A, Teknos TN, Pan Q (2013): Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral oncology* 49, 287-292

Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M (2006): Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24, 74-85

Stegeman H, Kaanders JH, Wheeler DL, van der Kogel AJ, Verheijen MM, Waaijer SJ, Iida M, Grenman R, Span PN, Bussink J (2012): Activation of AKT by hypoxia: a potential target for hypoxic tumors of the head and neck. *BMC cancer* 12, 463

Steinberg A, Asher A, Bailey C, Fu JB (2015): The role of physical rehabilitation in stem cell transplantation patients. *Support Care Cancer* 23, 2447-2460

Sternlicht MD, Werb Z (2001): How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annual review of cell and developmental biology* 17, 463-516

Sun H, Charles CH, Lau LF, Tonks NK (1993): MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* 75, 487-493

Sun L, Diamond ME, Ottaviano AJ, Joseph MJ, Ananthanarayan V, Munshi HG (2008): Transforming growth factor-beta 1 promotes matrix metalloproteinase-9-mediated oral cancer invasion through snail expression. *Molecular cancer research : MCR* 6, 10-20

Syn NL, Teng MWL, Mok TSK, Soo RA (2017): De-novo and acquired resistance to immune checkpoint targeting. *The Lancet. Oncology* 18, e731-e741

Talmadge JE, Fidler IJ (2010): AACR centennial series: the biology of cancer metastasis: historical perspective. *Cancer research* 70, 5649-5669

ten Berge D, Koole W, Fuerer C, Fish M, Eroglu E, Nusse R (2008): Wnt signaling mediates self-organization and axis formation in embryoid bodies. *Cell stem cell* 3, 508-518

Theocharis S, Kotta-Loizou I, Klijanienko J, Giaginis C, Alexandrou P, Dana E, Rodriguez J, Patsouris E, Sastre-Garau X (2014): Extracellular signal-regulated kinase (ERK) expression and activation in mobile tongue squamous cell carcinoma: associations with clinicopathological parameters and patients survival. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35, 6455-6465

Tiwari N, Gheldof A, Tatari M, Christofori G (2012): EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. *Seminars in cancer biology* 22, 194-207

Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid AL, Berger F (2004): Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Experimental cell research* 295, 395-406

Turley SJ, Cremasco V, Astarita JL (2015): Immunological hallmarks of stromal cells in the tumour microenvironment. *Nature reviews. Immunology* 15, 669-682

van Roy F (2014): Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nature reviews. Cancer* 14, 121-134

Vander Haar E, Lee SI, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim DH (2007): Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature cell biology* 9, 316-323

Wang YZ, Wu KP, Wu AB, Yang ZC, Li JM, Mo YL, Xu M, Wu B, Yang ZX (2014): MMP-14 overexpression correlates with poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 35, 9815-9821

- Weinberg RA (2008): Twisted epithelial-mesenchymal transition blocks senescence. *Nature cell biology* 10, 1021-1023
- Wheeler SE, Shi H, Lin F, Dasari S, Bednash J, Thorne S, Watkins S, Joshi R, Thomas SM (2014): Enhancement of head and neck squamous cell carcinoma proliferation, invasion, and metastasis by tumor-associated fibroblasts in preclinical models. *Head & neck* 36, 385-392
- Wiza C, Nascimento EB, Ouwens DM (2012): Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 302, E1453-1460
- Wullschlegel S, Loewith R, Hall MN (2006): TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124, 471-484
- Xing X, Tang YB, Yuan G, Wang Y, Wang J, Yang Y, Chen M (2013): The prognostic value of E-cadherin in gastric cancer: a meta-analysis. *International journal of cancer* 132, 2589-2596
- Xu Z, Jiang Y, Steed H, Davidge S, Fu Y (2010): TGFbeta and EGF synergistically induce a more invasive phenotype of epithelial ovarian cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* 401, 376-381
- Xue G, Hemmings BA (2012): Phosphorylation of basic helix-loop-helix transcription factor Twist in development and disease. *Biochemical Society transactions* 40, 90-93
- 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. *Cellular signalling* 18, 679-687
- Yang MH, Chen CL, Chau GY, Chiou SH, Su CW, Chou TY, Peng WL, Wu JC (2009): Comprehensive analysis of the independent effect of twist and snail in promoting metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)* 50, 1464-1474
- Yingling JM, Blanchard KL, Sawyer JS (2004): Development of TGF-beta signalling inhibitors for cancer therapy. *Nature reviews. Drug discovery* 3, 1011-1022
- Zeisberg M, Neilson EG (2009): Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *The Journal of clinical investigation* 119, 1429-1437
- Zhang J, Tian XJ, Xing J (2016): Signal Transduction Pathways of EMT Induced by TGF-beta, SHH, and WNT and Their Crosstalks. *Journal of clinical medicine* 5 (4), 41
- Zhao L, Chen S, Yang P, Cao H, Li L (2019): The role of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation: prevention and treatment of graft-versus-host disease. *Stem cell research & therapy* 10, 182
- Zhou BP, Hung MC (2005): Wnt, hedgehog and snail: sister pathways that control by GSK-3beta and beta-Trcp in the regulation of metastasis. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 4, 772-776

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. F. Böhrnsen für die Vergabe des Themas, die herausragende Betreuung und die Möglichkeit, erste Schritte in die Welt der wissenschaftlichen Forschung zu gehen.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Labors der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universitätsmedizin Göttingen danke ich für die unkomplizierte Aufnahme in ihr Team und die stets freundliche Unterstützung bei all meinen Anliegen. Dabei gilt mein besonderer Dank Herrn Dr. rer. nat. Dipl. Biol. H. J. Rolf, Frau Dr. rer. nat. Dipl. Biol. N. Aeckerle sowie M. Hoch für ihre unermüdliche und über das normale Maß hinausgehende Hilfsbereitschaft.

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