

Aus der Hals-Nasen-Ohren-Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
(Direktorin: Prof. Dr. med. N. Rotter)

**HPV-positive und -negative Plattenepithelkarzinome
der Kopf-Hals-Region**
—
**Interaktionen in der Tumorstammzellnische
am Beispiel der SDF-1 α /CXCR4-Achse**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Frederic Jungbauer
aus Malsch
2018

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd

Referentin: Frau Priv.-Doz. Dr. med. Anne Lammert

*„Es wird ja fleißig gearbeitet und viel mikroskopiert,
aber es müsste mal wieder einer einen gescheiten Gedanken haben.“*

Rudolf Virchow

(1821-1902)

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

| | |
|--|----|
| ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS | 3 |
| | |
| 1 EINLEITUNG | 7 |
| 1.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region | 7 |
| 1.2 Das Humane Papillomavirus | 11 |
| 1.3 Physiologische Stammzellen und die Tumorstammzelltheorie | 14 |
| 1.4 Die SDF-1 α /CXCR4-Achse | 24 |
| | |
| 2 MATERIAL UND METHODEN..... | 30 |
| 2.1 Zelllinien und Zellkultur..... | 30 |
| 2.2 Expressionsuntersuchungen | 31 |
| 2.2.1 Immunhistochemische Färbung..... | 31 |
| 2.2.2 Immunfluoreszenzmarkierung | 32 |
| 2.3 Proliferationsassay | 32 |
| 2.4 Zellmorphologie..... | 33 |
| 2.5 Migrationsassay..... | 33 |
| 2.6 Statistische Auswertung | 35 |
| | |
| 3 ERGEBNISSE | 36 |
| 3.1 Expression der Oberflächenmoleküle..... | 36 |
| 3.1.1 Expression von CD44..... | 36 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 3.1.2 | Expression von CXCR4 | 38 |
| 3.2 | Ergebnisse des Proliferationsassays | 40 |
| 3.3 | Ergebnisse der Lichtmikroskopie | 43 |
| 3.4 | Ergebnisse des Migrationsassays | 49 |
| 3.5 | Korrelation der Differenzen mit der Konzentration an SDF-1 α | 55 |
| 4 | DISKUSSION | 58 |
| 4.1 | Die Expression von CD44 in HNSCC | 58 |
| 4.2 | Expression von CXCR4 in HNSCC | 60 |
| 4.3 | Einfluss von SDF-1 α auf die Zellproliferation | 61 |
| 4.4 | Einfluss von SDF-1 α auf die Zellmorphologie | 62 |
| 4.5 | Einfluss von SDF-1 α auf die Zellmigration | 63 |
| 4.6 | Die Immunsurveillance-Hypothese | 66 |
| 4.7 | Beeinflussung der SDF-1 α /CXCR4-Achse durch das Humane Papillomavirus | 70 |
| 4.8 | Anwendung der Bidirektionalitätsüberlegung | 75 |
| 4.9 | Bedeutung von endogenen Leveln an SDF-1 α | 75 |
| 4.10 | Schlussfolgerung und Ausblick | 77 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 78 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 79 |
| 7 | LEBENS LAUF | 103 |
| 8 | DANKSAGUNG | 104 |

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------|--|
| 4EBP1 | eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (eukariotischer Translationinitierungs Faktor 4E bindendes Protein 1) |
| AACR | American Association for Cancer Research (Amerikanische Gesellschaft für Krebsforschung) |
| AEC | Aminoethylcarbazole |
| AIDS | Acquired Immune Deficiency Syndrome (erworbenes Immundefizienz Syndrom) |
| Akt | Proteinkinase B |
| ALDH | Aldehyd-Dehydrogenase |
| ALL | akute lymphatische Leukämie |
| AML | akute myeloische Leukämie |
| AMPK | Adenosinmonophosphat-aktivierte Proteinkinase |
| ATM | Ataxia Telangiectasia Mutated, eine Serin-Proteinkinase |
| Bcr-Abl | Translokationsprodukt, kodiert eine daueraktive Rezeptortyrosinkinase |
| CCR4, CXCR5 | Chemokinrezeptoren |
| CSC | cancer stem cell (Krebs- oder Tumorstammzelle) |
| CXCR4 | 7-Transmembranrezeptor, Rezeptor von SDF-1 α |
| CXCR7 | potentieller Rezeptor für SDF-1 α |
| CYP | Cytochrom P-Enzyme |
| DAPI | 4',6-Diamidin-2-phenylindol |
| DMEM | Dulbecco's modified essential medium (Zellkulturmedium) |
| DNA | deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure) |
| E6/E7 | Onkoproteine E6 und E7 |
| E6-AP | E6-assoziiertes Protein |
| EBV | Eppstein-Barr-Virus |
| EC | endothelial cells (Endothelzellen) |
| ECM | extracellular matrix (extrazelluläre Matrix) |
| EMT | epithelial-mesenchymale Transition |
| ERBB2 | Synonym für HER2/neu, humaner epidermaler Wachstumsfaktor (ein Onkogen) |

| | |
|--------|---|
| ERK1/2 | extracellular signal-regulated kinases (extrazelluläre Signal-regulierte Kinasen) |
| FCS | fetal calf serum (fötales Kälberserum) |
| FGFR | fibroblast growth factor receptor (Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor) |
| GK3 | Glykogensynthase-Kinase 3 |
| GSC | germ line stem cells (Keimbahn-Stammzellen) |
| GTPase | Guanosintriphosphat- bindende und hydrolysierende Enzymgruppe |
| Hh | hedgehog (ein Morphogen) |
| HIF | hypoxia inducible factor (Hypoxie-induzierbarer Faktor) |
| HIV | human immunodeficiency virus (Humanes Immundefizit Virus) |
| HNSCC | head and neck squamous cell carcinoma (Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region) |
| HPC | hämatopoetic progenitor cells (hämatopoetische Vorläuferzellen) |
| HPV | Humanes Papillomavirus |
| HR | high risk (hohes Risiko) |
| HSC | haematopoetic stem cells (hämatopetische Stammzellen) |
| HUMSTR | historische Bezeichnung von CXCR4 |
| IARC | International Agency for Research on Cancer (Internationale Agentur für Krebsforschung der WHO) |
| IGF-1 | insulin like growth factor 1 (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1) |
| IP4P 2 | inositol polyphosphate 4-phosphatase type 2 (Inositolpolyphosphat 4- Phosphatase Typ 2) |
| L1/L2 | late protein 1/2-Capsid Protein |
| LCR1 | historische Bezeichnung von CXCR4 |
| LESTR | historische Bezeichnung von CXCR4 |
| LR | low risk (niedriges Risiko) |
| MAPK | mitogen-activated protein kinase (eine Serin/Threonin-selektive Proteinkinase) |
| MHC | Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex) |
| MMP | matrix metalloproteinase (Matrix-Metalloproteasen) |
| mRNA | messenger ribonucleic acid (Boten-RNA) |

| | |
|----------|--|
| MSC | mesenchymal stem cells (mesenchymale Stammzellen) |
| mTOR | mechanistic Target of Rapamycin (mechanistisches Ziel von Rapamycin) |
| ND | neck dissection (chirurgische Entfernung der Halslymphknoten) |
| NFκB | nuclear factor ‚kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells (Zellkernfaktor ‚kappa-Leichtketten-Verstärker‘ von aktivierten B-Zellen) |
| NHANES | National Health and Nutrition Examination Survey (Nationale Gesundheits- und Ernährungsuntersuchung) |
| NK | Natürliche Killerzellen |
| NSCLC | non small cell lung carcinoma (nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom) |
| OR | Odd’s Ratio (Quotenverhältnis) |
| p16 | Cyclin abhängiger Kinasen-Inhibitor 2A |
| p53 | Tumorsuppressorgen (mit dem Molekulargewicht 53kDa) |
| PBS | phosphate buffered saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung) |
| PD-(L)1 | programmed death (ligand) 1 (programmierter Tod (Ligand) 1) |
| PI3K | Phosphoinositid 3 Kinase |
| PIP2 | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PIP3 | Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat |
| PLC | Phosphoinositid Phospholipase C |
| PP2A | Proteinphosphatase 2A |
| PTEN | Phosphatase und Tensin-Homolog |
| Rb | Retinoblastomgen |
| Rheb | Ras-homolog-enriched-in-brain (im Gehirn angereichertes Ras-Homolog) |
| RR | relatives Risiko |
| S6K | ribosomale S6 Kinase |
| SC | stem cells (Stammzellen) |
| SDF-1(α) | stromal cell derived factor-1(α) (Stromazell-gewonnener Faktor 1(α)) |
| STAT | Signal Transduktoren und Aktivatoren der Transkription, eine Proteingruppe |
| STK11 | Serin-Threonin-Kinase 11 |

| | |
|-------------|--|
| STR | short tandem repeat (Mikrosatelliten) |
| TGF β | transforming growth factor beta (transformierender Wachstumsfaktor β) |
| TNM | Tumor, Nodus, Metastase (Klassifikationssystem für Tumorgröße/ -ausbreitung, Lymphknotenbefall und Vorliegen von Fernmetastasen) |
| TSC | Tuberous Sclerosis Complex (Tuberöse Sklerose Komplex) |
| T-Zelle | Thymus-assoziierte Zelle |
| VEGF | vascular endothelial growth factor (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor) |
| vHL | von-Hippel-Lindau Tumorsuppressorgen |
| WHO | World Health Organisation (Weltgesundheitsorganisation) |
| Wnt | Signalprotein, Namensherkunft aus "Wingless" und "Int-1" |
| XRCC | X-ray repair cross-complementing protein, ein DNA-Reparatur-Protein |

1 EINLEITUNG

1.1 Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region

Plattenepithelkarzinome der Kopf-Hals-Region (head and neck squamous cell carcinoma, HNSCC) machen bei Männern 3% der Tumorfälle weltweit aus, bei Frauen etwas weniger. Dabei finden sich die meisten Karzinome in der Mundhöhle. Bei Diagnosestellung sind die Befunde zum Großteil lokal begrenzt oder regional verbreitet, Fernmetastasen finden sich initial selten (Greenlee et al., 2001).

Die onkologische Forschung konnte zwar Fortschritte in der Therapie der HNSCC erzielen, welche die Lebensqualität der Patienten verbessern konnten. Die Langzeitüberlebensraten haben sich insgesamt in den letzten 30 Jahren jedoch nicht nennenswert verändert (Greenlee et al., 2001; Jones et al., 1995).

Die 5-Jahres-Überlebensrate von Karzinomen des Nasopharynx, des Oropharynx und des Hypopharynx konnten im Zeitraum von 1974-1997 zwar verbessert werden (Nasopharynx: 38,1% zu 56,7%, $p < 0,001$; Oropharynx: 36,3% zu 49,1%, $p = 0,001$; Hypopharynx: 28,3% zu 33,3%, $p = 0,015$), jedoch ist die 5-Jahres-Überlebensrate von Karzinomen der Mundhöhle und des Larynx gesunken (Mundhöhle: 49,2% zu 43,8%, $p = 0,032$; Larynx: 82,3% zu 74,3%, $p = 0,002$) (Carvalho et al., 2005).

Patienten mit lokalen Rezidiven oder einem metastasierten Karzinom haben eine schlechte Prognose bei einer medianen Überlebensdauer von 6-10 Monaten (Bozec et al., 2008). Für die Entstehung von HNSCC ist eine Vielzahl an Risikofaktoren bekannt. Ein gut belegter Risikofaktor ist das Rauchen von Tabak (Humans, 2004). Das Risiko an HNSCC zu erkranken ist bei Rauchern ungefähr zehnmal höher als bei Nichtrauchern. Es zeigt sich außerdem ein Dosis-Wirkungs-Prinzip in Hinsicht auf die Dauer und die Intensität des Tabakrauchens (Sturgis and Cinciripini, 2007). Nach Beendigung der Rauchexposition sinkt das Risiko zwar wieder im Laufe der abstinenter Zeit, erreicht jedoch nicht mehr das Niveau eines Niemals-Rauchers. Ein signifikanter Abfall des relativen Risikos (RR), an einem Karzinom des oberen Aerodigestiv-Traktes zu erkranken, lässt sich bereits nach einem Jahr Nikotinabstinenz erkennen. In dem Zeitraum von zwei bis fünf Jahren nach Beendigung des Rauchens zeigt sich kein signifikanter Abfall des RR im Vergleich zum ersten Jahr Rauchfreiheit. Fünf Jahre nach Beendigung des Rauchens fällt das RR dann nochmals deutlich ab. Der deutlichste Benefit der

Beendigung des Rauchens findet sich bei Ex-Rauchern von kommerziellen Zigaretten, welche über zehn Jahre abstinent waren (RR=1,45) (Schlecht et al., 1999).

Weitere Risikofaktoren sind der Konsum von Kautabak (Humans, 2007b) und Alkohol (Humans, 1988). Hierdurch lässt sich zumindest teilweise das vermehrte Auftreten von HNSCC bei Männern im Vergleich zu Frauen erklären, da die Exposition gegenüber oben genannten Risikofaktoren hauptsächlich Männer betrifft.

Eine Infektion mit dem Humanen Papillomavirus, besonders dem Subtypen 16, stellt ebenfalls einen Risikofaktor für die Entwicklung von HNSCC dar. Dies konnte besonders in Karzinomen des Oropharynx gezeigt werden. In einer großen Fall-Kontroll-Studie untersuchten D'Souza et al. das Serum von Patienten mit Oropharynxkarzinomen auf das Vorhandensein des HPV-16 *late protein 1*-Capsid Proteins (L1). Dieses bildet zusammen mit dem L2-Capsid Protein im Verhältnis 30:1 die virale Kapsidhülle des HPV Typ 16. Es dient als serologischer Nachweis einer aktiven Infektion mit HPV Typ 16 (Finnen et al., 2003). Die Autoren konnten einem positiven Nachweis von HPV-16-L1 eine Odds Ratio von 19,4 bei Patienten mit zusätzlichem Tabakkonsum zurechnen. Bei Patienten ohne zusätzlichen Tabakkonsum betrug die Odds Ratio 33,6 (D'Souza et al., 2007).

Weitere Risikofaktoren für die Entwicklung von HNSCC sind eine schlechte, unausgeglichene Ernährung mit schlechter Mundhygiene (Guha et al., 2007), chronische orale Entzündungen wie Parodontitis (Tezal, 2012) und ein niedriger sozialer Status mit resultierendem eingeschränktem Zugang zu medizinischer Versorgung (Benard et al., 2008). Ein Expertenkomitee der National Academy of Sciences benennt auch eine Asbestexposition als signifikanten und unabhängigen Risikofaktor (2006). Durch die modernen Regularien, welche den Einsatz von Asbest zu Dämmungszwecken beschränken, ist jedoch nicht davon auszugehen, dass Asbest zu den steigenden Inzidenzen von HNSCC beiträgt (Sturgis and Cinciripini, 2007). Je nach nationalen oder regionalen Gepflogenheiten und Konsumverhalten sind weitere Karzinogene von Bedeutung. In Süd-Zentral-Asien sind rauchfreie Tabakprodukte zusammen mit Betelblättern, Betelnüssen, Kalkhydrat und Catechu, einem Extrakt aus Akazienbäumen, der Grund dafür, dass HNSCC die dort häufigste Malignität bei Männern und die dritthäufigste bei Frauen ist (Sturgis, 2004). In den USA wird dem verbreiteten Marihuana-Konsum ein Anteil an den steigenden

Inzidenzen von HNSCC zugesprochen, wobei die Studienlage hierzu nicht eindeutig ist (Hashibe et al., 2005; Sidney et al., 1997).

Es ist zu beobachten, dass bestimmte Risikofaktoren eher miteinander auftreten und möglicherweise eine synergistische Wirkung entfalten. Gleichzeitig sind sie nur selten mit anderen Risikofaktoren zu finden, was ebenfalls eine, hier konkurrierende, Interaktion nahelegt (Gillison et al., 2008). So findet man beispielsweise HPV-positive Tumore eher bei kaukasischen Patienten mit einer höheren Anzahl an Sexualpartnern und einer Assoziation zum Marihuana-Konsum. HPV-negative Tumore wiederum sind assoziiert mit einem vermehrten Konsum von Tabak und Alkohol. Raucher zeigen hierbei auch ein niedriges relatives Risiko für eine HPV-Infektion (D'Souza et al., 2007).

Für das individuelle Risiko eines Menschen, ein HNSCC zu entwickeln, sind auch genetische Alterationen von Bedeutung. So konnte eine Assoziation zwischen Polymorphismen in dem das DNA-Reparatur-Enzym *Ataxia Telangiectasia Mutated* (ATM) codierenden Gen und der Wahrscheinlichkeit an einem HNSCC zu erkranken nachgewiesen werden. Außerdem zeigten sich bezogen auf das Malignom-Risiko synergistische Interaktionen zwischen dem ATM-Genotypen und dem Konsum von Tabak, Alkohol und der Betelnuss (Bau et al., 2010). Auch zu weiteren DNA-Reparatur-Genen wie dem *X-ray repair cross-complementing protein* (XRCC) konnte eine Assoziation gefunden werden (Gal et al., 2005). In einer Fall-Kontroll-Studie konnte nachgewiesen werden, dass das Fehlen des Allels XRCC1 26304 T einen signifikanten Risikofaktor für die Entwicklung von Karzinomen der Mundhöhle und des Pharynx darstellt (OR=2,46). Die Homozygotie für das Allel XRCC1 28152 A stellt einen grundsätzlichen Risikofaktor für Karzinome der Kopf-Hals-Region dar (OR=1,59). Der Einfluss dieser Homozygotie auf Karzinome der Mundhöhle und des Pharynx ist jedoch eingeschränkt (OR=1,41). Gleichzeitig ließ sich feststellen, dass die Kombination dieser beiden Polymorphismen eine deutliche Risikoerhöhung gegenüber einem einzelnen Polymorphismus darstellt (einer der beiden Polymorphismen: OR=1,51; beide Polymorphismen: OR=2,02). Dieser synergistische Effekt war für Karzinome der Mundhöhle und des Pharynx besonders ausgeprägt (einer der beiden Polymorphismen: OR=2,68; beide Polymorphismen: OR=3,22) (Sturgis et al., 1999). Viele Karzinogene werden, bevor sie ihre DNA-modifizierende Wirkung entfalten können, von Enzymen der Cytochrom P450-Gruppe verstoffwechselt. In diese metabolische Aktivierung sind vor allem die Unterklassen

CYP1A2 und CYP2E1 involviert (Anzenbacher and Anzenbacherova, 2001). Polymorphismen dieser Enzyme beeinflussen ebenfalls das individuelle Malignom-Risiko eines Menschen. Beispielsweise bewirken die in Tabak enthaltenen N-Nitrosamine in Abhängigkeit der CytochromP450-Aktivität nach Umwandlung in ihre Zwischenmetabolite epigenetische Veränderungen wie Methylierung und Pyridyloxobutylierung. Somit können sie neoplastische Entwicklungen unterstützen (Hecht, 1999). In frühen Stadien, welche in der Gesamtschau des Patienten als operabel zu bewerten sind, steht die radikale chirurgische Resektion des Karzinoms im Vordergrund der kurativen Therapie. Besonders durch Fortschritte in der perioperativen Behandlung wie verbesserten Antibiotika, dem Ausbau von Blutbanken, einer erhöhten Sicherheit der Anästhesie und fortgeschrittenen Techniken der Rekonstruktion hat sich der operative Therapieansatz in den letzten Jahrzehnten deutlich weiterentwickelt. Neben der radikalen Tumorresektion besteht die Herausforderung hierbei im Erhalt der Funktion von betroffenen oder benachbarten Strukturen (Cognetti et al., 2008). Zusätzlich zur Entfernung des Primarius müssen auch eventuell befallene lymphatische Abflusswege therapeutisch behandelt werden. Es handelt sich hierbei vor allem um die zervikalen Lymphknoten, welche im Rahmen des klinischen Stagings u.a. sonographisch untersucht werden sollten. Sie stellen die Lokalisationen von frühen lymphogenen Metastasierungen dar und können operativ oder mittels einer Radio-Chemo-Therapie angegangen werden. 1951 wurde eine bedeutende Arbeit veröffentlicht, welche den Nutzen der Entfernung der Halslymphknoten (*neck dissection*, ND) in therapeutischer oder prophylaktischer Intention bewertet (Martin et al., 1951). Hiernach galt die radikale ND, welche ohne Erhalt oder Schonung von Strukturen wie der Vena jugularis interna, des Nervus accessorius und des Musculus sternocleidomastoideus erfolgte, als Operationsmethode der Wahl bei klinisch befallenen Halslymphknoten. Die Autoren legten hierbei die Priorität auf die sichere Entfernung aller möglichen Tumorabsiedlungen und stellten diese Sicherheit über den Funktionserhalt von Nerven oder Muskeln. Suarez et al. führten 1963 eine Technik für die zervikale Lymphadenektomie ein, welche sie als modifizierte radikale ND beschrieben und welche später durch Bocca et al. im englischsprachigen Raum publik gemacht wurde (Bocca et al., 1980). Hierbei wurde besonderer Wert darauf gelegt, neben einer vollständigen Entfernung der Halslymphknoten die oben genannten Strukturen zu erhalten. Dies resultierte in einem verbesserten kosmetischen und funktionellen

Ergebnis. Die elektive ND, also die operative Resektion von klinisch unauffälligen Halslymphknoten bei Patienten mit HNSCC, konnte in einer Studie von 1980 keinen signifikanten Vorteil gegenüber regelmäßigen klinischen Kontrollen ohne ND beweisen (Vandenbrouck et al., 1980). Die Autoren merkten jedoch an, dass eine elektive ND für Patienten ohne gesicherte ärztliche Anbindung für eine Nachkontrolle geeignet sein könnte. Hierfür empfahlen sie die Methode der modifizierten radikalen ND als adäquat.

Zusätzlich zum operativen Ansatz in kurativer Absicht kann eine adjuvante Strahlentherapie eingesetzt werden. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass eine Bestrahlungstherapie die 5-Jahres-Überlebensraten von 33,4 auf 43,2% steigern konnte, verglichen mit einer alleinigen chirurgischen Therapie (Lavaf et al., 2008). Weiterhin besteht ein Benefit durch die Anwendung einer Chemotherapie vor (neoadjuvant) oder nach (adjuvant) der lokal-regionalen Therapie. Dabei weisen die Daten darauf hin, dass eine kombinierte Radiochemotherapie einen höheren Benefit zu versprechen scheint als eine isolierte neoadjuvante oder adjuvante Chemotherapie (Pignon et al., 2009).

1.2 Das Humane Papillomavirus

Das humane Papillomavirus (HPV) ist ein ca. 50 nm großes, unbehülltes, doppelsträngige DNA (dsDNA) tragendes Virus mit 8 kbp. Es gehört zur Familie der Papillomaviridae. Derzeit sind über 100 verschiedene Typen des HPV bekannt, welche in den Gattungen alpha-, beta-, gamma-, mu- und nu-Papillomavirus zu finden sind und sich aufgrund ihrer Sequenzabweichungen des L1-Genes weiter in 44 Spezies unterteilen lassen. In Bezug auf den Gewebetropismus lassen sich HPV-Typen wie HPV-1, -2 und -5, welche verhornendes Epithel infizieren („kutan“), von solchen wie HPV-6, -11, -16 und -18 unterscheiden, welche ihrerseits die anogenitale Schleimhaut infizieren („genital“). Eine weitere Unterteilung beruht auf der Fähigkeit der Virustypen, über dysplastische Vorstufen Malignome in den infizierten Gebieten zu verursachen. Während High-Risk-Typen (HR) wie HPV-16, -18 und -31 deutliche Assoziationen mit Malignomen zeigen, verursachen Low-Risk-Typen (LR) wie HPV-6, -11 und -40 nur äußerst selten maligne Tumore, sondern viel eher benigne Wucherungen wie Condylomata acuminata. Erstmals in Zusammenhang mit

malignen Neoplasien gebracht wurde das HPV 1983, als es aus einem zervikalen Karzinom isoliert und das HPV-Typ-16 gefunden wurde (Durst et al., 1983). 1995 wurde es offiziell von der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) der Weltgesundheitsorganisation WHO als humanes Karzinogen deklariert. Damals wurden zunächst die Typen 16 und 18 als „karzinogen“ und die Typen 31 und 33 als „möglicherweise karzinogen“ (Humans, 1995) bezeichnet. Vier Jahre später erkannte man, dass die HR-HPV-Typen nicht nur einen Risikofaktor, sondern sogar ein notwendiges, wenn auch nicht hinreichendes Karzinogen für das invasive Cervixmalignom darstellen (Walboomers et al., 1999). Die Liste der karzinogenen HPV-Typen der IARC wurde später um weitere anogenitale HPV-Typen erweitert, sowie die kutanen HPV-Typen 5 und 8. Außerdem wurden die HPV-Typen 6 und 11 als „möglicherweise kanzerogen“ eingestuft (Humans, 2007a). Dabei wurden auch erstmals Hinweise für eine Karzinogenität der HPV für Karzinome des Oropharynx und der Mundhöhle vorgestellt, welche 2012 nochmals bestärkt wurden (Humans, 2012). Die nach wie vor bestbelegteste Rolle spielt das HPV bei der Karzinogenese von Neoplasien der Cervix uteri. Wie schon erwähnt, agiert das HPV hier als notwendiger Risikofaktor, da nahezu alle Cervixtumore (99,7%) HPV-DNA enthalten (Walboomers et al., 1999). Diese zwingende Notwendigkeit wurde bisher bei noch keiner anderen menschlichen Malignomerkkrankung beobachtet (Franco et al., 2003). Der Übertragungsweg der HPV-Infektion ist hauptsächlich der sexuelle Kontakt. Die höchste Prävalenz findet sich somit bei jungen, sexuell aktiven Frauen (Kjaer et al., 2001). Nach dem sozial-kulturell durchschnittlichen Alter des sexuellen Debuts sinkt die Prävalenz wieder signifikant ab (Gravitt, 2011). Insgesamt schwankt die Prävalenz der zervikalen HPV-Infektion in verschiedenen Studien zwischen 2 und 44% (Trottier and Franco, 2006). Diese starken Abweichungen sind zum einen in den unterschiedlichen untersuchten Populationen begründet, bei denen vor allem das Alter eine Rolle spielt, sowie in den verschiedenen laborchemischen Methoden, die zum Nachweis der HPV-DNA angewendet werden (Bosch and de Sanjose, 2003). Im Gegensatz hierzu zeigte eine USA-weite Studie des *National Health and Nutrition Examination Survey* (NHANES)-Programms an Frauen zwischen 14 und 59 Jahren eine Prävalenz für orale HPV-Infektionen von lediglich 7%. Auch hier fand sich eine Altersabhängigkeit der Prävalenz, wobei sich zwei Höhepunkte bildeten: der erste zwischen 30 und 34 Jahren und der zweite zwischen 60 und 64 Jahren (Hariri et al., 2011). Die unterschiedlichen Prävalenzen von zervikalen und oralen HPV-Infektionen

lassen sich bei ähnlichen Selbstheilungsraten am ehesten durch die unterschiedliche Anzahl an Sexualpartnern erklären, die in den USA für oralen Kontakt gerade einmal halb so groß ist wie die für vaginalen Kontakt. Es ist allerdings zu beachten, dass die Prävalenz für orale HPV-Infektionen bei Männern dreifach höher ist als bei Frauen, was nicht nur durch Unterschiede der sexuellen Praktiken zu erklären ist, sondern auf weitere Risikofaktoren hindeutet, wie etwa eine genetische Prädisposition oder den Konsum von Tabak und einer damit einhergehenden lokal geschwächten Immunkompetenz (Pickard et al., 2012). Sowohl für zervikale als auch für orale HPV-Infektionen ist der HPV-Typ 16 der klinisch bedeutsamste. Während ca. 60% der Cervixkarzinome HPV-16-DNA tragen (de Sanjose et al., 2010), sind es bei HNSCC sogar 80-100%, andere Typen sind hier äußerst selten (Kreimer et al., 2005; St Guily et al., 2011). Im Gegensatz zu den Cervixkarzinomen besteht für HNSCC noch keine klinisch etablierte Infrastruktur für das Screening nach oralen HPV-Infektionen, da der Beitrag der persistenten viralen Infektion zur Tumorentwicklung noch nicht abschließend verstanden ist (Gillison et al., 2014). Während die Anzahl der Sexualpartner momentan auch weiterhin als stärkster Risikofaktor gilt, diskutieren neuere Studien auch relevante, nicht-sexuelle Infektionswege wie die Speichelübertragung beim Küssen (D'Souza et al., 2009). Der molekulare Mechanismus, mit dem das HPV zur Karzinogenese beiträgt, ist noch nicht abschließend geklärt. Eine Rolle hierbei scheinen die viralen Onkogene des HPV, E6 und E7, zu spielen. Dyson et al. konnten erstmals eine Interaktion des HPV-16-E7-Proteins mit dem Genprodukt (pRb) des Tumorsuppressorgens Retinoblastomgen (Rb) nachweisen. Es wurde gezeigt, dass das E7-Protein in der Lage ist, spezifisch an das hypophosphorylierte pRb zu binden und einen Komplex zu bilden, was dazu führt, dass der sonst von pRb kontrollierte Transkriptionsfaktor E2F dauerhaft aktiv sein kann, was seinerseits wiederum in einer unkontrollierten Progression des Zellzyklus resultiert (Dyson et al., 1989). Später fand man heraus, dass das E7-Protein durch einen weiteren, Ubiquitin-Proteasom-assoziierten Mechanismus die Degradation von pRb verursacht und auch auf diese Weise eine unkontrollierte Proliferation der infizierten Zellen unterstützt, welche konsekutiv mit einem erhöhten Risiko für maligne Neoplasien einhergeht (Boyer et al., 1996). Das E6-Protein hingegen zeigt eine größere Interaktion mit dem Genprodukt des Tumorsuppressorgens p53. So wurde 1990 eine Studie publiziert, welche zeigen konnte, dass das E6-Protein an das zelluläre p53-Protein binden und einen Komplex

bilden kann. Diese Fähigkeit ist unter den verschiedenen HPV-Typen inhomogen vertreten, sie korreliert jedoch *in vitro* mit der transformierenden Aktivität der unterschiedlichen HPV-Typen und *in vivo* mit dem klinischen Verhalten der Tumoren (Werness et al., 1990). Auch in Bezug auf das E6-Protein konnte später ein weiterer, ebenfalls Ubiquitin-abhängiger Mechanismus entdeckt werden, wobei die HPV-Typen 16 und 18 das zelleigene Proteasom-System zur selektiven Proteindegradation nutzen. Hierbei bildet E6 mit einem E6-assoziierten Protein (E6-AP) einen Komplex, welcher wiederum zur schnellen Ubiquitinierung und Proteasom-Degradation von p53 führt (Scheffner et al., 1993). Insgesamt scheint E7 das potentere Onkogen im Vergleich zu E6 zu sein (Strati and Lambert, 2007). So entwickelten speziell genmodifizierte Mäuse mit einer Überaktivität von E7 deutlich schneller Plattenepithelkarzinome als diejenigen, in denen E6 überaktiviert war (9 Monate gegenüber 6 Monaten) (Riley et al., 2003; Shai et al., 2007). Gleichzeitig konnte in einem Mausmodell eine synergistische Wirkung von E6 und E7 nachgewiesen werden. Die Aktivität beider Onkogene ließ hierbei mehr invasive Karzinome entstehen als die Aktivität eines einzelnen der beiden Onkogene alleine (Jabbar et al., 2010). Mutationen, die zu einer verminderten Interaktion der Onkogene führen, gehen hingegen mit einem verminderten onkogenen Potential einher (Nguyen et al., 2002).

1.3 Physiologische Stammzellen und die Tumorstammzelltheorie

Im Laufe eines menschlichen Lebens müssen viele funktionelle, endgültig ausdifferenzierte Zellen ersetzt werden, welche selbst nicht in der Lage sind, eine Zellteilung zu durchlaufen. Stattdessen differenzieren sie aus Vorläuferzellen, sogenannten Progenitorzellen, welche als Pool vorgehalten werden. Dieser wiederum wird durch Stammzellen (SC) unterhalten, welche durch asymmetrische Teilung sowohl neue Progenitorzellen produzieren, die sich über Vorläuferzellteilungen ausdifferenzieren können, als auch den eigenen Bestand an Stammzellen aufrechterhalten. Eine besondere Bedeutung kommt hierbei dem blutbildenden System zu, da die hier gebildeten nicht-teilungsfähigen Erythrozyten eine durchschnittliche Lebensdauer von 120 Tagen haben und ein kontinuierlicher Nachschub eine lebenswichtige Notwendigkeit darstellt. Es ist deshalb nicht verwunderlich, dass die Existenz von Stammzellen zuerst im hämatopoetischen

System des Knochenmarks postuliert (Maximow, 1909) und später auch nachgewiesen (McCulloch et al., 1965) wurde.

Stammzellen besitzen zwei sie definierende Eigenschaften: die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und zur Differenzierung. Die aus der asymmetrischen Zellteilung hervorgehenden Progenitorzellen wiederum sind charakterisiert durch ihre teilweise noch vorhandene Regenerationsfähigkeit der Stammzellen. Gleichzeitig ist ihr Differenzierungsschicksal für einen späteren Funktionsbereich schon determinierter.

Je nachdem, wie vielfältig die Möglichkeiten zur Ausdifferenzierung der entstandenen Progenitorzellen sind, bezeichnet man Stammzellen als toti-/omni-, pluri-, multi- oder unipotent. Als toti- oder onnipotent werden Stammzellen bezeichnet, aus denen sich alle Zellarten eines Organismus entwickeln können. Beim Menschen besitzen diese Omnipotenz lediglich die befruchtete Eizelle und die Zellen im frühen Blastomerstadium (8-Zell-Stadium). Der Embryoblast, die innere Zellschicht der Blastozyste, verfügt bereits nur noch über Pluripotenz. Seine Zellen können sich in Zellen aller drei Keimblätter (Ektoderm, Mesoderm und Endoderm) und der Keimbahn differenzieren. Diese Zellen werden deshalb auch als embryonale Stammzellen bezeichnet, wohingegen die adulten multi- und unipotenten Stammzellen auch noch im hohen Alter im menschlichen Körper zu finden sind.

Während zum Beispiel die multipotenten hämatopoetischen Stammzellen (HSC) in ihrer Potenz lediglich auf die Bildung von Blutzellen der myeloischen und lymphatischen Reihe beschränkt sind, können sich unipotente Stammzellen wie die Stammzellen der Epidermis in nur einen einzigen Zelltyp ausdifferenzieren.

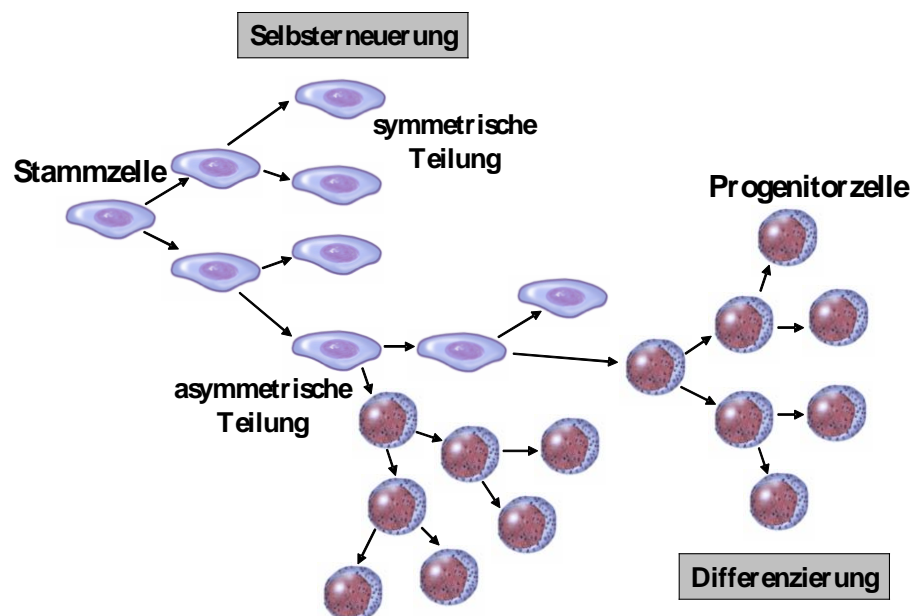


Abbildung 1: Asymmetrische Zellteilung. Stammzellen teilen sich zur eigenen Selbsterneuerung (symmetrische Teilung) und zur Produktion ausdifferenzierter, spezialisierter Tochterzellen (asymmetrische Teilung) (Abbildung modifiziert nach Ho und Wagner 2007).

HSCs sind im menschlichen Körper zum Großteil im Knochenmark zu finden. Sie sind eingebettet in ein Netzwerk aus Zellausläufern und Zelloberflächen von stromalen und akzessorischen Zellen sowie der extrazellulären Matrix (Krebsbach et al., 1999). Zu den stromalen Zellen werden Osteoklasten, endotheliale Zellen, Stromazellen und Adipozyten gezählt, zu den akzessorischen Zellen T-Zellen und Makrophagen. Die extrazelluläre Matrix (ECM) besteht aus Kollagen, Fibronectin, Hyaluronsäure, Laminin, Proteoglykanen und Glykoproteinen. Diese direkte Umgebung der HSC nennt man „Mikroumgebung“ oder „Stammzellnische“, wobei dieser Begriff erstmals von Schofield eingeführt wurde (Schofield, 1978). Die Definition dieses Begriffs ist nicht eindeutig, konsensuell lässt er sich als eine Teilmenge an Gewebszellen und extrazellulären Substraten verstehen, welche in der Lage sind, zeitlich unbegrenzt eine oder mehrere SCs beherbergen und ihre Selbsterneuerung und Vorläuferfunktion *in vivo* kontrollieren zu können (Spradling et al., 2001). HSCs liegen jedoch nicht ausschließlich im Knochenmark, sondern wurden auch im sinusoidalen Endothel der Milz und in geringerem Maße auch im Endosteum gefunden, was zeigt, dass die Fähigkeit zur Bereitstellung einer Stammzellnische keine exklusive Eigenschaft des Knochenmarks zu sein scheint (Kiel et al., 2005). Um den Nachweis einer Stammzellnische zu erbringen, müssen streng genommen Stammzellen entnommen und wieder hinzugefügt werden können. Gleichzeitig sollte die Nische in Abwesenheit von residenten SCs erhalten bleiben und eine eventuell vorhandene SC-Aktivität von exogenen Zellen unterstützen können. Auch die Aufnahme von exogenen Zellen in das intakte Nischen-Gewebe ist möglich. Vor der Akzeptanz solcher Donor-Zellen steht jedoch in der Regel der Verbrauch der endogenen SCs. Durch das Besetzen von leeren, teilweise gefüllten oder ektopen Nischen oder durch das Ersetzen von endogenen SCs können die exogenen Zellen dann bisweilen als SCs funktionieren (Spradling et al., 2001). Ein Beispiel für erfolgreiche Ex- und Replantationsversuche von SCs aus und in die Stammzellnische sind die Nischen der Keimbahn-Stammzellen (GSCs) in den Samenkanälchen des Hodens (Brinster and Zimmermann, 1994). Grundsätzlich können zwei verschiedene Funktionsarten unterschieden werden, durch welche die Stammzellnischen die Entwicklung der SCs beeinflussen können. Sogenannte „Abstammungs-Nischen“ sind präzise auf die individuelle SC-Teilung und das Schicksal der beiden Tochterzellen spezialisiert.

Bei der Zellteilung wird das Stroma durch die SC nur asymmetrisch kontaktiert. Durch die Ausrichtung der Teilungsebene wird sichergestellt, dass nur eine der beiden Tochterzellen den Adhäsiv-Kontakt zur Basalmembran erbt. Sie wird in der Nische gehalten und behält ihre SC-Eigenschaften, die andere Tochterzelle wird abgenabelt und entfernt sich von den Stromazellen und ihren Signalen, was ihr die Möglichkeit zur Differenzierung verleiht (Spradling et al., 2001). Im Gegensatz dazu können bei „Populations-Nischen“ beide Tochterzellen das SC-Potential behalten oder aber sich beide differenzieren. Experimentell können die beiden Nischen-Typen durch SC-Markierung und nachfolgende Abstammungsstudien untersucht werden (Bjerknes and Cheng, 1999). Während bei Abstammungs-Nischen die Anzahl der markierten SCs unverändert bleibt, wird sich der Markierungscharakter der SC in einer Nische bei einem Populationsmechanismus auf Dauer homogenisieren (Spradling et al., 2001). Die Regulierung der Ausmaße der Stammzellnischen unterliegt verschiedenen Signalen und Regelkreisen, die noch nicht abschließend verstanden sind. So duplizieren sich die Krypten der Darmschleimhaut durch Verzweigung (Bjerknes et al., 1997), wahrscheinlich nach Überschreitung eines endogenen Schwellenwertes der Anzahl an Stammzellen oder Stroma-Zellen (Wright, 2000). Aber auch exogene Signale wie *hedgehog* (Hh) (Zhang and Kalderon, 2001) und Wnt (Gat et al., 1998) können im Drosophila-Modell die Größe der SC-Nischen erweitern und eventuell auch neue Nischen kreieren. Durch die Veränderung der regulatorischen Eigenschaften einer Nische kann der Organismus seine SC-Aktivität den gegebenen Bedingungen der Umwelt anpassen. Als Antwort auf eine lokale Verwundung können SCs proliferieren und einen größeren Pool zur Regeneration zur Verfügung stellen (Taylor et al., 2000).

In den letzten Jahren ist eine Subpopulation an Zellen in den Fokus der onkologischen Forschung gerückt. Diese sogenannten Tumorstammzellen oder Krebsstammzellen (*cancer stem cells*, CSCs) zeigen eine erhöhte Resistenz gegen chemotherapeutische Agentien und Strahlentherapien (Mannelli and Gallo, 2012; Wicha et al., 2006). Zusätzlich scheinen sie Fähigkeiten von somatischen Stammzellen zu besitzen wie etwa die Selbsterneuerung, die Differenzierung und die Proliferation. Dadurch sind sie in der Lage, sowohl die Initiation des neoplastischen Wachstums als auch die Aufrechterhaltung der Tumormasse und lokale Rezidive zu unterhalten. Die hohe Rezidivrate nach einer Chemo- oder Bestrahlungstherapie von Patienten mit HNSCC könnte ein Hinweis für die bedeutsame Rolle von CSCs in der

Pathophysiologie von HNSCC sein (Carvalho et al., 2005). Während die Masse an Tumorzellen gegenüber der antineoplastischen Therapie exponiert ist und zugrundegeht, scheinen CSCs eine erhöhte Resistenz gegenüber diesen herkömmlichen Therapien aufzuweisen und sie überleben zu können (Mack and Gires, 2008). Dadurch sind sie im Anschluss in der Lage, nach einer primären Remission neue Tumore zu initiieren und damit lokale Rezidive und (Fern)metastasen zu verursachen. CSCs machen im Bezug zur Masse des gesamten Tumors lediglich weniger als zehn Prozent aus (Ailles and Prince, 2009). Der Arbeitskreis der *American Association for Cancer Research* (AACR), welcher sich mit der CSC-Hypothese befasste, definiert sie jedoch als diejenigen Zellen innerhalb des Tumors, welche durch Selbsterneuerung und Differenzierung verschiedene Zelltypen derselben Zellreihe innerhalb des Tumors bilden und somit seine phänotypische Heterogenität sicherstellen können. Hierarchisch gesehen stehen sie damit also an der Spitze der Tumorzellen (Prince et al., 2007). Die Existenz von CSCs wurde schon länger postuliert, die ersten Hinweise dafür fanden sich jedoch zunächst nur in hämatologischen Malignitäten wie der akuten myeloischen Leukämie (AML) (Bonnet and Dick, 1997). Erst 2003 gelang der Nachweis von CSCs auch in soliden Tumoren (Al-Hajj et al., 2003), ihr Nachweis in HNSCC folgte 2007 (Prince et al., 2007).

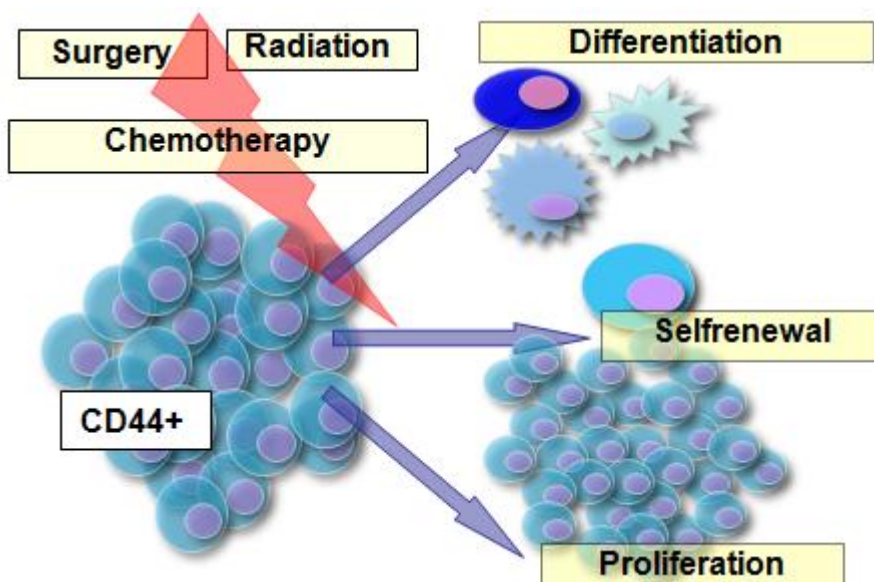


Abbildung 2: Nach einem initialen Niedergang der breiten Tumormasse sind CSCs, hier als CD44-positive Zellen dargestellt, in der Lage, durch Differenzierung, Selbsterneuerung und Proliferation Rezidive zu verursachen (Abbildung modifiziert nach Prince et al, 2007)

Prince und Kollegen nutzten hierfür den CSC-Marker CD44, womit ihnen die Anreicherung einer Subpopulation an Tumorzellen gelang, die in der Reihentransplantation in der Lage waren, in immunsupprimierten Mäusen neue Tumore zu formen, wohingegen das tumorgene Potential bei CD44-negativen Zellen nicht vorhanden zu sein schien (Prince et al., 2007). Inzwischen konnten mithilfe verschiedener CSC-Marker wie CD133 und ALDH1 Korrelationen zwischen dem vermehrten Vorhandensein von CSCs in soliden Tumoren und einem verschlechterten klinischen Outcome nachgewiesen werden. Hierunter ist eine erhöhte Rate an lokalen Rezidiven, eine erhöhte Resistenz gegen Bestrahlungs- und Chemotherapien und eine insgesamt schlechtere Überlebensrate zu verstehen (Chen et al., 2010; de Jong et al., 2010; Ginestier et al., 2007; Zhang et al., 2010).

Um die erhöhte Resistenz von CSCs gegenüber Chemotherapeutika und Strahlungstherapien verstehen und einen therapeutischen Ansatzpunkt finden zu können, ist es notwendig, nach Analogien zu den normalen, physiologischen SCs des Menschen zu suchen. Zur Resistenzvermittlung bei physiologischen SCs leisten die sie umgebenden Stammzellnischen einen wichtigen Beitrag. Von diesen „vaskulären Nischen“ (Ramirez-Castillejo et al., 2006; Shen et al., 2004) wird angenommen, dass sie die SCs von apoptotischen Stimuli abschirmen und ihnen erlauben, eine angemessene Balance zwischen Selbsterneuerung und Differenzierung zu finden. Dies gelingt unter anderem über Faktoren, die von den Endothelzellen, welche die benachbarten Blutgefäße auskleiden, sezerniert werden. Sie fördern das SC-Überleben und deren Selbsterneuerung und werden als eine Schlüsselkomponente der SC-Nische angesehen (Yang and Wechsler-Reya, 2007). Aufgrund der funktionellen Ähnlichkeit zwischen physiologischen SCs und den CSCs erscheint es naheliegend, dass auch die CSCs eine Mikroumgebung besitzen, welche ihre Selbsterneuerung und Expansion mittels kommunikativer Signale unterhält – eine Tumorstammzellnische.

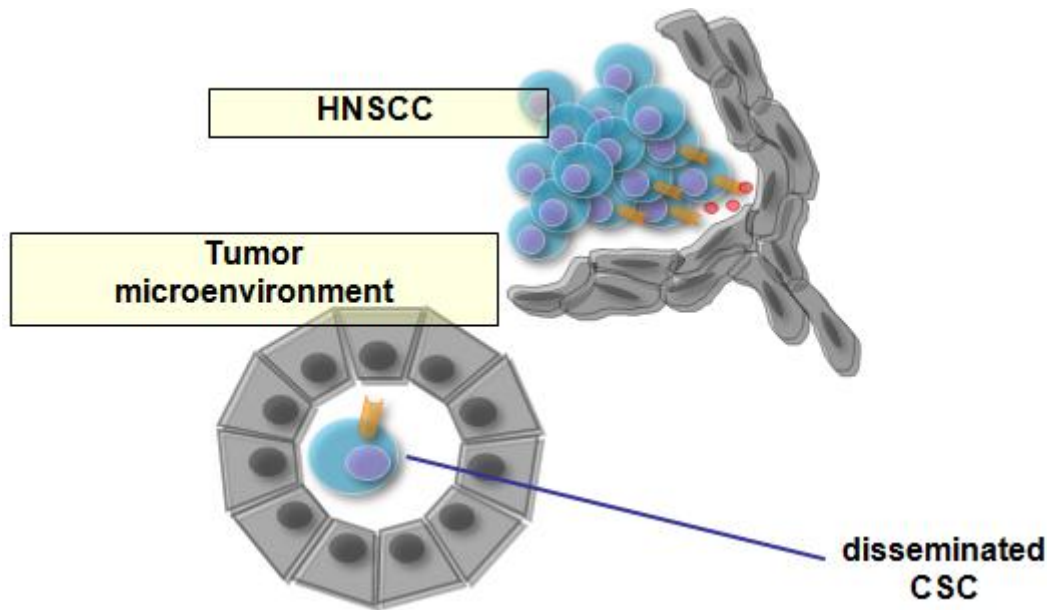


Abbildung 3: CSCs kommunizieren mit der Mikroumgebung des Tumors und wirken so an der Aussaat von Metastasen mit (Abbildung modifiziert nach Trumpp et al., 2008)

Eine Untersuchung zeigte, dass CSCs in Gehirntumoren, ähnlich den physiologischen SCs, ebenfalls in vaskulären Nischen liegen. Kultiviert man diese CSCs *in vitro* mit humanen Endothelzellen (EC), so assoziieren sich diese schnell und selektiv mit ihnen, nicht jedoch mit den restlichen Zellen der Tumormasse. Gleichzeitig fördern die ECs die Selbsterneuerungskapazität der CSCs *in vitro*. Nach Transplantation in immunkompromittierte Mäuse formten Medulloblastomzellen in Co-Transplantation mit ECs schneller und größere Tumore als ohne eine Co-Transplantation (Kontrolle). Die Tumore mit EC-Co-Transplantation enthielten außerdem 25mal mehr CSCs als die Kontroll-Tumore (Calabrese et al., 2007). Das Verhältnis von CSCs und Stammzellnische scheint nicht unidirektional und parasitär zu sein, sondern vielmehr bidirektional und synergistisch. Während die Nische das Wachstum und die Selbsterneuerung der CSCs unterstützt, sezernieren beispielsweise Glioma-Zellen deutlich erhöhte Level an *vascular endothelial growth factor* (VEGF). VEGF wiederum ist ein kritischer Regulator für das Überleben und die Proliferation von ECs und erhöht deren Formation und Podienbildung signifikant. Es kann also spekuliert werden, ob sich CSCs teilweise nicht nur in präformierte Stammzellnischen einnisten, sondern die Bildung einer eigenen Nische aktiv fördern (Bao et al., 2006). Die aktive Rekrutierung von Zellen der Stammzellnische durch Tumorzellen ist auch in anderen Tumorentitäten bekannt. Ein Beispiel hierfür sind Brustkrebszelllinien, welche von Pittenger et al. in Ratten transplantiert wurden. Nach der Infusion mesenchymaler Stammzellen (MSC), welche eine bedeutende Rolle für

die Entwicklung (Hall et al., 2007) und das Wachstum (Bissell and Radisky, 2001) von Tumoren spielen, lagerten sich diese spezifisch an die sich entwickelnden Tumore an. Gleichzeitig fanden sich in benachbarten Geweben keine infundierten MSCs (Pittenger et al., 1999). Weitere Malignitäten, bei denen eine ähnliche Rekrutierung nachgewiesen werden konnte, sind das Gliom (Nakamizo et al., 2005; Nakamura et al., 2004), das Kolonkarzinom (Hung et al., 2005; Menon et al., 2007), das Ovarialkarzinom (Komarova et al., 2006), das Kaposi-Sarkom (Khakoo et al., 2006) und das Melanom (Studený et al., 2002). Auffällig ist hierbei der neoplastische Missbrauch von vorgefertigten, physiologischerweise benötigten Systemen und Signalwegen innerhalb des menschlichen Körpers. So werden normalerweise nach einer Verletzung oder einer Entzündung durch das betroffene Gewebe endokrine Signale freigesetzt, welche ins Knochenmark gelangen und dort die Mobilisation von multipotenten mesenchymalen Stammzellen stimulieren, welche anschließend an das geschädigte Gewebe rekrutiert werden (Fox et al., 2007). Dort sind sie zusammen mit Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Matrix-remodellierenden Proteinen (Park et al., 2000) an der Wundheilung und Narbenbildung beteiligt (Gregory et al., 2005). Ergebnisse aus verschiedenen Tumor-Stammzellnischen-Modellen lassen vermuten, dass die Invasion und die Metastasierung der Primärtumore stark durch Kontext-Signale beeinflusst werden, welche von dem umgebenden Stroma ausgehen. Karzinomzellen, welche dieser Signale depriviert werden, können teilweise sogar zu einem phänotypisch früheren und niedriger malignen Stadium zurückkehren (Thiery, 2002). Medulloblastome zeigen häufig eine Überexpression des Onkogens ERBB2 (Gajjar et al., 2004), was wiederum zu einer vermehrten Produktion und Sekretion des proangiogenetischen VEGFs führt (Saucier et al., 2004). Übereinstimmend mit der oben formulierten Rolle, welche die ECs für den Erhalt der CSCs spielen, formen Medulloblastom-Zellen, die ERBB2 überexprimieren, schneller Tumore als Kontrollzellen, gleichzeitig enthalten die gebildeten Tumore einen höheren Anteil an CSCs (Calabrese et al., 2007). Dies unterstreicht ebenfalls die synergistischen Effekte zwischen CSCs und Stammzellnische. Die Inhibition von entweder ERBB2 oder VEGF führt zu einer drastischen Reduzierung der Anzahl der CSCs und der Wachstumsrate des Tumors, ohne jedoch einen Einfluss auf die Proliferation und das Überleben der restlichen Tumorzellen zu nehmen. Es kann also suggeriert werden, dass die Wirkung spezifisch auf CSCs ist (Calabrese et al., 2007).

Antiangiogenetische Therapien sind bereits verfügbar und Studien zeigen, dass die Verhinderung des Wachstums von neuen Blutgefäßen auch das Tumorwachstum selbst behindern können, der dahinterstehende Mechanismus bleibt jedoch umstritten (Jain, 2001; Lin and Sessa, 2004). Möglicherweise werden hierdurch die Signalwege innerhalb der Stammzellnische regulierend beeinflusst, sodass an dieser Stelle ein möglicher Ansatzpunkt der CSC-gezielten Therapie zu vermuten ist.

Auch ohne das vollständige Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen konnte bereits gezeigt werden, dass Angiogenese-Inhibitoren effektiv in der Tumorbekämpfung eingesetzt werden können (Emmanouilides et al., 2004), und dass die Kombination von Chemotherapien mit antiangiogenetischen Therapien effektiver ist als Monotherapien mit nur einem der beiden Ansätze (Tozer et al., 2005).

Reziproke Interaktionen zwischen den physiologischen Nischen-Zellen, ihren Mediatoren, den strukturellen Komponenten der extrazellulären Matrix und den genetisch veränderten neoplastischen Zellen regulieren alle Aspekte der Tumorentwicklung (Mueller and Fusenig, 2004; Tlsty, 2001).

Die dreidimensionale Architektur und Organisation der extrazellulären Matrix und des Stromas, welche die Zellen in allen Geweben umgeben, unterliegt einem ständigen dynamischen Umbauprozess. Die Balance von Synthese und Abbau der ECM-Moleküle ist ein wichtiger Aspekt der Gewebemöostase und beeinflusst die Zellantwort auf akuten und chronischen Stress. Störungen dieser Homöostase können die Zellphysiologie verändern und Krankheiten verursachen. So wurde in verschiedenen ultrastrukturellen Studien mit immunhisto- und biochemischen Analysen gezeigt, dass das Stroma bei kritischen Schritten der neoplastischen Entwicklung ebenfalls verändert ist (Ronnov-Jessen et al., 1996; van den Hooff, 1988). Beispiele für diese Stromaveränderungen in der malignen Transformation sind die vermehrte Expression von Proteinen wie α -Aktin 2, Vimentin, Myosin, Calponin, Tenascin und Desmin (Mackie et al., 1987; van den Hooff, 1988). Diese Proteine werden vermehrt bei der Wundheilung oder bei Entzündungen exprimiert und führen zu einer vermehrten Produktion verschiedener Proteine, welche ein Programm zur mesenchymalen Differenzierung widerspiegeln (Sappino et al., 1990).

Ein wichtiger Bestandteil des Stromas sind die Fibroblasten, welche für Synthese, Bereitstellung und Remodellierung der ECM verantwortlich sind. Weiterhin produzieren sie die löslichen parakrinen Faktoren, die Zellproliferation,

-morphologie, -überleben und -tod regulieren. Wurden sie früher noch als passive Betrachter der neoplastischen Entwicklung angesehen, konnte inzwischen gezeigt werden, dass sie zusammen mit inflammatorischen Zellen einen aktiven Beitrag zur neoplastischen Umprogrammierung von Geweben leisten können (Allinen et al., 2004; Tlsty, 2001). Sie durchlaufen zusammen mit der Tumorprogression dynamische Veränderungen (Bhowmick and Moses, 2005; Bhowmick et al., 2004), weisen einen höheren Proliferationsindex als in gesundem Gewebe auf, zeigen ein typisches Proteinexpressionsmuster und sind häufig von dichten Anhäufungen von fibrillären Kollagenen umgeben (Sappino et al., 1990; Willis, 1967).

Barcellos-Hoff und Kollegen konnten zeigen, dass exogene Karzinogene ihre tumorgene Wirkung nicht nur direkt auf die später zu transformierenden Zellen ausüben, sondern auch über die Beeinflussung von sie umgebenden Zellen. Die Exposition von Stromazellen gegenüber Karzinogenen erleichterte die Tumorprogression von transformierten Epithelzellen, welche in das vorbehandelte Stroma implantiert wurden (Barcellos-Hoff and Ravani, 2000).

Auch endogene Mutationen in Stromazellen können eine Tumorerkrankung sekundär auslösen. Ein Beispiel hierfür ist die juvenile Polyposis des Kolons. Hierbei wurden Deletionen in den Chromosomen 10 und 18 von Stromazellen gefunden, nicht jedoch in den Epithelzellen (Howe et al., 1998; Jacoby et al., 1997).

Karzinom-assoziierte Fibroblasten zeigen außerdem veränderte Phänotypen mit einer verstärkten Produktion von Kollagenen, Hyaluronsäuren und epithelialen Wachstumsfaktoren (Bauer et al., 1979; Knudson et al., 1984) sowie ein unorganisiertes Wachstumsmuster (Rasmussen and Cullen, 1998; van den Hooff, 1988). Auch für Neoplasie-fördernde Signale gibt es Hinweise auf eine Bidirektionalität zwischen den Tumorzellen und dem umgebenden Gewebe. Es gibt Hinweise, dass Tumorzellen Fibroblasten stimulieren. Gesunde Fibroblasten, welche mit Tumorzellen inkubiert wurden, konvertierten zu α -Aktin 2-exprimierenden Zellen. Dies lässt vermuten, dass es Faktoren gibt, welche vom Tumor ausgehen und die Reprogrammierung der Fibroblasten modellieren (Ronnov-Jessen et al., 1995).

Ein möglicher Kandidat für solch einen Faktor ist TGF β . Er wird häufig von Tumorzellen produziert und induziert die Produktion von α -Aktin 2 und Kollagen in kultivierten Fibroblasten (Roberts et al., 1986). Der Einfluss des den Tumor umgebenden Gewebes ist jedoch keinesfalls immer eindeutig. Abhängig von den Charakteristiken der Tumorzellen können Fibroblasten sowohl einen fördernden als

auch einen inhibierenden Einfluss auf die Entwicklung und Progression des Tumors haben (Atula et al., 1997; Camps et al., 1990; Gleave et al., 1991).

Unumstritten ist, dass ein Tumor im menschlichen Körper keinesfalls isoliert liegen und überleben kann, sondern in ständigem Kontakt und in Kommunikation mit den ihn umgebenden Strukturen steht. Dabei scheinen besonders die CSCs von den protektiven Einflüssen ihrer Stammzellnische zu profitieren.

1.4 Die SDF-1 α /CXCR4-Achse

Der *stromal-cell-derived-factor 1 α* (SDF-1 α) gehört zur Gruppe der chemotaktischen CXC-Zytokine (Chemokine), welche die Migration von Zellen aktivieren und dirigieren (Springer, 1995). SDF-1 α wird von einer Vielzahl von Geweben exprimiert und sezerniert, zum Beispiel von Endothel- und Stromazellen (Dar et al., 2005; Faber et al., 2007), aber auch von Herz-, Gehirn-, Lungen-, Nieren- und Leberzellen (Tashiro et al., 1993). SDF-1 existiert in den Isoformen SDF-1 α und SDF-1 β . Beide entstehen aus dem gleichen Gen durch alternatives Spleißen von 282 Nukleotiden, wobei SDF-1 α aus drei Exons kodiert wird, SDF-1 β aus vier. Hieraus resultiert bei SDF-1 α eine Länge von 89 Aminosäuren (24-88) und bei SDF-1 β von 93 Aminosäuren (24-93) mit einer Verlängerung am Carboxy-terminalen Ende (De La Luz Sierra et al., 2004).

Im Gegensatz zu anderen Chemokinen, deren Gene auf den Chromosomen 4q oder 17q liegen, ist das SDF-1-Gen auf Chromosom 10q zu finden. Daher lässt sich vermuten, dass SDF-1 eine Sonderstellung innerhalb der Gruppe der Chemokine einnimmt und auch Funktionen hat, die über die Chemotaxis hinausgehen. Das 5'-Ende des SDF-1-Gens wird von Guanin und Cytosin-reichen Sequenzen flankiert, was bei sogenannten Haushaltsgenen bekannt ist. Dies passt zur ubiquitären Expression von SDF-1. Gleichzeitig ist SDF-1 außergewöhnlich gut zwischen den Spezies konserviert, mit einzig einem Ersatz von Isoleucin zu Valin zwischen Maus und Mensch (Shirozu et al., 1995).

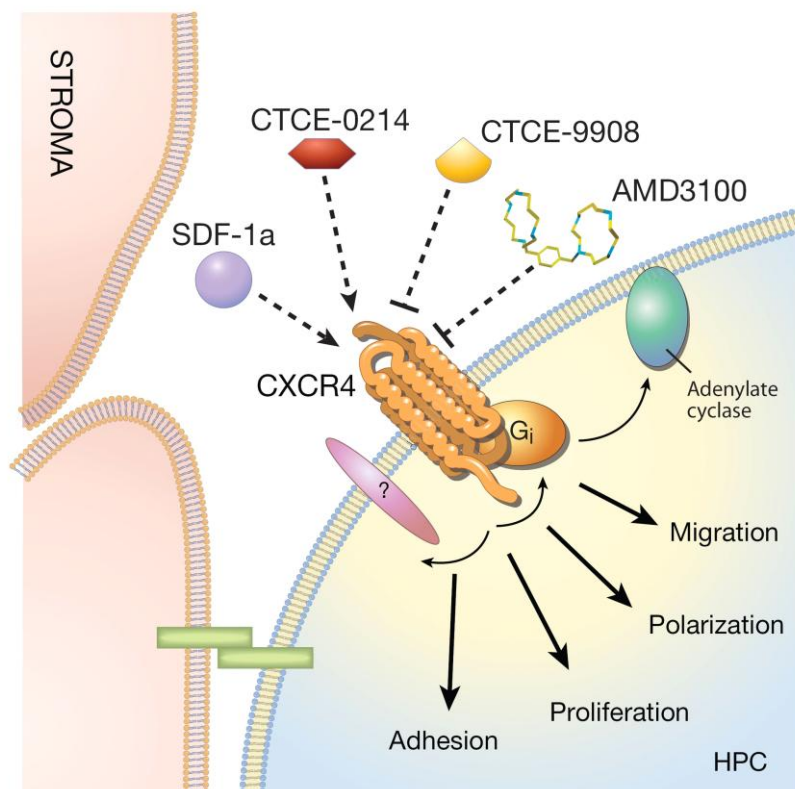


Abbildung 4: Die SDF-1alpha/CXCR4-Achse. Das Zytokin stromal cell derived factor-1alpha (SDF-1alpha oder CXCL12) wird von Stromazellen sezerniert und hat eine Vielzahl von Effekten. Seine Bindung erfolgt am CXCR4-Rezeptor. Diese Interaktion kann durch Peptid-Agonisten wie CTCE-0214, sowie Peptid-Antagonisten wie CTCE-9908 oder Nichtpeptid-Antagonisten wie AMD3100 beeinflusst werden (Faber et al., 2007)

Ihre zelluläre Wirkung entfalten Chemokine über G-Protein-gekoppelte 7-Transmembranrezeptoren (Baggiolini et al., 1994). Der Rezeptor von SDF-1α ist der Chemokinrezeptor CXCR4. Erstmals als solcher bezeichnet und in Zusammenhang mit SDF-1α beschrieben wurde er 1996 von Bleul et al. (Bleul et al., 1996). Bis dahin war er als „Waisen-Rezeptor“ bekannt - als Rezeptor ohne bekannten Liganden. So wurde er von verschiedenen Autoren unter anderem als HUMSTR (Federspiel et al., 1993), LCR1 (Jazin et al., 1993) und LESTR (Loetscher et al., 1994) bezeichnet. Das Wissen über ihn beschränkte sich auf die Tatsache, dass er von verschiedenen T-trophischen Viren als Eintrittsmediator in die Zelle benutzt wird (Choe et al., 1996; Doranz et al., 1996). In diesem Kontext ist CXCR4 heute auch als Korezeptor des *Human Immunodeficiency Virus* (HIV)-Typ 1 bekannt (Bleul et al., 1996). Bis 1996 war nur bekannt, dass der virale Eintritt des HIV-Typ 1 in humane Zellen durch den Rezeptor CD4 vermittelt wird (Maddon et al., 1986). Gleichzeitig war die virale Invasion in humane/nicht-humane CD4-positive

Hybridzellen nicht ohne weiteres möglich. Hieraus gelang die Schlussfolgerung, dass ein weiterer human-spezifischer Cofaktor für die Membranfusion des HIV-Typ 1 notwendig war (Weiner et al., 1991). Feng et al. gelang 1996 der Nachweis dieses Cofaktors in Form des heutigen CXCR4, welches sie damals noch als *fusin* bezeichneten (Feng et al., 1996). Fusin war der notwendige Cofaktor, den eine Zelle neben dem primären Rezeptor CD4 exprimieren musste, um eine Fusion der Zellmembran mit dem HIV-Typ 1 zu ermöglichen. Damit ist seine Expression auch eine Voraussetzung für die Infektion mit dem HIV-Typ 1. Bleul et al. brachten LESTR/fusin erstmals in Verbindung mit SDF-1 α und beschrieben das Zytokin als physiologischen Liganden für LESTR/fusin (Bleul et al., 1996), den heute als CXCR4 bezeichneten Rezeptor. Gleichzeitig beschrieben sie, dass SDF-1 α - an LESTR/fusin andockt - die intrazelluläre Aufnahme des HIV-Typ 1 blockiert. Ähnlich seinem Liganden findet sich CXCR4-mRNA in Gehirn, Herz, Niere und Lunge (Federspiel et al., 1993; Rimland et al., 1991). Von allen funktionalen Chemokinrezeptoren im menschlichen Körper ist CXCR4 am weitesten verbreitet (Bleul et al., 1996). Auch CXCR4 ist evolutionär und interspezifisch hoch konserviert (Doranz et al., 1996). Nach Bindung von SDF-1 α an CXCR4 wird G-Protein-vermittelt eine intrazelluläre Signalkaskade aktiviert, welche noch nicht ganz verstanden ist (Kremer et al., 2011). Unter anderem kommt es zum Anstieg des intrazellulären freien Calciums (Bleul et al., 1996). Weitere nachgewiesene intrazelluläre Vorgänge sind die Phosphorylierung von MAPK-p42/44 (Kijowski et al., 2001) sowie die Phosphorylierung von ERK1/2 (van Buul et al., 2003). Die Proteinphosphatase 2A (PP2A) scheint ebenfalls eine wichtige Rolle in diesem Signalweg zu spielen, da über sie das Ausmaß und die Dauer der Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) reguliert wird. Diese wiederum stellt ein wichtiges Molekül für eine effiziente Chemotaxis dar, indem es die Glykogensynthase-Kinase 3 (GK3) phosphoryliert und somit inaktiviert. PP2A selbst unterliegt einem Regulationsmechanismus durch die Phosphoinositid Phospholipase C (PLC) und die Phosphoinositid 3 Kinase (PI3K), welche beide G-Protein-vermittelt nach Bindung von SDF-1 α an CXCR4 aktiviert werden (Basu et al., 2007). Auch eine vermehrte Produktion und Sekretion des *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und der *matrix metalloproteinase 9* (MMP9) wurden beschrieben (Majka et al., 2000), was eine besondere Rolle von SDF-1 α in der Regulation der Interaktion der lymphohämatopoetischen Zellen mit ihrer hämatopoetischen Mikroumgebung nahelegt. Die Tatsache, dass verschiedene Agonisten und Antagonisten von SDF-1 α

unterschiedliche Wirkungen auf CXCR4 haben, legt nahe, dass es sich hierbei nicht um eine monokausale Fortführung des Signals handelt, sondern vielmehr um eine komplexe Interaktion verschiedener Signalwege (Faber et al., 2007; Goichberg et al., 2006; Petit et al., 2005). Unter steigenden SDF-1 α -Konzentrationen zeigt sich eine Umverteilung des CXCR4 an das in der Migration nach vorne gerichtete Ende der Zelle, welche über lipid-rafts vermittelt wird (van Buul et al., 2003). Weiterhin kommt es zur Internalisierung des SDF-1 α /CXCR4-Fusionsproteins (van Buul et al., 2003), welche durch das C-terminale Ende von CXCR4 vermittelt wird (Orsini et al., 1999). Dies hat eine wichtige Bedeutung für die Etablierung eines SDF-1 α -Gradienten, welcher die gerichtete Migration der Zellen ermöglicht (Dar et al., 2005). Als weiterer potentieller Rezeptor für SDF-1 α wird auch der Chemokinrezeptor CXCR7 diskutiert, dessen Rolle und intrazelluläre Signalwege allerdings noch nicht abschließend geklärt sind (Wang et al., 2008). SDF-1 α gilt bis heute als einzig nachgewiesener chemotaktischer Stoff für hämatopoetische Vorläuferzellen (HPC) (Faber et al., 2007; Kim and Broxmeyer, 1998; Mohle et al., 1998; Petit et al., 2005). Daher ist zu vermuten, dass SDF-1 α einer der Schlüsselregulatoren für den Verkehr von HPC zwischen der peripheren Zirkulation und dem Knochenmark ist (Chute, 2006).

Sowohl bei HPCs als auch bei Leukämiezellen induzierte SDF-1 α eine Polarisierung und die Ausbildung von Podien, beides Strukturmerkmale, die für eine zielgerichtete Lokomotion benötigt werden. An der führenden Seite der Zellen werden vermehrt Lamellipodien gebildet, welche langgestreckt und sehr variabel ausgeprägt sind. An der Gegenseite zeigt sich überwiegend ein Uropod, der einzeln liegt und prominent imponiert. Gleichzeitig kommt es zur Herunterregulierung der Genexpression der Chemokinrezeptoren CCR4, CXCR4 und CXCR5, welche alle mit der Motilität der Zelle assoziiert sind, was auf ein negatives Feedback schließen lässt (Fruehauf et al., 2002). Auf die Proliferation von hämatopoetischen Progenitorzellen zeigt SDF-1 α keinen nennenswerten Effekt (Kijowski et al., 2001). Sein Einfluss auf das Überleben oder die Apoptose von HPCs ist kontrovers diskutiert, wobei manche Autoren eine positive Beeinflussung diesbezüglich nachweisen konnten, andere Autoren jedoch nicht (Broxmeyer et al., 2003; Kijowski et al., 2001; Lataillade et al., 2000). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass SDF-1 α eine bedeutende Rolle in der embryonalen B-Zell-Lymphopoese und der Myeloopoese im Knochenmark spielt.

Gleichzeitig kommt es bei Mäusen mit SDF-1 α -Funktionsdefekten zu erhöhter perinataler Letalität und einem Nichtverschluss des kardialen Ventrikelseptums (Nagasawa et al., 1996). Der Einfluss von SDF-1 α ist demnach nicht nur auf das hämatopoetische System beschränkt. Die SDF-1 α /CXCR4-Achse ist in verschiedene Aspekte der Tumorprogression, wie Angiogenese, Metastasierung und Überleben der Zellen, involviert (Teicher and Fricker, 2010). So wird postuliert, dass Tumorzellen die SDF-1 α /CXCR4-Achse für ihre metastatische Verbreitung nutzen können (Burger and Kipps, 2006; Sipkins et al., 2005). Jin et al. konnten zeigen, dass die Endothelzellen der Mikroumgebung SDF-1 α sezernieren. Dieses kann gemeinsam mit dem *hypoxia-inducible-factor* (HIF) über die CXCR4-Aktivierung der Tumorzellen die Angiogenese und die transendotheliale Migration der Tumorzellen stimulieren (Jin et al., 2012).

In HNSCC-Zelllinien konnten die Zell-Polarisation und die Bildung von Filopodien sowie eines prominenten Uropods dosisabhängig unter SDF-1 α -Einfluss nachgewiesen werden (Faber et al., 2007), woraus sich möglicherweise ein erhöhtes Migrations- und damit Metastasierungspotential ableiten lässt. Diese Effekte werden unter anderem durch zytoskelettale Neuarrangements der Aktin-enhaltenden Protrusionen erklärt (Avigdor et al., 2004; Geutskens et al., 2012), diskutiert wird aber auch eine Beeinflussung durch extrazelluläre Faktoren wie Matrix-Metalloproteinasen (Ghosh et al., 2012). Zusammen mit der Ausbildung von Podien konnte eine vermehrte Zelladhäsion an die Mikroumgebung unter SDF-1 α -Einfluss gezeigt werden (Faber et al., 2007). Clatot et al. konnten demonstrieren, dass die intratumoralen Level von SDF-1 α positiv mit der Überlebensrate von HNSCC-Patienten korrelierten (Clatot et al., 2011). Bei Mäusen mit Brustkrebs zeigte sich eine erhöhte Expression und Sekretion von SDF-1 α in jenen Organen, welche als präferentielle Ziele für Brustkrebsmetastasen bekannt sind. Eine *in vivo* Neutralisation des CXCR4 resultierte in einer signifikanten Inhibition der Metastasierung der Brustkrebszellen in ihrer organspezifischen Art (Muller et al., 2001). Das Expressionsmuster von CXCR4 korrelierte signifikant mit dem Grad der Lymphknotenmetastasen, nicht jedoch mit dem der hämatogenen Metastasen (Kato et al., 2003). In nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen (NSCLC) zeigte sich eine Expression von CXCR4, nicht jedoch von SDF-1 α .

Im Mausmodell zeigten Zielorgane für NSCLC-Metastasen höhere Level an SDF-1 α als der Primärtumor, was die Generierung des chemotaktischen Gradienten verdeutlicht, gleichzeitig migrierten die Karzinomzellen unter SDF-1 α -Einfluss chemotaktisch. Auch hier konnten anti-SDF-1 α -Antikörper die NSCLC-Metastasierung inhibieren, ohne die Proliferation, die Apoptose-Neigung oder die Angiogenese des Primärtumors zu beeinflussen (Phillips et al., 2003).

Die Expression von SDF-1 α ist weiterhin reduziert im hepatozellulären Karzinom (Shibuta et al., 1997) und in verschiedenen anderen malignen Zelllinien wie der Cervix uteri, des Kolons, des Duodenums, des Magens, des Pankreas sowie in Leukämie- und Melanomzellen (Begum et al., 1996). Eine Hochregulierung der CXCR4-Expression findet sich außerdem in aggressiven Glioblastomazellen (Rempel et al., 2000; Sehgal et al., 1998). In anderen Tumorentitäten wie dem Nierenzellkarzinom werden sowohl erniedrigte SDF-1 α -Spiegel und erhöhte CXCR4-Expression beschrieben (Schrader et al., 2002) als auch erhöhte SDF-1 α -Spiegel und erhöhte CXCR4-Expression (Zagzag et al., 2005). In letzterem Fall wird allerdings der Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens von-Hippel-Lindau (vHL) mit daraus resultierender fehlender Hemmung von SDF-1 α für dessen Überexpression verantwortlich gemacht.

Grundsätzlich lässt sich zusammenfassen, dass in malignen Tumoren häufig CXCR4 hochreguliert und SDF-1 α herunterreguliert ist. Somit bildet sich ein chemotaktischer Gradient, der von den SDF-1 α -sezernierenden Zielstrukturen der Metastasierung zu den CXCR4-vermittelt-SDF-1 α -bindenden Tumorzellen abfällt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Zelllinien und Zellkultur

Die HPV-negativen HNSCC Zelllinien UM-SCC 11A (11A) und UM-SCC 14C (14C) wurden von Dr. T.E. Carey (Universität Michigan, Ann Arbor, MI, USA) zur Verfügung gestellt. Sie entstammen primären humanen Karzinomen des Larynx und des Oropharynx (Grenman et al., 1988). Die HPV-positive Zelllinie CERV196 (Cerv) wurde aus einem p16-positiven Plattenepithelkarzinom der Cervix uteri gewonnen (CLS, Eppelheim, Deutschland). Für HNSCC UM-SCC 11A und UM-SCC 14C wurde als Medium *Dulbecco's modified essential medium* (DMEM) (Fisher Scientific and Co., Pittsburgh, PA, USA) genutzt, ergänzt mit 10% fetalem Kalbserum (FCS) und Antibiotika (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA). Die CERV196-Zellen wurden in *Eagle's minimum essential medium* gehalten, mit 2 mM L-Glutamin, 10% FCS und *Earle's balanced salt solution* mit 1,5 g/l Natriumbikarbonat, 0,1 mM Aminosäuren und 1,0 mM Natriumpyruvat. Die Zellkulturen wurden bei 37°C in einer voll angefeuchteten Atmosphäre mit 5% CO₂ gezüchtet. Für die jeweiligen Inkubationen und Färbungen wurden 12er well-plates verwendet. Die jeweiligen Charakteristiken und *short tandem repeats* (STR)-Profile sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 1: Charakteristiken der verwendeten Zelllinien (nach (Brenner et al., 2010; Zhao et al., 2011); CLS GmbH, Eppelheim, Deutschland)

| | UM-SCC 14C | UM-SCC 11A | CERV196 |
|---------------------------|-----------------------------------|-------------------|---------------------------|
| HPV-Status | negativ | negativ | positiv |
| Ursprung | Mundboden-Karzinom, Hautmetastase | Larynx-Karzinom | Karzinom der Cervix uteri |
| ursprüngliches Geschlecht | weiblich | männlich | weiblich |
| Spezies | human | human | human |
| Alter bei Probengewinnung | 64 Jahre | 64 Jahre | 49 Jahre |

Tabelle 2: STR-Profile der verwendeten Zelllinien (nach (Brenner et al., 2010; Zhao et al., 2011); CLS GmbH, Eppelheim, Deutschland)

| STR-Profil | UM-SCC 14C | UM-SCC 11A | CERV196 |
|-------------------|-------------------|-------------------|----------------|
| Amelogenin | X | X | X |
| CSF1PO | 10 | 7 | 12, 13 |
| D13S317 | 12 | 14 | 8, 11 |
| D16S539 | 12 | 12, 14 | 12 |
| D18S51 | 15 | 16 | 14 |
| D21S11 | 29 | 28 | 30 |
| D3S1358 | 15 | 16 | 17 |
| D5S818 | 11,14 | 11 | 11 |
| D7S820 | 9,10 | 11 | 11, 12 |
| D8S1179 | 8, 13 | 12, 15 | 13 |
| FGA | 20, 21 | 19, 24 | 20 |
| Penta D | 12, 16 | n.a. | 12 |
| Penta E | 7 | n.a. | 12, 16 |
| TH01 | 6, 8 | 7 | 6 |
| TPOX | 8 | 8 | 8 |
| vWA | 14, 18 | 16, 17, 18 | 14 |

2.2 Expressionsuntersuchungen

2.2.1 Immunhistochemische Färbung

Um die Expression des CSC-Oberflächenmarkers CD44 und des SDF-1 α -Rezeptors CXCR4 in den drei Zelllinien nachzuweisen erfolgte zur Hemmung der endogenen Peroxidase-Aktivität zunächst die Behandlung der Zellen mit einem Peroxidase-Block (Fa. Dako, Glostrup, Dänemark) für 30 min in einer feuchten Kammer.

In Folge wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 10%igem Normalserum (Schaf) in einer feuchten Kammer für 30 min inkubiert.

Die Zellen wurden weiterhin mit einem CD44- bzw. CXCR4-Primärantikörper inkubiert und für 12 h in einer feuchten Kammer gehalten. Nach weiteren Reinigungsbehandlungen mit PBS erfolgte die Inkubation mit einem sekundären, biotinylierten Antikörper (Anti-Maus, 1:100, Fa. GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, UK) für 45 min bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer. Anschließend wurden die Zellen mit einem Horseradish Peroxidase Komplex (1:100, Fa. GE Healthcare, Chalfont St Giles, Buckinghamshire, UK) für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Inkubation mit der Substratlösung Aminoethylcarbazole (AEC) für 10 min in einer feuchten Kammer. Nach weiteren Reinigungsbehandlungen wurden die Zellen mithilfe von Harris Hämatoxin 30 sek gegengefärbt und schließlich zur mikroskopischen Auswertung mit Crystal Mount eingedeckt.

2.2.2 Immunfluoreszenzmarkierung

Als weitere Nachweisooption von CD44 und CXCR4 wurde eine Immunfluoreszenz-Färbung wie folgt vorgenommen.

Die Zellen wurden zunächst mit CD44- bzw. CXCR4-Primärantikörpern (Maus, monoklonal, 1:100, Abcam, Cambridge, UK) für 12 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit einem zweiten, biotinylierten Antikörper (Anti-Maus, 1:100) für 30 min. Nach weiteren Reinigungsbehandlungen mit PBS wurden die Zellen mit Streptavidin-Alexia 568 (1:100, rot), beziehungsweise mit Streptavidin-Alexia 488 (1:100, grün) (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA) für 30 min bei Raumtemperatur behandelt. Zur Untersuchung unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) wurden die Zellen mit FluorSave™ (Merck Millipore, Billerica, MA, USA) bedeckt und getrocknet. Die Anfärbung der Zellkerne erfolgte mithilfe von 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI).

2.3 Proliferationsassay

Die Proliferation der HNSCC-Zellen wurde mithilfe des Alamar Blue® (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) Proliferation-Assays gemessen. Die Proliferation wurde bei 24 h, 48 h, 72 h und 96 h durch Messung der Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von

540 nm (Erregung) und 590 nm (Emission) erfasst. Die Absorption wurde bei 590 nm überwacht. An den Tagen 1, 2, 3 und 4 wurden je drei Messungen durchgeführt und der arithmetische Mittelwert gebildet. Drei unabhängige Experimentdurchläufe wurden durchgeführt (n=3).

2.4 Zellmorphologie

Für die Beurteilung der Zellmorphologie und um die Podienbildung der HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien unter dem Einfluss verschiedener SDF-1 α -Konzentrationen zu erfassen, wurden die Zellen unter einem Lichtmikroskop (Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) beurteilt. Zellen der verschiedenen Linien wurden in DMEM (Fisher Scientific Co., Pittsburgh, PA, USA) ausgesät, ergänzt mit 10% FCS und Antibiotika und anschließend für 24 h mit SDF-1 α (0, 10, 100 und 500 ng/ml; Fa. Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA) inkubiert. Die Zellen wurden danach mit Hämalaun-Eosin gefärbt. Anschließend wurde die Zellmorphologie unter dem Mikroskop (Axiophot, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) beurteilt. Mindestens fünf Sichtfelder wurden in jedem Well untersucht, jeweils in fünf unabhängigen Experimentdurchläufen (n=5). Das Verhältnis von polarisierten Zellen mit Filopodien oder einem prominenten Uropod zu runden Zellen wurde für die verschiedenen Konzentrationen an SDF-1 α ermittelt (0, 10, 100 und 500 ng/ml).

2.5 Migrationsassay

Die Chemotaxis wurde mithilfe eines *in vitro* 2-Kammer Transwell-Assays bewertet. Die Konzentrationen von SDF-1 α (0, 10, 100 und 500 ng/ml) wurden in den unteren Kammern des Transwells (8,0 μ m Porengröße, 6,5 mm Durchmesser des Membraneinsatzes; Costar®, Corning Inc., Corning, NY, USA) hinzugefügt. Gleiche Anzahlen an Zellen von UM-SCC 11A, UM-SCC 14C und CERV196 wurden in die obere Kammer in ein Medium ohne SDF-1 α gesät. Nach 24 h wurden die Transwell-Einsätze entfernt und die Anzahl der Zellen, welche durch die Mikroporen migriert war, ermittelt.

Die verwendeten Zellen sind adhärent. Daher fallen sie nicht auf den Boden des unteren Wells zurück, wenn sie durch die Mikroporen des oberen Wells des Migrationassays gewandert sind. Vielmehr bilden sie einen Zellring auf der

Unterfläche des Transwell-Einsatzes, welcher mithilfe von Hämalaun-Eosin anfärbbar ist. Dieser Ring wurde anschließend unter dem Mikroskop (Axiophot, Fa. Zeiss, (Axiophot, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgewertet.

Die Weite des Zellringes wurde in nm gemessen und diente als Größenordnung für die Anzahl der Zellen, welche migriert waren. Es wurden sechs voneinander unabhängige Experimentdurchläufe durchgeführt (n=6).

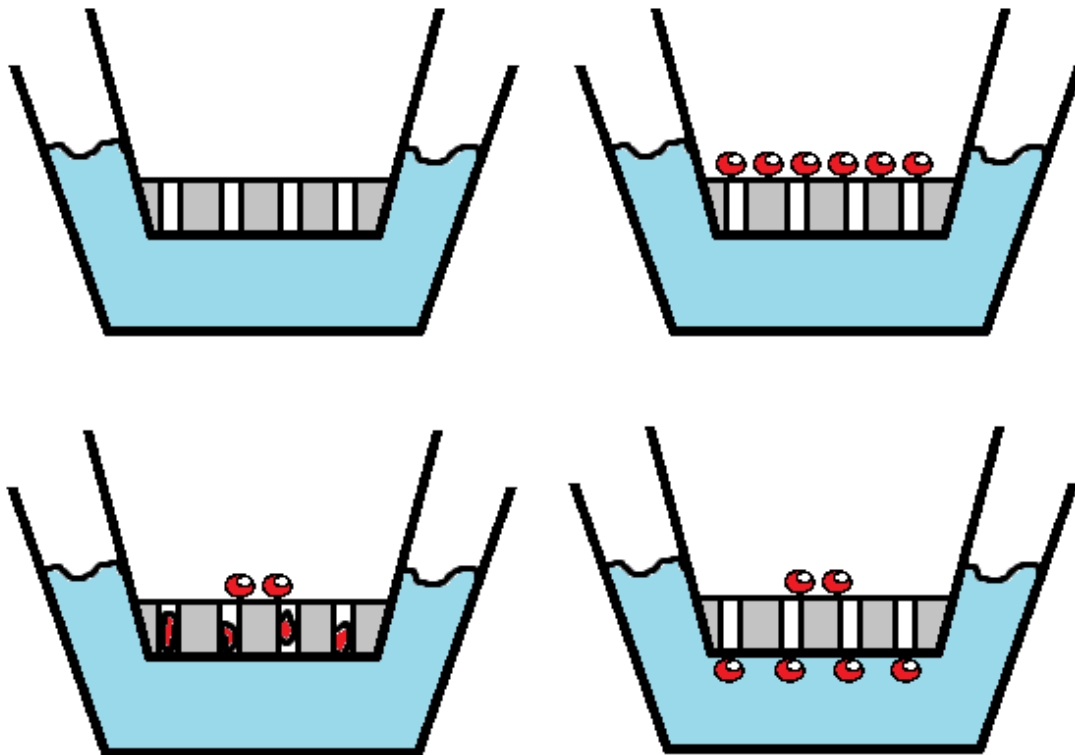


Abbildung 5: Links oben: Transwell-Migrationsassay ohne Zellen, in der unteren Kammer befinden sich jeweils verschiedene Konzentrationen an SDF-1 α (0, 10, 100 und 500 ng/ml). Rechts oben: Die gleiche Anzahl von Zellen der Linien UM-SCC 14C, UM-SCC 11A und CERV196 werden jeweils in die obere Kammer eingefügt. Links unten: Durch die chemotaktische Wirkung migrieren die Zellen durch die Poren aus der oberen Kammer. Rechts unten: Die migrierten Zellen haften auf der Unterfläche des Transwell-Einsatzes und können anschließend mikroskopisch ausgemessen werden (eigene Darstellung)

2.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit der Statistiksoftware IBM SPSS Statistics Version 23 (IBM, Armonk, NY, USA). Die erhobenen Ergebnisse wurden als Mittelwert der einzelnen Experimente \pm Standardabweichung dargestellt.

Die Signifikanzstufen wurden anhand des Student's t-test ermittelt. Ein Wahrscheinlichkeitswert $\leq 0,05$ wurde als signifikant (*) angesehen, ein Wahrscheinlichkeitswert $\leq 0,01$ als hoch signifikant (**).

3 ERGEBNISSE

3.1 Expression der Oberflächenmoleküle

3.1.1 Expression von CD44

CD44 wurde durch eine Immunfluoreszenzfärbung in roter Farbe durch Alexia 568 sichtbar gemacht. In allen drei Zelllinien zeigte sich ein kräftiges rotes Immunfluoreszenzsignal aller Zellen, welches die Expression des Oberflächenmarkers CD44 nachweist (Abbildung 6). CD44 wurde dabei hauptsächlich auf der Zelloberfläche nachgewiesen. Die Zellkerne wurden mit DAPI blau gefärbt. Auch in der Immunhistologie konnte die Expression von CD44 in allen Zelllinien nachgewiesen werden, ebenso die Verteilung auf der Zelloberfläche. Die Spezifität beider Färbemethoden wurde durch Negativkontrollen verifiziert (Abbildung 6 und Abbildung 7).

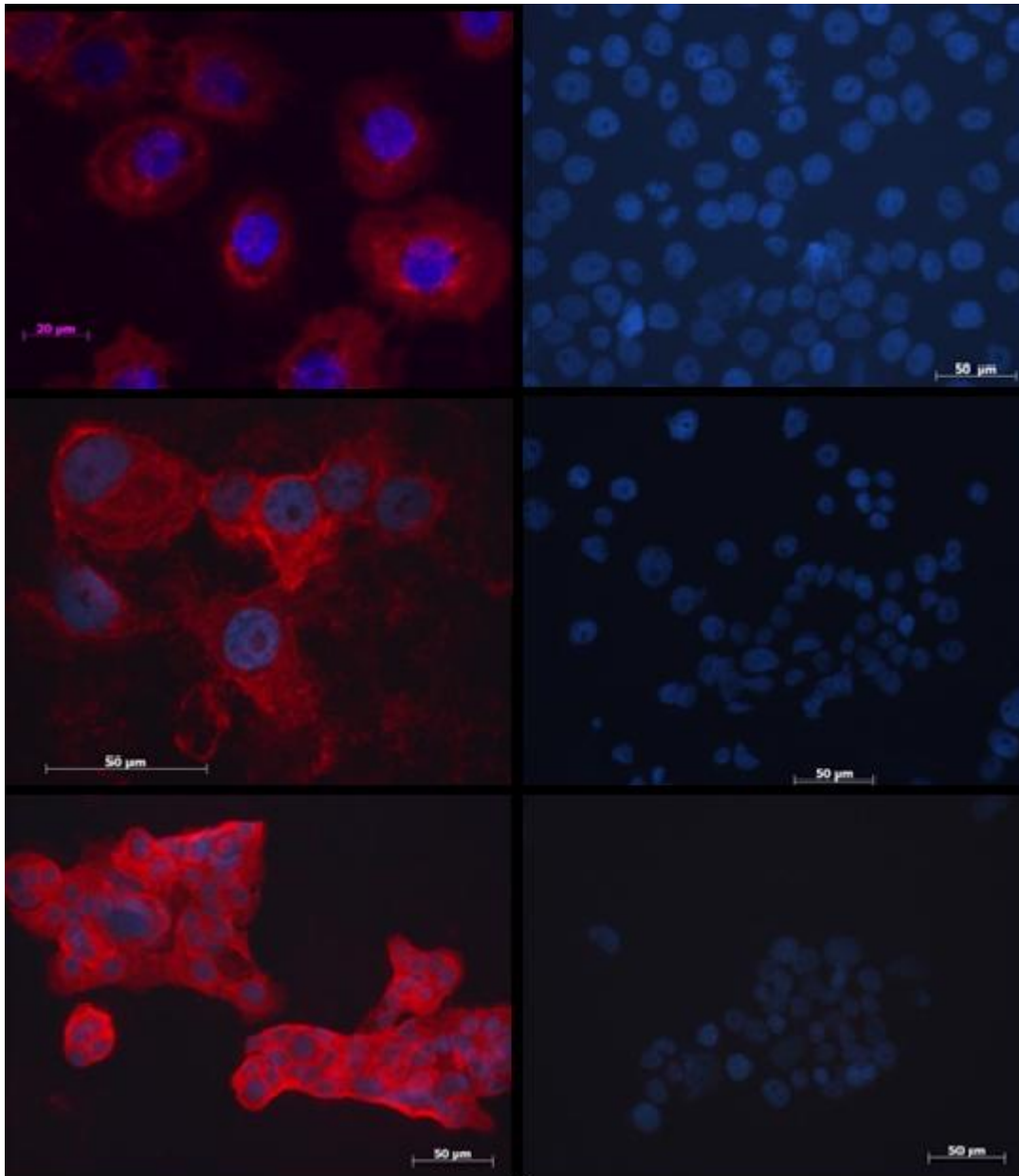


Abbildung 6: Links: Nachweis von CD44 durch Immunfluoreszenz auf UM-SCC 14C (oben), UM-SCC 11A (Mitte) und CERV196 (unten). Rechts: Negativkontrolle der Immunfluoreszenz auf UM-SCC 14C (oben), UM-SCC 11A (Mitte) und CERV196 (unten).

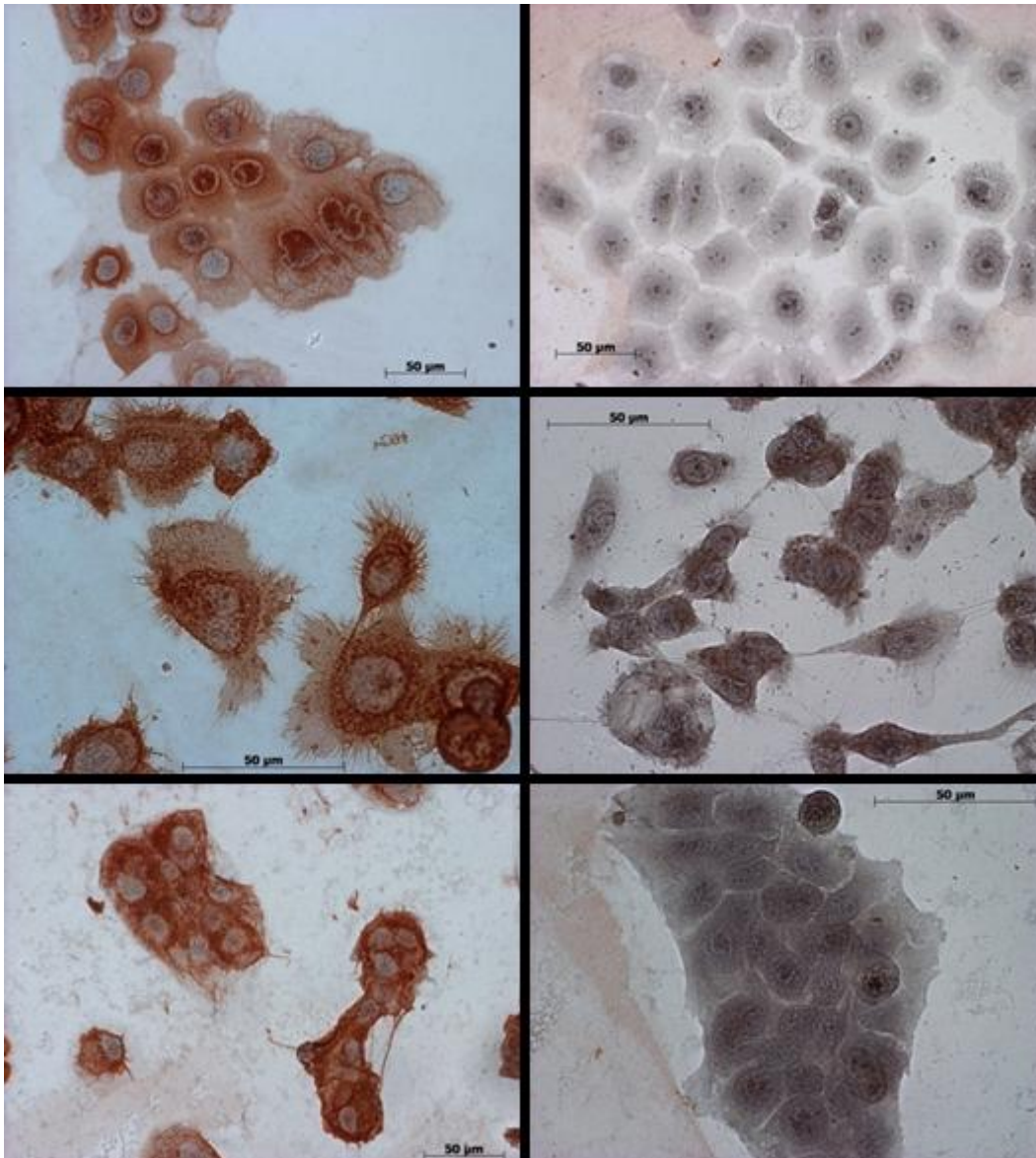


Abbildung 7: Links: Nachweis von CD44 durch Immunhistologie auf UM-SCC 14C (oben), UM-SCC 11A (Mitte) und CERV196 (unten). Rechts: Negativkontrolle der Immunhistologie auf UM-SCC 14C (oben), UM-SCC 11A (Mitte) und CERV196 (unten).

3.1.2 Expression von CXCR4

CXCR4 wurde mittels Immunfluoreszenzfärbung in grüner Farbe mit Alexia 488 nachgewiesen. Es zeigte sich in allen drei Zelllinien die Expression des SDF-1 α -Rezeptors CXCR4 (Abbildung 8). CXCR4 zeigte ein vornehmlich zytoplasmatisches Färbemuster. Auch hier wurden die Zellkerne mit DAPI blau angefärbt.

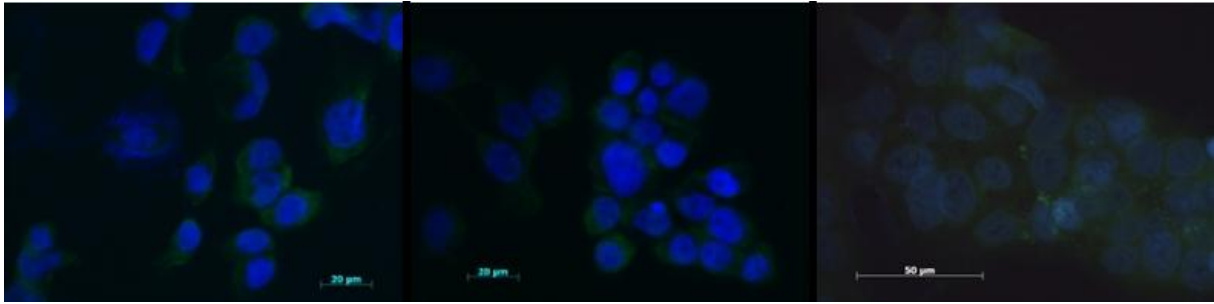


Abbildung 8: Nachweis von CXCR4 durch Immunfluoreszenz auf UM-SCC 14C (links), UM-SCC 11A (Mitte) und CERV196 (rechts)

Die Immunhistologie wies die Expression von CXCR4 in allen Zelllinien nach.

Auffällig hierbei war, dass die Expression von CXCR4 in den Zelllinien CERV196 und UM-SCC 11A homogen verteilt war, wohingegen in der Zelllinie UM-SCC 14C CXCR4 stärker in jenen Zellen exprimiert wurde, welche gruppiert und eng beieinanderlagen (Abbildung 9). Auch hier wurden zum Nachweis der Färbespezifität Negativkontrollen angefertigt (Abbildung 9).

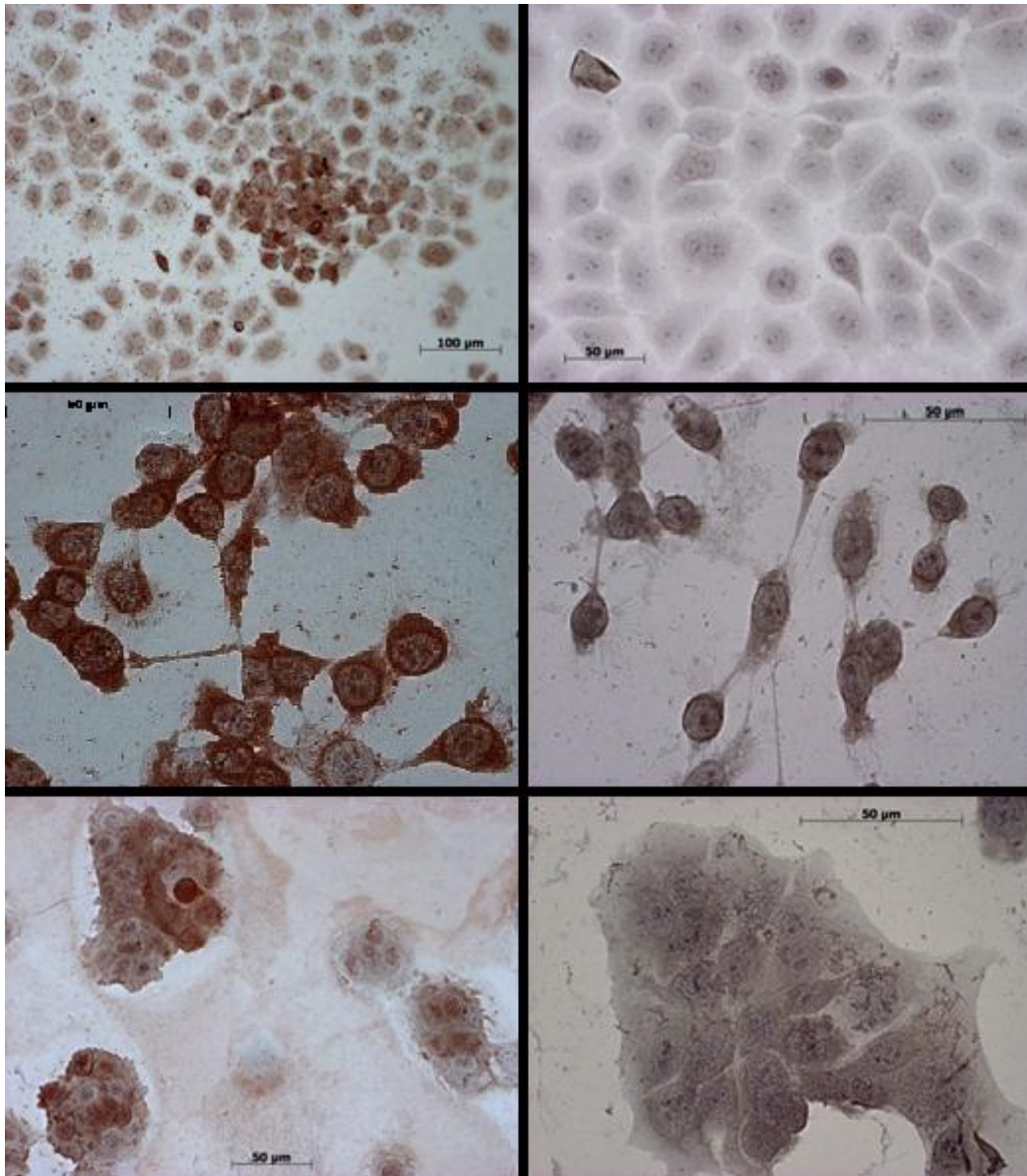


Abbildung 9: Links: Nachweis von CXCR4 durch Immunhistochemie auf UM-SCC 14C (oben), UM-SCC 11A (Mitte) und CERV196 (unten). Rechts: Negativkontrolle der Immunhistochemie auf UM-SCC 14C (oben), UM-SCC 11A (Mitte) und CERV196 (unten).

3.2 Ergebnisse des Proliferationsassays

Die im Proliferationsassay gemessenen Absorptionswerte werden im Folgenden als Proliferationswerte bezeichnet und stellen eine Größe für die Anzahl der Zellen der jeweiligen Zelllinie im Assay dar. Der Mittelwert der mittleren Proliferationswerte war für die HPV-negativen-Zelllinien signifikant höher als der der HPV-positiven ($p=0,036$, Tabelle 3, Abbildung 10). Die Regressionsanalyse zeigt jedoch, dass dies hauptsächlich auf einen erhöhten Ausgangswert der HPV-negativen Zelllinien ($b_0=18,195$) gegenüber der HPV-positiven Zelllinie ($b_0=12,737$) zurückzuführen ist.

Tatsächlich liegt die Anstiegsgeschwindigkeit der Proliferationswerte in der HPV-positiven Zelllinie (Abbildung 12, $b_1=5,577$) über der der HPV-negativen Zelllinien (Abbildung 11, $b_1=5,261$).

Tabelle 3: Proliferationswerte von HPV-positiven und HPV-negativen SCCs in Abhängigkeit der Konzentration an SDF-1 α

| SDF-1 α [ng/ml] | HPV-positiv | HPV-negativ |
|------------------------|---------------------|---------------------|
| 0 | 23,738 \pm 9,628 | 29,425 \pm 10,091 |
| 1 | 25,764 \pm 11,300 | 29,911 \pm 9,970 |
| 10 | 24,203 \pm 10,280 | 28,676 \pm 9,768 |
| 100 | 23,503 \pm 9,497 | 28,773 \pm 9,553 |
| 500 | 22,251 \pm 8,670 | 26,804 \pm 8,518 |

Tabelle 4: p-Werte des Unterschiedes zur Negativkontrolle der Proliferationswerte von HPV-positiven und HPV-negativen SCCs in Abhängigkeit der Konzentration an SDF-1 α

| SDF-1 α [ng/ml] | HPV-positiv | HPV-negativ |
|------------------------|-------------|-------------|
| 0 | - | - |
| 1 | 0,768 | 0,915 |
| 10 | 0,843 | 0,868 |
| 100 | 0,970 | 0,884 |
| 500 | 0,804 | 0,538 |

Die Konzentration an SDF-1 α zeigte hierbei keinen Einfluss auf die Proliferation der Zellen, weder der HPV-positiven Linie noch der HPV-negativen Linien. Die HPV-positiv Zelllinie mit SDF-1 α -Inkubation unterschied sich bei keiner der Konzentrationen in ihren Proliferationswerten signifikant von der Negativkontrolle, ebenso nicht die HPV-negativen Zelllinien (Tabelle 4). Eine bivariate Korrelation zwischen den Proliferationswerten und der Konzentration an SDF-1 α zeigt ebenfalls ein nicht signifikantes Ergebnis ($p=0,385$; Koeffizient nach Pearson $r=-0,102$).

Beim direkten Vergleich der einzelnen mittleren Proliferationswerte der HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien bei den verschiedenen Konzentrationen an SDF-1 α ergaben sich bei keiner SDF-1 α -Konzentration signifikante Unterschiede (Tabelle 5).

Ergebnisse

Tabelle 5: p-Werte des Unterschiedes der Proliferationswerte zwischen HPV-positiven und HPV-negativen SCCs in Abhängigkeit der Konzentration an SDF-1 α

| SDF-1 α [ng/ml] | p-Wert |
|------------------------|--------|
| 0 | 0,316 |
| 1 | 0,479 |
| 10 | 0,426 |
| 100 | 0,331 |
| 500 | 0,349 |

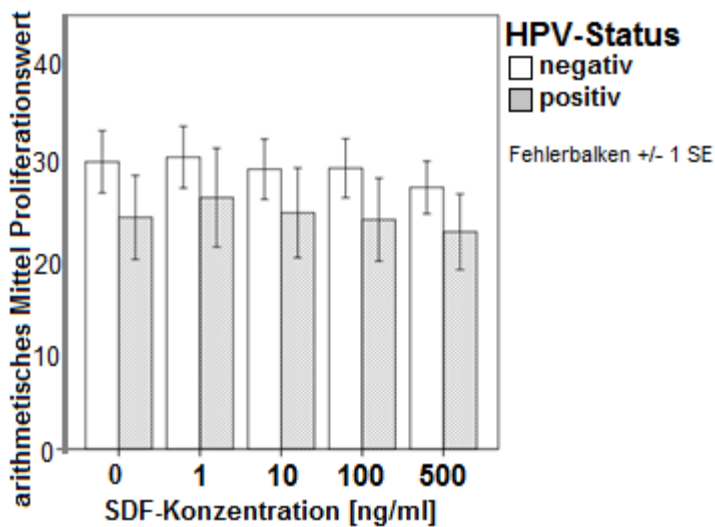


Abbildung 10: Proliferationswerte von HPV-positiven und HPV-negativen SCCs in Abhängigkeit der Konzentration an SDF-1 α

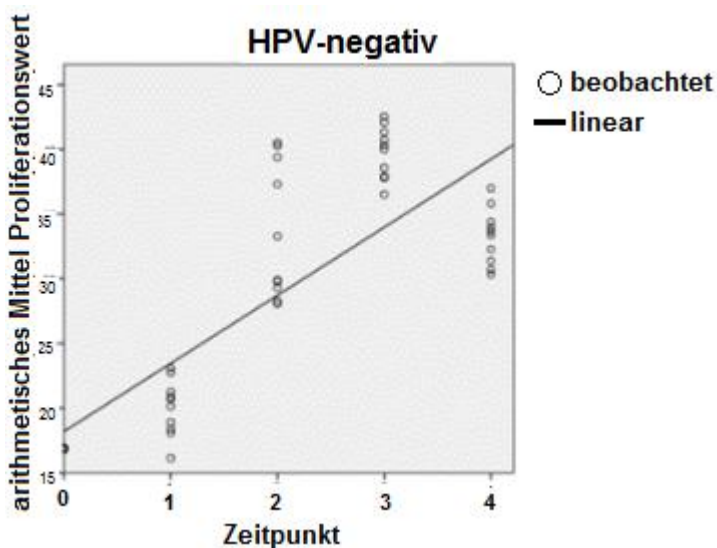


Abbildung 11: Lineare Regression der Proliferationswerte von HPV-negativen SCCs über den Zeitverlauf

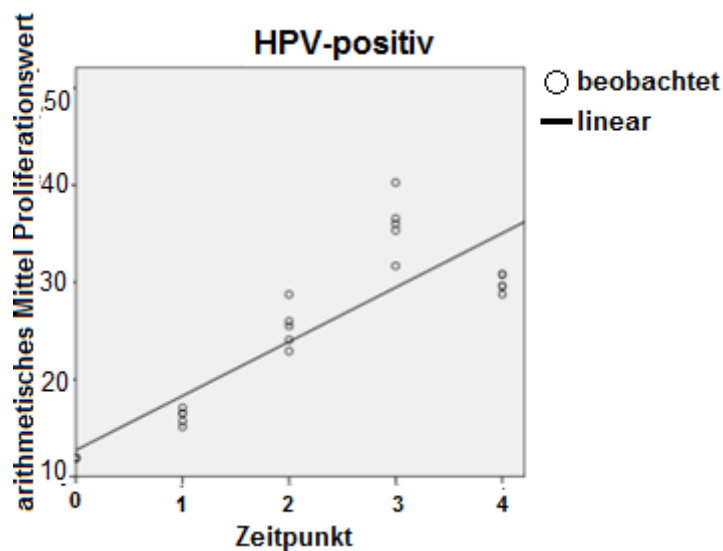


Abbildung 12: Lineare Regression der Proliferationswerte von HPV-positiven SCCs über den Zeitverlauf

3.3 Ergebnisse der Lichtmikroskopie

Die Zellmorphologie der HPV-positiven und HPV-negativen Zellen unter dem Einfluss verschiedener SDF-1 α -Konzentrationen wurde unter dem Mikroskop bewertet. Als ein Maß für die Morphologie-Veränderungen der Zellen zugunsten von migrationsfähigen Phänotypen wurden die Zellen mit Podienbildung innerhalb eines Sichtfeldes gezählt und ins Verhältnis zur Anzahl aller Zellen im Sichtfeld gesetzt, wodurch sich der Faktor Podges (Tabelle 6) ergab. Zum Vergleich der Zelllinien untereinander wurde dieser Faktor in Relation zur Negativkontrolle der jeweiligen Zelllinie gesetzt und als RatioPod (Tabelle 7) bezeichnet. Nach dem gleichen Verfahren wurden die Zell-Zell-Kontakte innerhalb eines Sichtfeldes ermittelt und der wie oben beschrieben errechnete Wert als ZZKges (Tabelle 9), bzw. RatioZZK (Tabelle 10) bezeichnet. Die Zellen der HPV-negativen Zelllinien wiesen bei allen SDF-1 α -Konzentrationen hoch signifikant höhere Werte an RatioPod als die Negativkontrolle auf (Tabelle 8). Die RatioPod-Werte der HPV-positiven Zelllinie unterschieden sich hingegen bei keiner SDF-1 α -Konzentration signifikant von der Negativkontrolle (Tabelle 8). In Bezug auf RatioZZK fand sich in den HPV-negativen Zelllinien lediglich bei einer SDF-1 α -Konzentration von 100 ng/ml ein signifikant höherer Wert im Vergleich zur Negativkontrolle ($p=0,038$) (Tabelle 11). Bei der HPV-positiven Zelllinie fand sich bei keiner SDF-1 α -Konzentration ein signifikanter Unterschied der RatioZZK im Vergleich zur Negativkontrolle.

Bei den Konzentrationen 100 und 500 ng/ml war jedoch ein Trend zu signifikanten Unterschieden zu sehen (Tabelle 11).

Tabelle 6: Absolutwerte der Podienbildung von HPV-positiven und HPV-negativen SCCs in Abhängigkeit von der Konzentration an SDF-1 α

| SDF-1 α [ng/ml] | HPV-positiv | HPV-negativ |
|------------------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 0,264 \pm 0,055 | 0,303 \pm 0,054 |
| 1 | 0,272 \pm 0,059 | 0,340 \pm 0,055 |
| 10 | 0,244 \pm 0,037 | 0,430 \pm 0,068 |
| 100 | 0,267 \pm 0,075 | 0,540 \pm 0,060 |
| 500 | 0,259 \pm 0,050 | 0,434 \pm 0,049 |

Tabelle 7: Verhältnis der Podienbildung im Vergleich zur Negativkontrolle von HPV-positiven und HPV-negativen SCCs in Abhängigkeit der Konzentration an SDF-1 α

| SDF-1 α [ng/ml] | HPV-positiv | HPV-negativ |
|------------------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 1,0 | 1,0 |
| 1 | 1,053 \pm 0,245 | 1,130 \pm 0,090 |
| 10 | 0,951 \pm 0,205 | 1,437 \pm 0,178 |
| 100 | 1,053 \pm 0,390 | 1,825 \pm 0,310 |
| 500 | 1,017 \pm 0,274 | 1,469 \pm 0,279 |

Tabelle 8: p-Werte der Unterschiede zur Negativkontrolle des Verhältnisses der Podienbildung im Vergleich zur Negativkontrolle von HPV-positiven und HPV-negativen SCCs in Abhängigkeit der Konzentration an SDF-1 α

| SDF-1 α [ng/ml] | HPV-positiv | HPV-negativ |
|------------------------|-------------|---------------|
| 0 | - | - |
| 1 | 0,644 | 0,000221 |
| 10 | 0,61 | 0,0000003749 |
| 100 | 0,766 | 0,00000011953 |
| 500 | 0,89 | 0,000046 |

Tabelle 9: Verhältnis der Zell-Zell-Kontakt-Bildung im Vergleich zur Negativkontrolle von HPV-positiven und HPV-negativen SCCs in Abhängigkeit der Konzentration an SDF-1 α

| SDF-1 α [ng/ml] | HPV-positiv | HPV-negativ |
|------------------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 1,0 | 1,0 |
| 1 | 2,483 \pm 2,424 | 1,115 \pm 0,471 |
| 10 | 2,156 \pm 1,643 | 1,160 \pm 0,350 |
| 100 | 3,832 \pm 3,328 | 1,295 \pm 0,416 |
| 500 | 3,101 \pm 2,318 | 1,093 \pm 0,235 |

Tabelle 10: Absolutwerte der Zell-Zell-Kontakt-Bildung von HPV-positiven und HPV-negativen SCCs in Abhängigkeit der Konzentration an SDF-1 α

| SDF-1 α [ng/ml] | HPV-positiv | HPV-negativ |
|------------------------|-------------------|-------------------|
| 0 | 0,024 \pm 0,019 | 0,392 \pm 0,162 |
| 1 | 0,076 \pm 0,128 | 0,388 \pm 0,119 |
| 10 | 0,042 \pm 0,043 | 0,419 \pm 0,150 |
| 100 | 0,080 \pm 0,104 | 0,460 \pm 0,138 |
| 500 | 0,069 \pm 0,097 | 0,417 \pm 0,175 |

Tabelle 11: p-Werte der Unterschiede zur Negativkontrolle des Verhältnisses der Zell-Zell-Kontakt-Bildung im Vergleich zur Negativkontrolle von HPV-positiven und HPV-negativen SCCs in Abhängigkeit der Konzentration an SDF-1 α

| SDF-1 α [ng/ml] | HPV-positiv | HPV-negativ |
|------------------------|-------------|-------------|
| 0 | - | - |
| 1 | 0,209 | 0,449 |
| 10 | 0,165 | 0,154 |
| 100 | 0,094 | 0,038 |
| 500 | 0,077 | 0,225 |

Während sich bei den HPV-negativen Zelllinien eine positive Korrelation zwischen der SDF-1 α -Konzentration und der RatioPod finden ließ (p= 0,049; Koeffizient nach Pearson r= 0,28) (Abbildung 15), zeigten die RatioPod-Werte der HPV-positiven Zelllinie keine signifikante Korrelation mit der Konzentration an SDF-1 α (p= 0,924; Koeffizient nach Pearson r=0,02) (Abbildung 16).

RatioZZK korrelierte weder in den HPV-negativen (p= 0,946; Koeffizient nach Pearson r=-0,01) (Abbildung 17), noch in der HPV-positiven Zelllinie (p= 0,343; Koeffizient nach Pearson r=0,198)(Abbildung 18) mit der SDF-1 α -Konzentration.

Die Regressionsanalyse bestätigt die Ergebnisse der t-Tests. Für die RatioPod-Werte zeigte sich ein erhöhter Ausgangswert der HPV-negativen Zelllinien ($b_0= 1,157$) gegenüber der HPV-positiven Zelllinie ($b_0= 1,001$). Die HPV-negativen Zelllinien wiesen weiterhin eine Steigung von $b_1= 0,007$ auf, gegenüber der HPV-positiven Zelllinie mit einer Steigung von $b_1= 0,00047$. Die HPV-negativen Zelllinien reagierten bezüglich der RatioPod also fast 15fach stärker auf den die Morphologie beeinflussenden Stimulus von SDF-1 α als die HPV-positiv Zelllinie (Abbildung 15 und Abbildung 16). Außerdem zeigt die Regressionsanalyse ein stärkeres Ansprechen der HPV-positiven Zelllinie auf SDF-1 α in Bezug auf die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten gegenüber den HPV-negativen Zelllinien.

So ergab sich für die RatioZZK sowohl ein erhöhter Ausgangswert für die HPV-positive Zelllinie ($b_0 = 1,797$) gegenüber den HPV-negativen Zelllinien ($b_0 = 1,082$) als auch eine größere Steigung der HPV-positiven Zelllinie ($b_1 = 0,021$) gegenüber den HPV-negativen Zelllinien ($b_1 = 0,002$), also um den Faktor zehn (Abbildung 17 und Abbildung 18).

Vergleicht man die verschiedenen morphologischen Stigmata der HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien bei den jeweiligen SDF-1 α -Konzentrationen direkt miteinander, so ergeben sich folgende Signifikanzniveaus (Tabelle 12).

Tabelle 12: p-Werte der Unterschiede der Podien- und Zell-Zell-Kontakt-Bildung zwischen HPV-positiven und HPV-negativen SCCs bei verschiedenen Konzentrationen an SDF-1 α

| SDF-1α [ng/ml] | Podges | RatioPod | ZZKges | RatioZZK |
|---|---------------|-----------------|---------------|-----------------|
| 0 | 0,214 | - | 0,000251 | - |
| 1 | 0,047 | 0,378 | 0,000423 | 0,098 |
| 10 | 0,00008 | 0,000381 | 0,000116 | 0,080 |
| 100 | 0,000004 | 0,001 | 0,00012 | 0,028 |
| 500 | 0,0002 | 0,011 | 0,01 | 0,015 |

Bei der Betrachtung der Absolutwerte der Podienbildung (Podges), also ohne diese in Relation zur Negativkontrolle zu setzen, ergeben sich signifikante Unterschiede bei einer SDF-1 α -Konzentration von 1 ng/ml. Bei den höheren SDF-1 α -Konzentrationen 10, 100 und 500 ng/ml ergeben sich hochsignifikante Unterschiede mit höheren Werten der HPV-negativen Zelllinien. Die hochsignifikanten Unterschiede bei 10 und 100 ng/ml bleiben erhalten, wenn man die Podienbildung jeweils in Relation zur Negativkontrolle setzt (RatioPod). Bei 500 ng/ml sind die Unterschiede noch signifikant, bei 1 ng/ml findet sich kein signifikanter Unterschied.

Bezüglich der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten ergeben sich für die Absolutwerte (ZZKges) hochsignifikante Unterschiede bei einer SDF-1 α -Konzentration von 0, 1, 10 und 100 ng/ml. Bei 500 ng/ml sind die Unterschiede noch signifikant. Hierbei zeigte jeweils die HPV-positive Zelllinie CERV196 höhere Werte als die HPV-negativen Zelllinien UM-SCC 14C und UM-SCC 11A. Berücksichtigt man auch hier die Werte, welche in Relation zur Negativkontrolle gesetzt wurden (RatioZZK), so finden sich bei einer SDF-1 α -Konzentration von 100 und 500 ng/ml signifikante Unterschiede zwischen den HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien. Bei 1 und 10 ng/ml zeigt sich ein Trend zur Signifikanz.

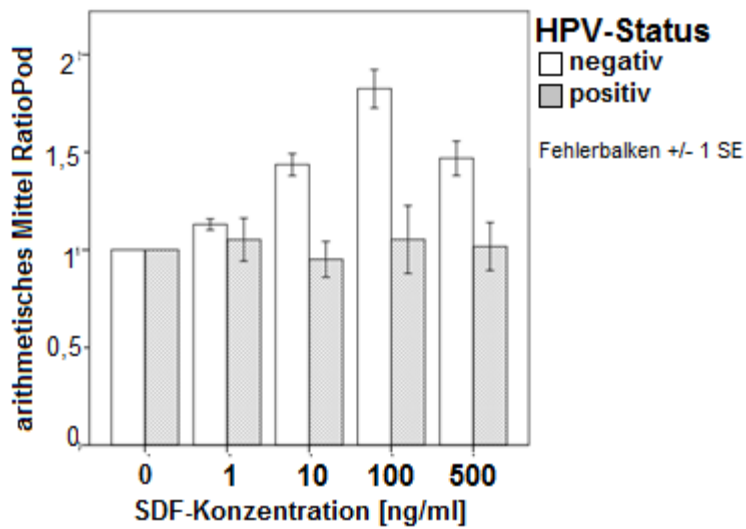


Abbildung 13: Verhältnis der Podienbildung im Vergleich zur Negativkontrolle von HPV-positiven und HPV-negativen SCCs in Abhängigkeit der Konzentration an SDF-1 α

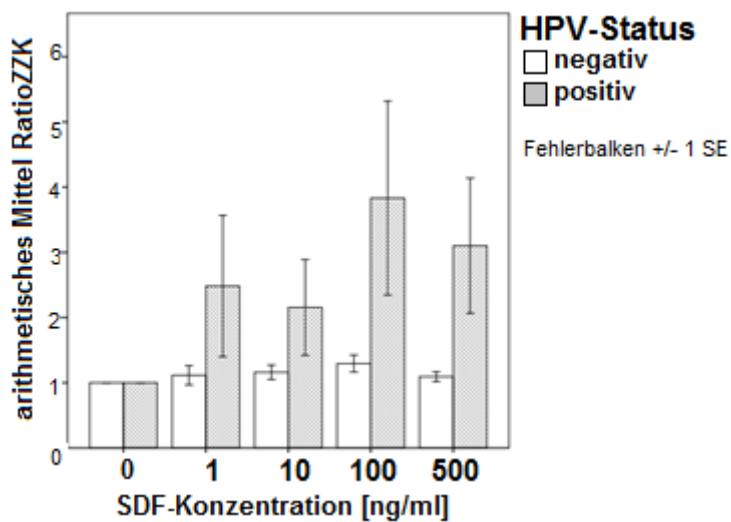


Abbildung 14: Verhältnis der Zell-Zell-Kontakt-Bildung im Vergleich zur Negativkontrolle von HPV-positiven und HPV-negativen SCCs in Abhängigkeit der Konzentration an SDF-1 α

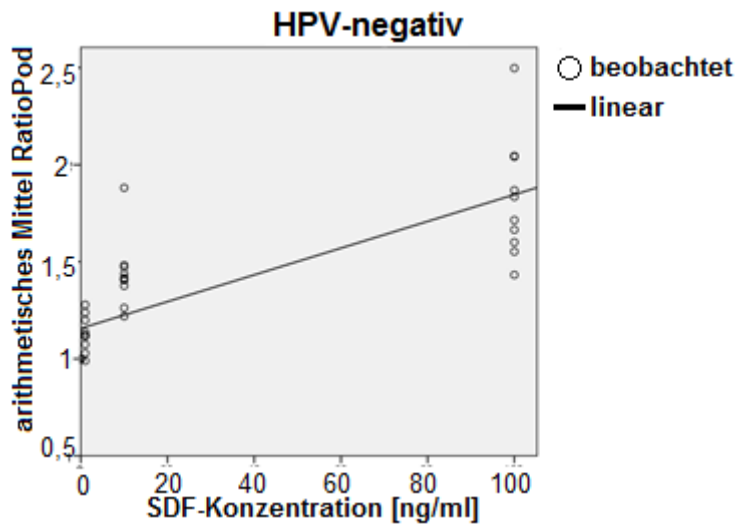


Abbildung 15: Lineare Regression des Verhältnisses der Podienbildung im Vergleich zur Negativkontrolle von HPV-negativen SCCs über die Konzentration an SDF-1 α

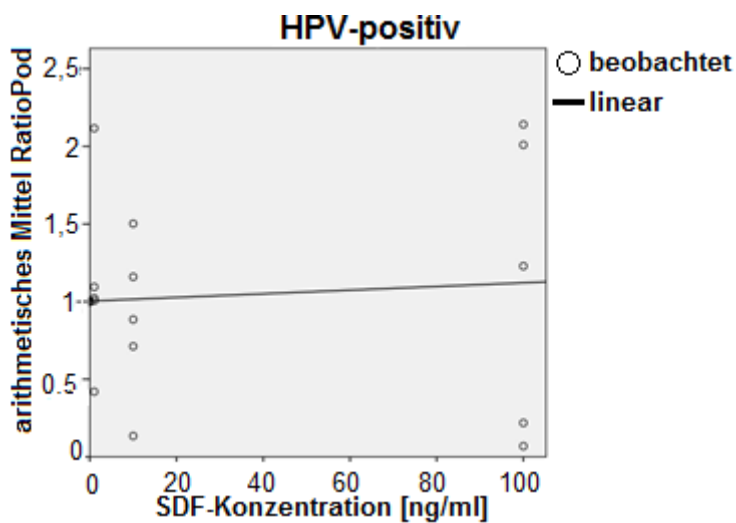


Abbildung 16: Lineare Regression des Verhältnisses der Podienbildung im Vergleich zur Negativkontrolle von HPV-positiven SCCs über die Konzentration an SDF-1 α

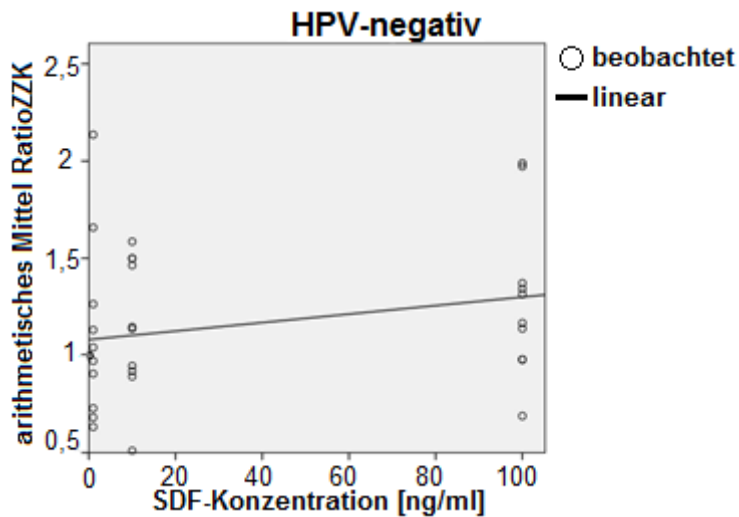


Abbildung 17: Lineare Regression des Verhältnisses der Zell-Zell-Kontakt-Bildung im Vergleich zur Negativkontrolle von HPV-negativen SCCs über die Konzentration an SDF-1 α

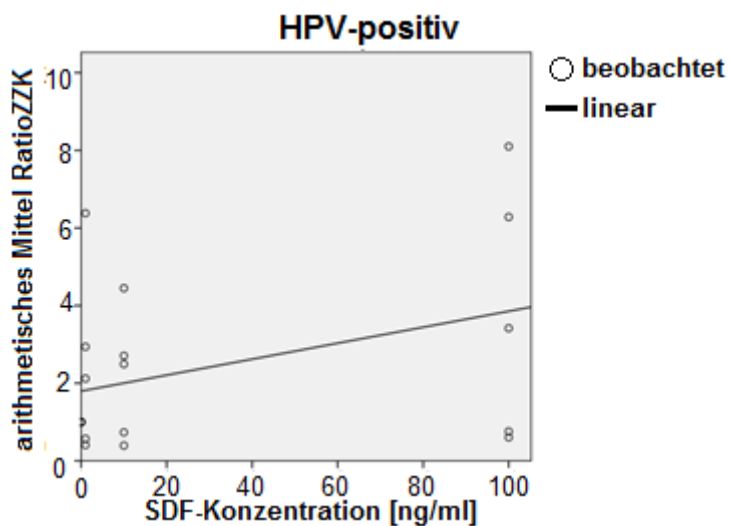


Abbildung 18: Lineare Regression des Verhältnisses der Zell-Zell-Kontakt-Bildung im Vergleich zur Negativkontrolle von HPV-positiven SCCs über die Konzentration an SDF-1 α

3.4 Ergebnisse des Migrationsassays

Die Zellen, welche durch den Migrationsassay migriert waren, bildeten auf der Unterfläche des Transwell-Einsatzes einen Zellring. Die durchschnittliche Breite des Ringes wurde durch mehrfache Messung an definierten Punkten des Ringes ermittelt (Abbildung 19 und Abbildung 20, Tabelle 13). Zum Vergleich der Zelllinien untereinander wurden die gemessenen Werte ins Verhältnis zur jeweiligen

Negativkontrolle gesetzt (Tabelle 14). Sowohl in den HPV-negativen Zelllinien als auch in der HPV-positiven Zelllinie waren die Unterschiede der Migrationswerte zwischen den SDF-1 α -Inkubationen und den Negativkontrollen nicht signifikant (HPV-negativ: $p= 0,186$; HPV-positiv: $p= 0,586$) (Tabelle 13). Die CERV196-Linie, welche die HPV-positive Zelllinie darstellt, zeigte bei keiner der SDF-1 α -Konzentrationen einen signifikanten Unterschied der Migrationswerte zur Negativkontrolle (Tabelle 15). Bei der Aufschlüsselung der HPV-negativen Zelllinien zeigt sich, dass die fehlende Signifikanz der Gruppe auf ein gegensätzliches Verhalten der beiden Zelllinien UM-SCC 11A und UM-SCC 14C zurückzuführen ist (Abbildung 21). Die UM-SCC 11A-Linie zeigte ein Verhalten ähnlich der CERV196-Linie. Sie zeigte bei hohen Konzentrationen an SDF-1 α eine signifikante bzw. hoch signifikante Abnahme der Migrationswerte im Vergleich zur Negativkontrolle, nämlich bei 100 ng/ml und 500 ng/ml (Tabelle 15).

Die UM-SCC 14C-Linie zeigte unter steigenden SDF-1 α -Konzentrationen einen Anstieg der Migrationswerte, welche bei 10 ng/ml und 500 ng/ml signifikant höher als die Negativkontrolle waren. Gleichzeitig zeigt sich eine positive Korrelation zwischen den Migrationswerten und den SDF-1 α -Konzentrationen in der HPV-negativen Zelllinie UM-SCC 14C ($p= 0,05$; Koeffizient nach Pearson $r= 0,561$) (Tabelle 14)(Abbildung 24).

Tabelle 13: absolute Migrationswerte der verschiedenen Zelllinien in Abhängigkeit der Konzentration an SDF-1 α

| SDF-1α [ng/ml] | CERV196 [μm] | UM-SCC 14C [μm] | UM-SCC 11A [μm] |
|---|------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 0 | 293,127 \pm 79,776 | 267,995 \pm 158,795 | 427,874 \pm 126,700 |
| 1 | 396,921 \pm 163,000 | 321,592 \pm 167,730 | 364,734 \pm 147,599 |
| 10 | 365,095 \pm 141,082 | 417,170 \pm 232,042 | 326,301 \pm 133,318 |
| 100 | 352,375 \pm 130,027 | 394,670 \pm 334,431 | 266,003 \pm 79,828 |
| 500 | 331,707 \pm 165,643 | 438,420 \pm 177,134 | 292,288 \pm 82,524 |

Tabelle 14: Migrationswerte in Relation zur Negativkontrolle der verschiedenen Zelllinien in Abhängigkeit der Konzentration an SDF-1 α

| SDF-1α [ng/ml] | CERV196 | UM-SCC 14C | UM-SCC 11A |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0 | 1,000 | 1,000 | 1,000 |
| 1 | 1,35505 \pm 0,43727 | 1,27937 \pm 0,70240 | 0,93492 \pm 0,37955 |
| 10 | 1,23994 \pm 0,31894 | 1,35907 \pm 0,24315 | 0,79232 \pm 0,35719 |
| 100 | 1,20675 \pm 0,34307 | 1,29328 \pm 0,54035 | 0,66859 \pm 0,28757 |
| 500 | 1,12030 \pm 0,45971 | 2,17247 \pm 1,04333 | 0,71650 \pm 0,21183 |

Tabelle 15: p-Werte der Unterschiede zur Negativkontrolle der Migrationswerte in Relation zur Negativkontrolle der verschiedenen Zelllinien in Abhängigkeit der Konzentration an SDF-1 α

| SDF-1 α [ng/ml] | CERV196 | UM-SCC 14C | UM-SCC 11A |
|------------------------|---------|------------|------------|
| 0 | - | - | - |
| 1 | 0,107 | 0,4 | 0,681 |
| 10 | 0,131 | 0,012 | 0,185 |
| 100 | 0,215 | 0,256 | 0,018 |
| 500 | 0,575 | 0,036 | 0,008 |

Die Regressionsanalysen bestätigen die Ergebnisse der t-Tests. Die CERV196-Linie hatte bei den Migrationswerten den höchsten Ausgangswert ($b_0 = 120,358$), gefolgt von der UM-SCC 14C-Linie ($b_0 = 117,663$) und der UM-SCC 11A-Linie ($b_0 = 86,434$). Unter SDF-1 α -Einfluss zeigte CERV196 eine Abnahme der Migrationswerte ($b_1 = -0,016$) (Abbildung 22), UM-SCC 11A eine Abnahme der Migrationswerte ($b_1 = -0,036$) (Abbildung 23) und UM-SCC 14C eine Zunahme der Migrationswerte ($b_1 = 0,197$) (Abbildung 24). Vergleicht man die Migrationswerte nun nicht innerhalb einer Zelllinie in den verschiedenen SDF-1 α -Konzentration, sondern die Migrationswerte der verschiedenen Zelllinien bei der jeweiligen SDF-1 α -Konzentration untereinander, so ergeben sich folgende Signifikanzstufen (Tabelle 16 und Tabelle 17).

Tabelle 16: p-Werte der Unterschiede der absoluten Migrationswerte der verschiedenen Zelllinien in Abhängigkeit der Konzentration an SDF-1 α

| SDF-1 α [ng/ml] | CERV196 – UM-SCC 14C | UM-SCC 14C – UM-SCC 11A | CERV196 – UM-SCC 11A | HPVpos – HPV-neg |
|------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------------|
| 0 | 0,760 | 0,096 | 0,070 | 0,426 |
| 1 | 0,472 | 0,665 | 0,752 | 0,518 |
| 10 | 0,688 | 0,449 | 0,651 | 0,979 |
| 100 | 0,799 | 0,381 | 0,208 | 0,805 |
| 500 | 0,333 | 0,097 | 0,619 | 0,691 |

Tabelle 17: p-Werte der Unterschiede der Migrationswerte in Relation zur Negativkontrolle der verschiedenen Zelllinien bei verschiedenen Konzentrationen an SDF-1 α

| SDF-1 α [ng/ml] | CERV196 – UM-SCC 14C | UM-SCC 14C – UM-SCC 11A | CERV196 – UM-SCC 11A | HPVpos – HPV-neg |
|------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------------|
| 0 | - | - | - | - |
| 1 | 0,843 | 0,363 | 0,143 | 0,406 |
| 10 | 0,558 | 0,025 | 0,058 | 0,322 |
| 100 | 0,777 | 0,042 | 0,020 | 0,269 |
| 500 | 0,073 | 0,008 | 0,085 | 0,601 |

Beim Vergleich der absoluten Migrationswerte zwischen CERV196, UM-SCC 11A und 14C, sowie der HPV-positiven und HPV-negativen Gruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede (Tabelle 16). Bei den SDF-1 α -Konzentrationen 0 und 500 ng/ml ergab sich eine Tendenz zu signifikanten Unterschieden zwischen den beiden HPV-negativen Zelllinien UM-SCC 14C und UM-SCC 11A. Außerdem war bei einer Konzentration von 0 ng/ml eine Tendenz zur Signifikanz zwischen CERV196 und UM-SCC 11A auszumachen.

Zwischen den Migrationswerten, die in Relation zur Negativkontrolle gesetzt wurden (Tabelle 17), ergeben sich bei CERV196 und UM-SCC 14C keine signifikanten Unterschiede. Bei einer SDF-1 α -Konzentration von 500 ng/ml zeigte sich ein Trend zu signifikant höheren Migrationswerten in der HPV-negativen UM-SCC 14C-Zelllinie. Die beiden HPV-negativen Zelllinien UM-SCC 14C und UM-SCC 11A zeigten bei den SDF-1 α -Konzentrationen 10 und 100 ng/ml signifikante Unterschiede mit höheren Werten der UM-SCC 14C-Linie, bei 500 ng/ml hochsignifikant höhere Werte der UM-SCC 14C-Linie. Gegenüber der HPV-negativen UM-SCC 11A-Zelllinie wies die HPV-positive Zelllinie CERV196 bei einer SDF-1 α -Konzentration von 100 ng/ml signifikant höhere Migrationswerte auf, bei den SDF-1 α -Konzentrationen 10 und 500 ng/ml zeigte sich ein Trend zu signifikant höheren Migrationswerten der CERV196-Zelllinie. Zwischen der HPV-positiven und der HPV-negativen Gruppe fanden sich bei keiner SDF-1 α -Konzentration signifikante Unterschiede der in Relation zur Negativkontrolle gesetzten Migrationswerte.

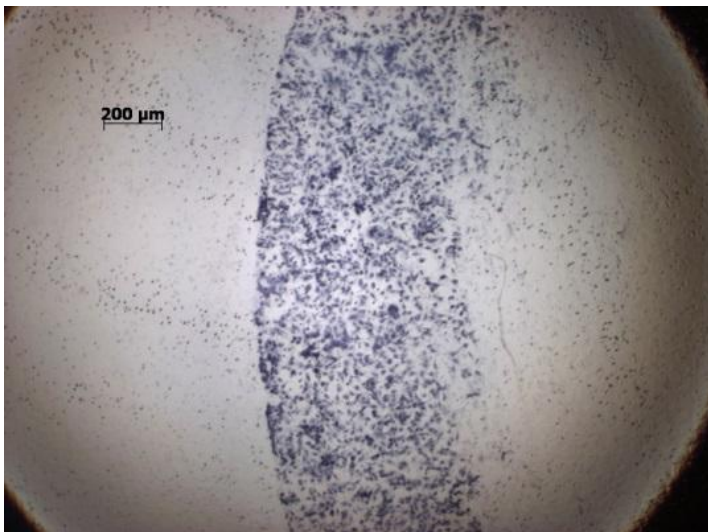


Abbildung 19: Ringbildung der migrierten UM-SCC 14C-Zellen im Migrationsassay

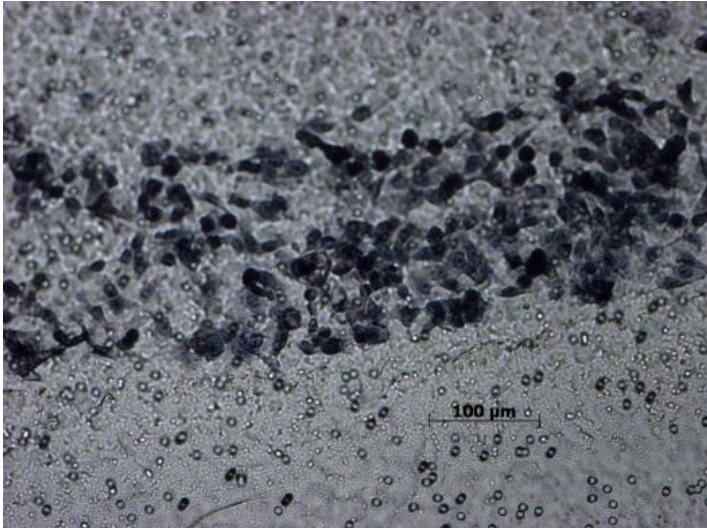


Abbildung 20: Ringbildung der migrierten UM-SCC 11A-Zellen im Migrationsassay

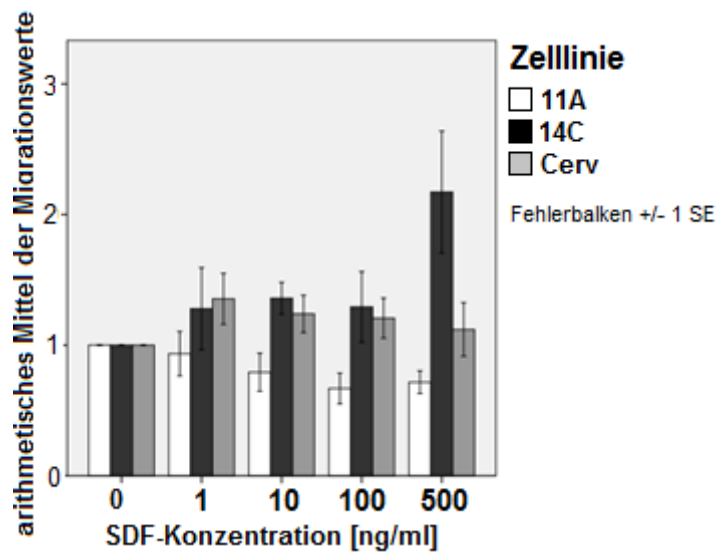


Abbildung 21: Migrationswerte der Zelllinien UM-SCC 11A, UM-SCC 14C und CERV196 in Abhängigkeit der Konzentration an SDF-1 α

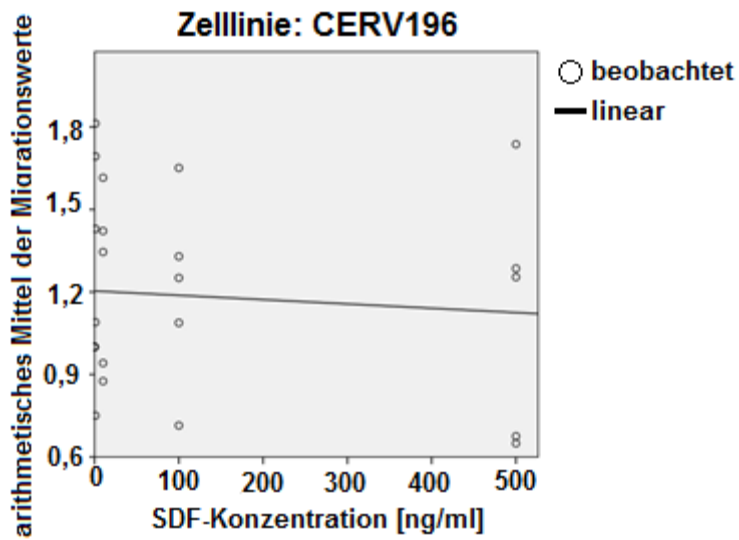


Abbildung 22: Lineare Regression der Migrationswerte der Zelllinie CERV196 über verschiedene Konzentrationen an SDF-1 α

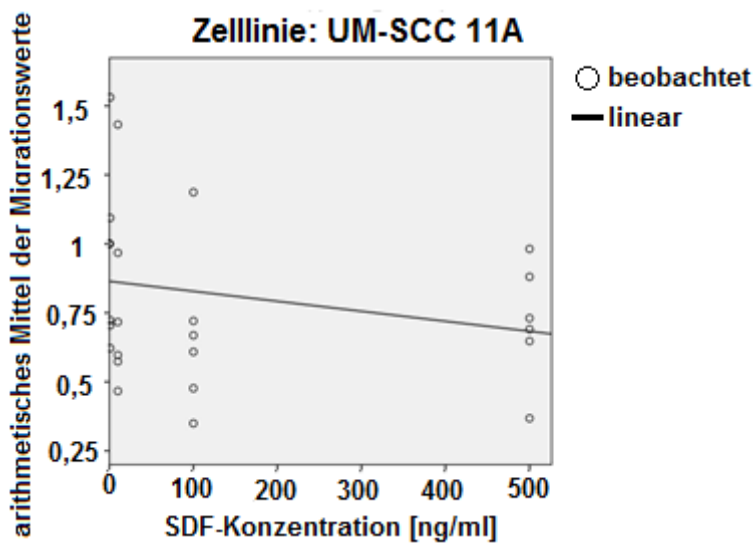


Abbildung 23: Lineare Regression der Migrationswerte der Zelllinie UM-SCC 11A über verschiedene Konzentrationen an SDF-1 α

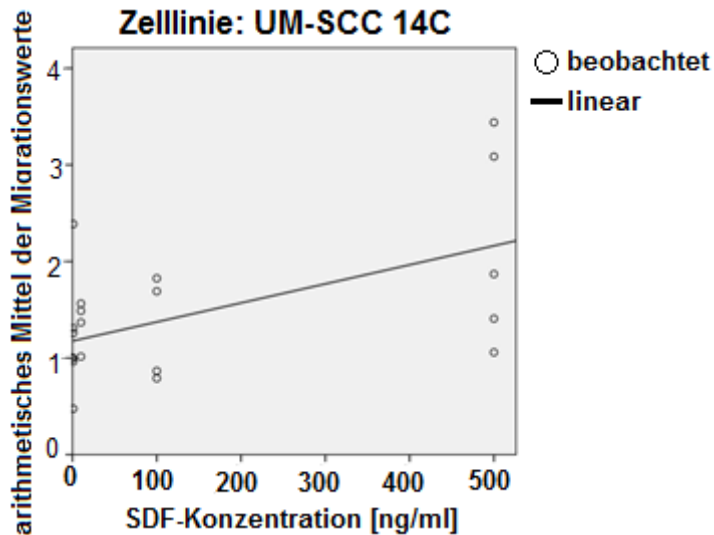


Abbildung 24: Lineare Regression der Migrationswerte der Zelllinie UM-SCC 14C über verschiedene Konzentrationen an SDF-1 α

3.5 Korrelation der Differenzen mit der Konzentration an SDF-1 α

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob etwaige Unterschiede zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien von der SDF-1 α -Konzentration abhängig sind und entsprechend mit ihr korrelierten, erfolgte eine statistische Auswertung wie folgt. Für die HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien wurden zunächst zu jeder Konzentration an SDF-1 α das Verhältnis der ermittelten Morphologie- und Migrationswerte zu den Werten der Negativkontrolle berechnet. Von diesen errechneten Faktoren wurde anschließend jeweils die Differenz zwischen HPV-negativen und HPV-positiven Zelllinien gebildet. Die so erhaltenen Differenzwerte wurden statistisch auf eine Korrelation mit der Konzentration an SDF-1 α untersucht. Aufgrund des beobachteten negativen Feedbacks und der damit verbundenen Hemmung der Zellmorphologie-Veränderung bei 500 ng/ml SDF-1 α wurden nur die Werte bis einschließlich 100 ng/ml mit eingeschlossen. Die Unterschiede bei der Veränderung der Zellmorphologie in Bezug auf die Podienbildung durch SDF-1 α korrelierten hochsignifikant mit der SDF-1 α -Konzentration ($p=0,00012$) (Abbildung 25). Eine signifikante Korrelation der Differenzen bei der Zell-Zell-Kontakt-Bildung mit SDF-1 α war nicht zu finden ($p=0,12$) (Abbildung 26). In Bezug auf die Beeinflussung des Migrationsverhaltens durch SDF-1 α zeigte sich bei den Unterschieden zwischen HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien ein Trend zur Korrelation mit der SDF-1 α -Konzentration ($p=0,053$) (Abbildung 27).

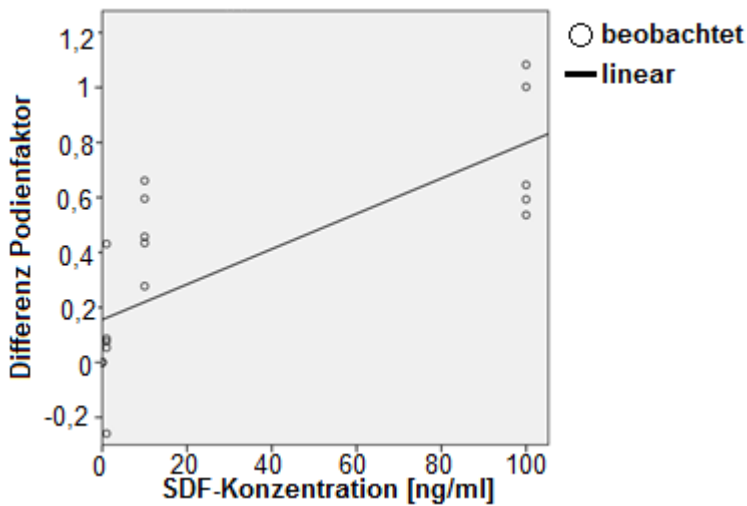


Abbildung 25: Lineare Regression der Differenz zwischen HPV-positiven und HPV-negativen SCCs bei der Ausbildung von Podien unter dem Einfluss von SDF-1 α über die Konzentration an SDF-1 α

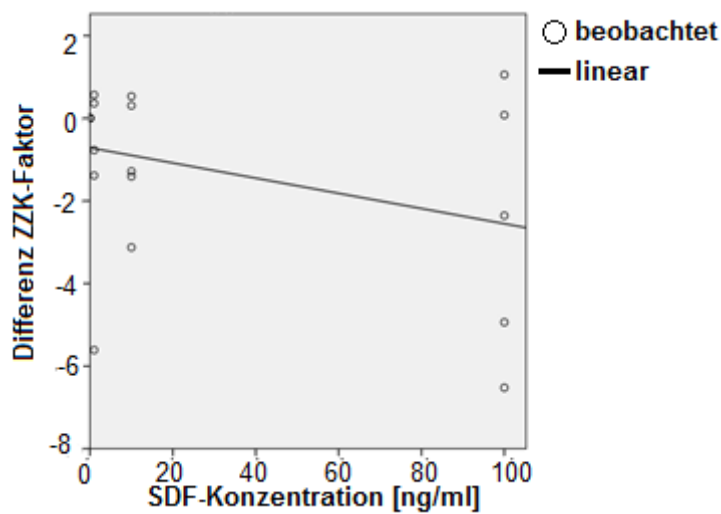


Abbildung 26: Lineare Regression der Differenz zwischen HPV-positiven und HPV-negativen SCCs bei der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten unter dem Einfluss von SDF-1 α über die Konzentration an SDF-1 α

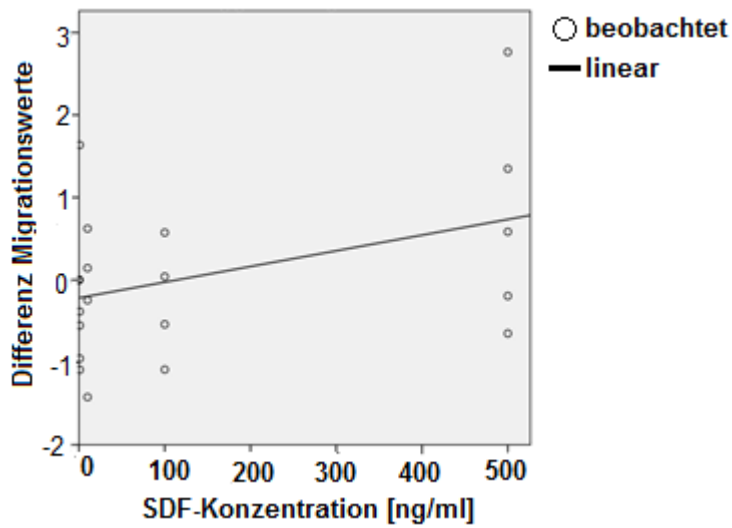


Abbildung 27: Lineare Regression der Differenz zwischen HPV-positiven und HPV-negativen SCCs bei der Migration unter dem Einfluss von SDF-1 α über die Konzentration an SDF-1 α

4 DISKUSSION

4.1 Die Expression von CD44 in HNSCC

CD44 ist ein Oberflächenmolekül, welches von verschiedenen Zellen des menschlichen Körpers exprimiert wird und als CSC-Marker für HNSCC diskutiert wird (Mack and Gires, 2008).

Sowohl in der Immunfluoreszenz, als auch in der immunhistochemischen Färbung konnten wir in allen drei untersuchten Zelllinien die Expression von CD44 nachweisen. Dabei zeigten wir ein hauptsächlich zytoplasmatisches Färbemuster.

Auffällig war hierbei der Nachweis der Expression von CD44 in der HPV-negativen SCC-Zelllinie UM-SCC 14C in der Immunhistochemie, bei der, im Gegensatz zu den anderen beiden Zelllinien, vereinzelte Zellnester nachweisbar waren, in denen sich eine intensiviertere, dichtere Expression von CD44 beobachten ließ. Faber et al. konnten ebenfalls verdichtete Bereiche an CD44-positiven Zellen in HNSCC-Proben finden, nämlich jeweils an den invasiven Fronten der Tumore, wo diese an das umgebende Gewebe wie z.B. Stromazellen grenzen (Faber et al., 2013a). Auch andere CSC-Marker wie ALDH1 und CK14 wurden vermehrt an der Tumor-Stroma-Grenze gefunden, ebenso wie an der Basalmembran von HNSCC (Sterz et al., 2010). Man darf vermuten, dass diese CSC-Marker-positiven Zellen einen besonderen Beitrag zur Invasion des Tumors in angrenzende Gewebe leisten und daher an den entsprechenden Stellen gruppiert und verdichtet zusammenliegen.

Ein CSC-Marker ermöglicht die Selektion und Anreicherung von Tumorzellen, welche Stammzeleigenschaften ähnlich den physiologischen Stammzellen des menschlichen Körpers aufweisen. Dabei kann der Marker entweder in diesen Zellen exprimiert (positive Selektion) oder nicht exprimiert (negative Selektion) werden.

Hierzu gehören unter anderem die Selbsterneuerung, die Proliferation und die Differenzierung. Eine aktuelle Methode zur Charakterisierung von CSCs über die Selektion via CSC-Markern besteht in der Reihentransplantation. Hierbei werden Zellen über einen definierten Marker aus einem Tumor heraus selektioniert und in immunsupprimierte Mäuse verpflanzt, in welchen die Entwicklung etwaiger Tumore beobachtet wird. Ein Hinweis darauf, dass es sich bei dem Marker um einen geeigneten CSC-Marker handelt, besteht in der Eigenschaft der tragenden Zellen, in Mäusen neue Primärtumore zu bilden. Damit wäre ein indirekter Rückschluss auf ein

exklusives tumorigenes Potential der Marker-positiven Tumorzellen möglich, wobei außerdem der Erhalt der CSC-Eigenschaften nach Transplantation *in vivo* nachgewiesen wäre. Eine der ersten dieser Reihentransplantationen gelang Prince et al., welche den in unserer Forschung verwendeten CSC-Marker CD44 nutzten um eine Subpopulation an Tumorzellen zu selektieren. Diese wurden in immunsupprimierte Mäuse transplantiert und bildeten weitere Tumore, im Gegensatz zu CD44-negativen Zellen, die keine weiteren Tumore bilden konnten (Prince et al., 2007). Es ist anzumerken, dass CD44 kein exklusiver CSC-Marker ist, ebenfalls in physiologischem Gewebe exprimiert wird (Mack and Gires, 2008; Wollenberg, 2011) und eine Rolle in vielen Zell-Zell-Interaktionen spielt (Jaggupilli and Elkord, 2012). Es muss davon ausgegangen werden, dass die eindeutige und definitive Identifikation von CSCs in Zukunft nur durch die Kombination von sowohl inkludierenden als auch exkludierenden Zelloberflächenmarkern erfolgreich sein kann. Zurzeit werden verschiedene dieser Marker diskutiert, welche entweder als inkludierende oder als exkludierende Parameter die Anreicherung von Tumorzellen mit Stammzeleigenschaften ermöglichen. Zu den inkludierenden Markern zählen CD44 (Prince et al., 2007), ALDH1 (Chen et al., 2009; Zhang et al., 2012), CD133 (Zhang et al., 2010), CD271 (Murillo-Sauca et al., 2014), Nanog und Oct4 (Chiou et al., 2008). Als mögliche exkludierende Marker werden CD3, CD10, CD18, CD31, CD64 und CD140 (Pries et al., 2008; Wollenberg, 2011) genannt.

Außerdem ist davon auszugehen, dass der molekulare Phänotyp von CSCs von der primären Tumorentität abhängig ist (Grosse-Gehling et al., 2013; La Porta, 2012; Prince et al., 2007). Wahrscheinlich kann nicht ein universeller, sondern vielmehr ein entitätsspezifischer Phänotyp von CSCs mittels einer Oberflächenmarker-Kombination repräsentiert werden. Die Bedeutung des Nachweises eines CSC-Markers liegt darin, dass mit ihm die Anreicherung von CSCs zu Forschungszwecken möglich wäre, um zielgerichtete Therapien zu entwickeln, welche dezidiert eben diese resistente Subpopulation der Tumorzellen angreifen und eradizieren könnten. Denn von dieser wird vermutet, dass sie nach anfänglichem Therapieerfolg lokale Rezidive und (Fern)metastasen wieder initiieren können (Mannelli and Gallo, 2012). Darüber hinaus wäre es denkbar, dass über die Bestimmung des Anteils an CSCs in soliden Tumoren eine bessere Prognoseeinschätzung für den individuellen Patienten möglich wäre. So zeigten Charafe-Jauffret et al. bereits, dass ein hoher Anteil an Tumorzellen, welche in einem Brustkrebs das als CSC-Marker diskutierte ALDH1

exprimierten, mit einer schlechteren Prognose einhergingen als bei jenen Tumoren, welche nur einen geringen Anteil der ALDH1-exprimierenden Zellen vorwiesen (Charafe-Jauffret et al., 2010).

4.2 Expression von CXCR4 in HNSCC

Das Zytokin SDF-1 α ist der Ligand für den 7-Transmembranrezeptor CXCR4. Dieser dient als Signalübertragungspunkt des extrazellulären Botenstoffes auf die intrazelluläre Signalkaskade, welche in den jeweiligen funktionellen Endpunkten resultiert (Baggiolini et al., 1994). In unseren Experimenten wurde der SDF-1 α -Rezeptor CXCR4 in allen drei Zelllinien mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen, was ebenfalls in der immunhistochemischen Färbung bestätigt werden konnte. Hierdurch stellen sie alle ein potentiell Ziel für den interzellulären Botenstoff SDF-1 α dar. Das verminderte, beziehungsweise nicht vorhandene Ansprechen der HPV-positiven Zellen auf SDF-1 α wäre als Differentialüberlegung auch auf ein vermindertes oder nicht vorhandenes Expressieren des Zielrezeptors zurückzuführen gewesen. Dies konnten wir jedoch über beide Färbemethoden ausschließen und damit einen die Kommunikation zwischen CSCs und ihrer Nische störenden Faktor intrazellulär vermuten. Die Markierung von CXCR4 gelang weiterhin vornehmlich auf der Zelloberfläche. Dies steht im Einklang zu den von anderen Autoren postulierten Beobachtungen, dass CXCR4 durch die Stimulation von SDF-1 α an die führende Seite einer zur Migration stimulierten Zelle verlagert wird, ein Mechanismus, welcher über lipid-rafts vermittelt wird (van Buul et al., 2003). In anderen Tumorentitäten wie dem Pankreaskarzinom wurden CXCR4-positive Zellen hauptsächlich an der invasiven Tumorfront nachgewiesen, was ihre Bedeutung in der Kommunikation mit und dadurch ihre notwendige Exposition gegenüber der Tumorumgebung unterstreicht (Hermann et al., 2007). Auch die Vermittlung eines negativen Feedbackmechanismus über den CXCR4-Rezeptor wird diskutiert (Fruehauf et al., 2002). Dies lässt sich ebenfalls in Einklang mit dem Absinken der Podienbildung in den HPV-negativen Zelllinien bei hohen Konzentrationen an SDF-1 α bringen, eventuell ebenso wie die verminderte Migration der HPV-negativen Zelllinie UM-SCC 11A unter dem Einfluss von SDF-1 α .

4.3 Einfluss von SDF-1 α auf die Zellproliferation

Auch wenn SDF-1 α primär als Zytokin bekannt ist, welches die chemotaktische Migration von Zellen reguliert, so stellt sich auch die Frage, ob es einen signifikanten Einfluss auf die Proliferation von CSCs besitzt. Hierbei herrscht keine Einigkeit in der Literatur. Sowohl Studien, welche einen Einfluss von SDF-1 α auf die Zellproliferation beschreiben (Lataillade et al., 2000), als auch solche, welche ihn nicht nachweisen konnten (Faber et al., 2007; Kijowski et al., 2001; Phillips et al., 2003), wurden publiziert. Weiterhin war für uns von Interesse, ob sich diesbezüglich etwaige Unterschiede zwischen HPV-positiven und HPV-negativen SCCs aufzeigen lassen. Vergleicht man den durchschnittlichen Proliferationsindex der HPV-positiven und der HPV-negativen SCCs, so zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem höheren Wert der HPV-negativen Zelllinien ($p= 0,036$). Im Vergleich der Proliferationswerte bei den einzelnen Konzentrationen an SDF-1 α zeigen sich jedoch keine signifikanten Unterschiede (SDF-1 α 0 ng/ml: $p= 0,316$; 1 ng/ml: $p= 0,479$; 10 ng/ml: $p= 0,426$; 100 ng/ml: $p= 0,331$; 500 ng/ml: $p= 0,349$). Dies verdeutlicht, dass ein niedriges Signifikanzniveau nur durch die Auswertung einer großen Teilmenge erreicht werden kann, so dass wir insgesamt nicht von einem signifikanten Unterschied zwischen HPV-positiven und HPV-negativen SCCs in Bezug auf das Proliferationsverhalten ausgehen. Jedoch galt unser primäres Interesse nicht den grundsätzlichen Rohwerten, sondern vielmehr der Veränderung dieser Proliferationswerte unter dem Einfluss von SDF-1 α . Unsere Ergebnisse zeigen keine signifikanten Unterschiede der Proliferationsindices von SCCs, welche mit SDF-1 α inkubiert wurden, gegenüber den Negativkontrollen. Die nicht signifikanten Korrelationsuntersuchungen bestärken die Vermutung, dass SDF-1 α keinen signifikanten Einfluss auf die Zellproliferation nimmt. Damit stehen unsere Experimente im Einklang mit den Ergebnissen von Studien, die ebenfalls keine signifikanten Änderungen des Proliferationsverhaltens von Zellen unter dem Einfluss von SDF-1 α nachweisen konnten (Faber et al., 2007; Kijowski et al., 2001; Phillips et al., 2003). Es ist jedoch anzumerken, dass in diesen Studien hauptsächlich der Effekt von SDF-1 α auf CD34⁺ hämatopoetische Progenitorzellen untersucht worden war.

Ein grundsätzlicher Einfluss von SDF-1 α auf das Proliferationsverhalten von Zellen lässt sich dadurch nicht sicher ausschließen. Jedoch scheint der Einfluss nicht so eindeutig nachweisbar zu sein, wie er es in Bezug auf morphologische Veränderungen oder auf das Migrationsverhalten in unseren Experimenten war.

Möglicherweise werden für einen signifikanten Einfluss von SDF-1 α auf das Proliferationsverhalten von Tumorzellen höhere Konzentrationen dieses Zytokins oder noch weitere Co-Stimulatoren benötigt.

4.4 Einfluss von SDF-1 α auf die Zellmorphologie

Ein wichtiges Kriterium von malignen Tumorzellen ist ihre Fähigkeit, sich zielgerichtet fortzubewegen und somit sowohl eine lokale Invasivität, als auch metastatische Absiedelungen zu erreichen. Während lokal begrenzte Tumore häufig noch die Möglichkeit zur Kuration durch eine chirurgische Resektion bieten, bedeuten (fern)metastasierte Tumore häufig bereits eine schwerer zu behandelnde, unter Umständen palliative Situation für den Patienten. Eine Voraussetzung für die zielgerichtete Fortbewegung von Zellen ist die Ausbildung von Podien, welche die Zelle zur Fortbewegung befähigen. Dabei kann es sich sowohl um einen prominenten Uropod, als auch um mehrere feinere Filopodien handeln. Erfahren Tumorzellen durch einen exogenen Stimulus eine Änderung ihrer Morphologie hin zu diesen migrationsbefähigten Phänotypen, so spricht dies für eine erhöhte Bereitschaft zur Migration, welche einhergeht mit der Möglichkeit zur Invasion und Metastasierung. Dies stellt einen prognostisch ungünstigen Faktor für den betroffenen Patienten dar. Einen wichtigen dieser exogenen Stimuli stellt das Zytokin SDF-1 α dar, welches die Interaktion zwischen CSCs und ihrer Tumorstammzellnische mitreguliert. Unser Ziel war es, durch eine Quantifizierung und den Vergleich dieser phänotypischen Veränderungen von HPV-positiven und HPV-negativen SCCs unter dem Einfluss von SDF-1 α , die Bedeutung des Zytokins SDF-1 α für die Invasivität und das Metastasierungsverhalten von HNSCCs zu verstehen. Außerdem untersuchten wir die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten in HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien bei verschiedenen Konzentrationen an SDF-1 α . Unsere Ergebnisse zeigen, dass in Bezug auf die Ausbildung von Podien HPV-negative SCCs signifikant besser durch alle untersuchten Konzentrationen an SDF-1 α stimulierbar zu sein scheinen als HPV-positive SCCs. Auch zeigt sich eine signifikant positive Korrelation zwischen der Konzentration an SDF-1 α und der Ausbildung von Podien in den HPV-negativen Zelllinien, nicht jedoch in der HPV-positiven Zelllinie. Die Ausbildung der Zell-Zell-Kontakte bei verschiedenen Konzentrationen an SDF-1 α zeigte lediglich in den HPV-negativen Zelllinien bei einer

SDF-1 α -Konzentration von 100 ng/ml einen signifikanten Unterschied zur Negativkontrolle. Eine Korrelation der Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten mit der Konzentration an SDF-1 α konnten wir in keiner der Zelllinien nachweisen. Daher kann insgesamt davon ausgegangen werden, dass der Einfluss des Zytokins SDF-1 α keinen signifikanten Einfluss auf die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten hat.

Hier bleibt zu erwähnen, dass unsere Experimente in Bezug auf die Änderung der Zellmorphologie im Sinne der Ausbildung von Podien unter dem Einfluss von SDF-1 α deutlich signifikantere und damit eindeutiger Ergebnisse erbrachten als bei der Untersuchung des Migrationsverhaltens. Bei gleichem Stimulus, nämlich SDF-1 α , und gleichen Konzentrationen desselben, jedoch unterschiedlicher Ausprägung von funktionellen Endpunkten, spricht diese Beobachtung für komplexe Signalwegverzweigungen, nicht aber für die monodirektionale Fortführung eines einzigen Signales (Faber et al., 2007; Goichberg et al., 2006; Petit et al., 2005). Die Ausbildung von Podien scheint nur einer der benötigten Schritte zu sein, die eine Tumorzelle durchlaufen muss, um die Befähigung zur stimulationsadäquaten und zielgerichteten Migration zu erlangen. Während alle Konzentrationen von SDF-1 α in unseren Experimenten eine deutliche und hochsignifikante Änderung der Morphologie bei HPV-negativen Zelllinien auslösten, so war die Beeinflussung der Migration nicht bei allen Konzentrationen an SDF-1 α so signifikant, dass von einer linearen Proportionalität zwischen der Ausbildung von Podien und dem Migrationsvermögen ausgegangen werden kann. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, dass die SDF-1 α /CXCR4-Achse an unterschiedlichen Stellen von anderen Signalwegen beeinflusst wird und so deutlich komplexere Zusammenhänge zwischen Stimulus-Input und funktionellem Output zu erwarten sind.

4.5 Einfluss von SDF-1 α auf die Zellmigration

Die zielgerichtete Migration ist für Tumorzellen eine wichtige Fähigkeit. Sie ermöglicht lokales, invasives Wachstum und die Initiierung von Fernmetastasen über das Einbrechen von zunächst regional beschränkten Tumoren in Transportsysteme wie das Blut- oder das Lymphsystem. Dafür benötigen die Tumorzellen spezielle Fähigkeiten, wie die Penetration und den Wiederaufbau der extrazellulären Matrix (Nakajima et al., 1993). Diese Aufgaben wiederum können die Tumorzellen mittels spezieller Enzyme wie den Matrix-Metalloproteinasen (MMP) erfüllen,

welche Gefäßgrenzen aufbrechen und Komponenten der extrazellulären Matrix degradieren (Schultz et al., 2011). Das Vorhandensein der MMP-2 und -9 konnte bereits an der invasiven Front von HNSCCs nachgewiesen werden (Sterz et al., 2010). Bemerkenswerterweise ist auch eine erhöhte Aktivität der Sekretion von MMP-9 unter dem Einfluss von SDF-1 α beschrieben (Majka et al., 2000).

CSCs scheinen außerdem in der Lage zu sein, zwischen zwei spezialisierten Phänotypen wechseln zu können. Während die epitheliale Form für eine residente, auf Proliferation ausgelegte Aufgabe spezialisiert ist, ist die mesenchymale Form insbesondere für die zelluläre Migration differenziert (Keysar et al., 2017). Zur Erlangung dieser mesenchymalen Form durchgehen die CSCs die sogenannte epithelial-mesenchymale Transition (EMT) (Biddle et al., 2011). Induziert wird die EMT durch verschiedene Signale des Stromas, wie beispielsweise *transforming growth factor beta* (TGF- β), welche zu einer Herunterregulierung von epithelialen Produkten wie E-cadherin und einer Hochregulierung von EMT-induzierenden Transkriptionsfaktoren wie Twist oder Snail führen (Thiery, 2003; Yang et al., 2004). Neuere Studien zeigen jedoch auch, dass die CSCs die Befähigung zur Migration erlangen können ohne die EMT zu durchlaufen, wobei die dahinterstehenden Mechanismen noch nicht abschließend geklärt sind. Kommt es jedoch zur EMT, so zeigen sich diese Phänotypen resistenter gegen moderne Chemotherapeutika, was ebenfalls die Bedeutung des Migrationspotentials für das Schicksal von Tumorzellen unterstreicht (Fischer et al., 2015; Zheng et al., 2015). Zusammengefasst erhöhen diese Migrationsmechanismen das TNM-Stadium von Malignitäten aller Ätiologien, was grundsätzlich mit einer geringeren Heilungschance und mit einer verschlechterten Prognose für den Patienten einhergeht. Zusätzlich ergibt sich durch das CSC-Modell eine weitere Möglichkeit, bei welcher die zielgerichtete und vor allem auch stimulusabhängige Migration einen Überlebensvorteil für Tumorzellen darstellt. Denn durch entsprechende Botenstoffe wie beispielsweise SDF-1 α können die CSC-Nischen einen chemotaktischen Einfluss auf die CSCs nehmen, welche dann in der Nische unter abschirmender Protektion eine antineoplastische Therapie im Sinne von Chemo- oder Strahlentherapien überleben können (Chikamatsu et al., 2011).

Daher zielte unsere Forschung darauf ab, inwiefern das Migrationsverhalten von HPV-positiven und HPV-negativen SCCs durch verschiedene Konzentrationen an SDF-1 α beeinflusst werden kann.

Die HPV-negative SCC-Linie UM-SCC 14C zeigte mit steigenden Konzentrationen an SDF-1 α eine intensiviertere Migration entlang eines chemotaktischen Gradienten, welche bei 10 ng/ml und 500 ng/ml signifikant höher als die der Negativkontrolle war. Außerdem tendierte das Migrationsvermögen dazu, mit der Konzentration an SDF-1 α zu korrelieren. Wir konnten hierdurch im Wesentlichen die Ergebnisse anderer Forschungsgruppen reproduzieren, welche das Zytokin SDF-1 α als Stimulus zur verstärkten Migration in Richtung einer erhöhten Konzentration an SDF-1 α beschrieben hatten (Faber et al., 2013b). Das Migrationsverhalten der HPV-positiven SCC-Linie CERV196 zeigte hingegen keine signifikante Änderung unter verschiedenen Konzentrationen an SDF-1 α im Vergleich zur Negativkontrolle. Entsprechend zeigte sich auch keine signifikante Korrelation des Migrationsvermögens von CERV196 mit der Konzentration an SDF-1 α . Während die HPV-negative SCC-Linie UM-SCC 11A in der Veränderung der Zellmorphologie ein Verhalten kongruent zu dem der HPV-negativen SCC-Linie UM-SCC 14C zeigte, so zeigte sich bezüglich des Migrationsverhaltens eine gegenläufige Beeinflussung durch SDF-1 α . Das Migrationsvermögen der UM-SCC 11A-Linie nahm unter steigenden Konzentrationen von SDF-1 α ab, welches bei SDF-1 α -Konzentrationen von 100 ng/ml und 500 ng/ml signifikant geringer als die Negativkontrolle war. Als Erklärung für dieses eigentlich paradoxe Verhalten bieten sich verschiedene Hypothesen an. Zum einen sind für die Funktion der SDF-1 α /CXCR4-Achse auch negative Feedbackmechanismen beschrieben (Fruehauf et al., 2002), welche also nicht nur eine Stimulation, sondern auch eine Hemmung der Zellmigration auslösen können. Möglicherweise ist dieser Feedbackmechanismus nicht ubiquitär einheitlich ausgeprägt, sondern wird bei verschiedenen Zelltypen wie der UM-SCC 11A-Linie schon bei niedrigeren Konzentrationen an SDF-1 α aktiviert als bei anderen Zelltypen wie der UM-SCC 14C-Linie. Hierdurch ließen sich trotz gleicher Ausprägung der Podienbildung bei steigenden SDF-1 α -Konzentrationen in den beiden HPV-negativen Zelllinien UM-SCC 11A und UM-SCC 14C auch die Unterschiede im Migrationsverhalten der beiden Zelllinien erklären. Jedoch sind auch bereits Studien publiziert, in welchen die Autoren die UM-SCC 11A-Zelllinie als Exempel für HPV-negative SCC-Zellen benutzten und in welchen sie durchaus eine Stimulierbarkeit des Migrationsvermögens der UM-SCC 11A-Zelllinie durch SDF-1 α nachweisen konnten (Faber et al., 2013b). Es kann also auch nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden, dass das Nichtansprechen der UM-SCC 11A-Zelllinie in

unseren Migrationsexperimenten nicht einem Versagen der Linie selbst aufgrund des Alters oder ähnlichen, individuellen Schwächen geschuldet ist.

Wir konnten zusätzlich zum Ansprechen der HPV-negativen SCC-Linie UM-SCC 14C auch ein Nichtansprechen der HPV-positiven SCC-Linie CERV196 auf den Migrationsreiz von SDF-1 α nachweisen und damit einen *in vitro* Unterschied der *in vivo* zu vermutenden Malignitätseigenschaften auf zellulärer Ebene.

Wie bereits ausgeführt hat ein vermindertes, zumindest nicht adäquat stimulierbares Migrationsvermögen seiner Zellen negative Folgen für einen Tumor. Ohne die Möglichkeit zur lokalen Ausbreitung *per continuitatem* oder zur Streuung von Fernmetastasen verbleiben die Tumore in einem niedrigen klinischen Stadium und sind dadurch therapeutischen Maßnahmen wie der chirurgischen Exzision besser zugänglich als in einem ausgedehnten und disseminierten Stadium.

Unsere Ergebnisse stehen in Einklang mit der klinischen Beobachtung, dass HPV-positive HNSCCs eine bessere Prognose für Patienten bieten als HPV-negative HNSCCs (Ang et al., 2010; Fakhry et al., 2008; Henneman et al., 2015). Ein vermindertes Migrationsvermögen von HPV-positiven HNSCC gegenüber HPV-negativen HNSCC unter dem stimulierenden Einfluss von SDF-1 α stellt somit eine zumindest anteilige Erklärung für die klinisch prognostische Überlegenheit von HPV-positiven HNSCC dar.

4.6 Die Immunsurveillance-Hypothese

Eine anerkannte Hypothese zur Erklärung des besseren klinischen Outcomes von Patienten mit HPV-positiven HNSCC gegenüber jenen mit HPV-negativen HNSCC ist die Theorie der Immunsurveillance. Aufgrund dessen, dass sie von vielen Autoren als bisher bester Erklärungsansatz aufgeführt wird, ist es von besonderem Interesse, unsere Ergebnisse dahingehend zu diskutieren. Die Immunsurveillance-Theorie basiert auf der Beobachtung, dass es bei immunkompetenten Menschen selten zur Entwicklung von Tumoren kommt. Es findet sich eine negative Korrelation zwischen der Immunkompetenz von Patienten und der Tumorinzidenzrate, wohingegen Patienten nach einer Organtransplantation unter immunsuppressiver Therapie oder *human immunodeficiency virus* (HIV)-infizierte Personen mit Entwicklung des *acquired immune deficiency syndrome* (AIDS) ein deutlich erhöhtes Risiko haben, Malignitäten verschiedener Ätiologien zu entwickeln (Grulich et al., 2007).

Besonders bezüglich der Entstehung von epithelialen Karzinomen scheint der Immunstatus eine kritische Rolle zu spielen. So weisen Mäuse mit Defiziten im angeborenen und erworbenen Immunsystem eine signifikant höhere Inzidenz für Epithelkarzinome auf, verglichen mit anderen Tumoren, welche sich üblicherweise im späteren Verlauf des Lebens entwickeln (Shankaran et al., 2001).

Die in unseren Experimenten verwendeten Zelllinien UM-SCC 14C, UM-SCC 11A und CERV196 entstammen allesamt Plattenepithelkarzinomen (Tabelle 1). Sie sind daher möglicherweise als Modell für die oben genannte Hypothese ebenfalls geeignet.

Es besteht die Hypothese, dass ein adäquat funktionierendes Immunsystem in der Lage ist, den Großteil an sich in der Entwicklung befindenden Malignitäten frühzeitig zu kontrollieren und zu eliminieren. Diese Überwachung der körpereigenen Zellen bezeichnet man als Immunosurveillance, das frühzeitige Verhindern des Tumorwachstums durch eine Intervention von Immunzellen als Immunoediting (Mapara and Sykes, 2004). Dieses Konzept wurde erstmals 1970 von Burnet formuliert (Burnet, 1970). Klinische Studien stützen diese Theorie insofern, als dass der Grad der Infiltration eines Tumors durch Lymphozyten positiv mit einer höheren Überlebensrate korreliert. Diese Beobachtung findet sich in verschiedenen Tumorentitäten, wie Brustkrebs (Marrogi et al., 1997), kolorektalen Karzinomen (Naito et al., 1998), Nierenkarzinomen (Nakano et al., 2001), Ösophaguskarzinomen (Schumacher et al., 2001) und Ovarialkarzinomen (Zhang et al., 2003). CSCs scheinen Mechanismen zu nutzen, durch welche sie sich dieser Immunosurveillance entziehen können und somit das Wachstum des Tumors ungehindert weiter vorantreiben können. Ein Überbegriff für dieses Entziehen ist die Immunevasion oder Immuntoleranz (Schwartz, 2012). Eine Problematik liegt in der Tatsache, dass CSCs grundsätzlich körpereigenen Zellen entspringen und entsprechend körpereigene Strukturen exprimieren, was ihnen schon *per se* eine gewisse Toleranz durch das Immunsystem verleiht. Während diese Selbsttoleranz einen Schutz gegen Autoimmunkrankheiten darstellen soll, erlaubt sie möglicherweise auch den Neoplasien ein weniger eingeschränktes Wachstum und eine ungehinderte Entwicklung (Mapara and Sykes, 2004). Abgesehen von dieser Eigenschaft zeigen CSCs eine Reihe weiterer Fähigkeiten zur Immunevasion. Dazu gehört die Expression von speziellen Oberflächenproteinen wie CD200, welches immunsupprimierende Eigenschaften vermittelt und eine häufige Co-Expression mit

CSC-Markern zeigt (Kawasaki et al., 2007). Auch die Aktivierung von inhibitorischen Signalkaskaden wie dem *programmed death 1* (PD-1) durch seine Liganden PD-L1 und PD-L2 (Augello et al., 2005; Dong et al., 2002) schützen Tumorzellen vor der Immunosurveillance durch T- und B-Lymphozyten. Weitere Liganden, welche von Tumorzellen exprimiert werden und an Rezeptoren auf Immunzellen andocken, sind der ebenfalls die T-Zellen-Apoptose induzierende Fas-Ligand (Gastman et al., 1999; Nakashima et al., 1999; Ohshima et al., 2001; Strand et al., 1996; Walker et al., 1998) und der die Apoptose von Natürlichen Killerzellen (NK) induzierende RCAS1 (Nakashima et al., 1999). Neben der Überexpression von Strukturen ist auch die Herabregulation von Oberflächenmolekülen eine Strategie der Immunevasion. Eine Herunterregulation von *Major Histocompatibility Complex* (MHC)-Molekülen der Klasse 1 verhindert die Lyse der Tumorzellen durch zytotoxische T-Lymphozyten und zeigt eine positive Korrelation mit der Tumorprogression, der Therapieresistenz und einem verschlechterten klinischen Outcome bei Patienten mit Melanomen (Cabrera et al., 2007; van Houdt et al., 2008). Auch die Sekretion von immunsuppressiven Interleukinen wie IL-10 oder TGF- β (Chen et al., 1994; Gorelik and Flavell, 2001; Inge et al., 1992; Tada et al., 1991) durch CSCs vermittelt eine verstärkte Toleranz des Immunsystems gegenüber den Tumorzellen. Außerdem scheint es, dass Tumorzellen in der Lage sind, in ihrer Gesamtheit immunsupprimierend wirkende regulatorische CD4⁺CD25⁺-T-Zellen zu rekrutieren, welche in der Nähe der Tumore und ihrer Mikroumgebung zu liegen kommen und dort eine Immunantwort vereiteln (Liyanage et al., 2002; Rohrer et al., 1999; Woo et al., 2001; Woo et al., 2002).

Bisher war die Rolle des HPV im Rahmen der Immunosurveillance-Hypothese nur insofern beschrieben, als dass es als exogener Faktor auch körperfremde Neoantigene mit in die Beziehung zwischen Tumor- und Immunzellen einbringt. Dies verschafft dem Immunsystem einen neuen Trigger, da die Immunzellen nun durch die HPV-Oberflächenantigene die befallenen Tumorzellen mit einer höheren Wahrscheinlichkeit als solche identifizieren und angreifen können (Dunn et al., 2002). Hierbei ist zu erwähnen, dass von manchen Autoren auch das verbesserte Ansprechen von HPV-positiven HNSCCs auf die Behandlung mit Chemotherapeutika oder einer Bestrahlungstherapie gegenüber den HPV-negativen HNSCCs auf eine immunvermittelte Kausalität zurückgeführt wird (Bol and Gregoire, 2014).

Zunächst scheinen unsere Ergebnisse die Immunosurveillance-Theorie nicht bekräftigen zu können, da unsere *in vitro*-Experimente ohne den *in vivo* dauerhaft

Einfluss nehmenden Faktor des Immunsystems ebenso Ergebnisse erbrachten, welche für eine bessere Prognose von HPV-positiven HNSCC sprechen. Bei fehlenden Immunzellen wurde in unseren Experimenten lediglich durch die Zugabe von SDF-1 α eine supportive Tumorstammzellnische simuliert. Tatsächlich jedoch stellt die Kommunikation und Interaktion der CSCs mit ihrer Tumorstammzellnische eine wichtige Komponente der Immunevasion dar. Die Tumorstammzellnische stellt den CSCs eine Mikroumgebung der Immunsuppression zur Verfügung, in der sich diese geschützt vor dem Einfluss des Immunsystems entwickeln können (Chikamatsu et al., 2011). Für diese Interaktion ist SDF-1 α ein kritischer Faktor, für welchen wir in unseren Ergebnissen eine verminderte Wirksamkeit auf HPV-positive CSCs gegenüber HPV-negativen CSCs nachweisen konnten.

Eine gestörte Kommunikation zwischen CSCs und Tumorstammzellnische bedeutet daher ein vermehrtes Ausgeliefertsein der CSCs gegenüber dem Immunsystem und mindert somit die Wahrscheinlichkeit auf Therapieresistenz und Tumorprogression. Unsere Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass das HPV zusätzlich zu seiner bisherigen Rolle, nämlich der Vermittlung eines Angriffspunktes auf infizierte Tumorzellen, auch die Vermittlung einer immunsuppressiven Mikroumgebung stören könnte. Somit zeigen unsere Ergebnisse die Rolle des HPV im Modell der Immunosurveillance in einem neuen Licht, in welchem es eine bedeutsamere Rolle spielen könnte als bisher angenommen.

Die Immunosurveillance-Hypothese liefert außerdem eine Reihe an hochaktuellen therapeutischen Ansätzen, welchen allen gemeinsam ist, dass sie die Toleranz des Immunsystems gegenüber den neoplastischen Zellen zu durchbrechen versuchen. Vielversprechend zeigen sich duale Antikörper wie Blinatumomab, welche eine Kopplung von Immunzellen (CD3 auf T-Zellen) und Tumorzellen (CD19 auf B-Zellen der akuten lymphatischen Leukämie (ALL)) schaffen und somit eine zielgerichtete Immunantwort initiieren sollen (Kantarjian et al., 2017). Eine andere Möglichkeit ist die *ex vivo* Generierung von T-Zellen, welche spezifisch gegen Tumorantigene gerichtet sind. Dies benötigt jedoch einen hohen zeitlichen und labortechnischen Aufwand, sowie das Vorhandensein von definierten und möglichst tumorspezifischen Antigenen. Das Homing-Verhalten und das Überleben solcher Klone sind zum derzeitigen Forschungszeitpunkt noch nicht optimal (Dudley et al., 2001). Interessanterweise konnten signifikante immunologische Antitumorantworten durch den Transfer von T-Zell-Klonen bisher bei Patienten mit

Epstein-Barr-Virus (EBV)-induzierten posttransplantierten lymphoproliferativen Erkrankungen beobachtet werden, bei denen die T-Zellen spezifisch gegen EBV-Antigene gerichtet waren (Papadopoulos et al., 1994; Rooney et al., 1995). Auch für andere EBV-assoziierte Malignitäten wie dem EBV-positiven Morbus Hodgkin könnte dies ein möglicher Ansatz sein (Sing et al., 1997). Es bleibt abzuwarten, ob das im Fokus unserer Forschung stehende HPV in Zukunft auch ein mögliches Zielantigen für spezifisch generierte T-Zellen darstellen könnte. Bereits bestehende Antigene wie der Oberflächenmarker p16, welcher auch in unserer HPV-positiven Zelllinie nachgewiesen wurde, könnten hierfür einen möglichen Angriffspunkt bieten. Dabei ist zu beachten, dass eine Infektion mit HPV keine exklusive Eigenschaft des Tumors darstellt, da auch nicht-dysplastische Epithelzellen von HPV befallen sein können. Jedoch würde die Selektion von HPV-positiven Zellen bereits eine Einschränkung der Zielstrukturen von immunmodellierenden Therapien darstellen. Dies würde eine gezieltere und damit möglicherweise nebenwirkungsärmere Tumorthherapie erlauben.

4.7 Beeinflussung der SDF-1 α /CXCR4-Achse durch das Humane Papillomavirus

Das Humane Papillomavirus (HPV) beeinflusst durch mutagene Gen- und Proteinveränderungen intrazelluläre Signalwege. Einige dieser mutierten Zielproteine sind beschrieben und befinden sich im Interesse der aktuellen Forschung (Agrawal et al., 2011; Lechner et al., 2013; Pullos et al., 2015; Swanson et al., 2016; Wang et al., 2015). Über die Beschreibung der mutierten Proteine ist es möglich, die phänotypischen Veränderungen, welche durch das HPV verursacht werden, auf molekularer Ebene zu erklären. Das in unseren *in vitro* Experimenten nachgewiesene verminderte Ansprechen von HPV-positiven SCCs auf SDF-1 α lässt vermuten, dass hier auch ein vermindertes Migrationsvermögen *in vivo* vorliegt. Dies könnte durch eben diese Proteinmutationen zumindest anteilig erklärt werden.

Der SDF-1 α /CXCR4-Signalweg ist noch nicht abschließend verstanden. Eine Reihe von wichtigen, in diese Signalkaskade involvierten Proteinen ist in Abbildung 28 dargestellt.

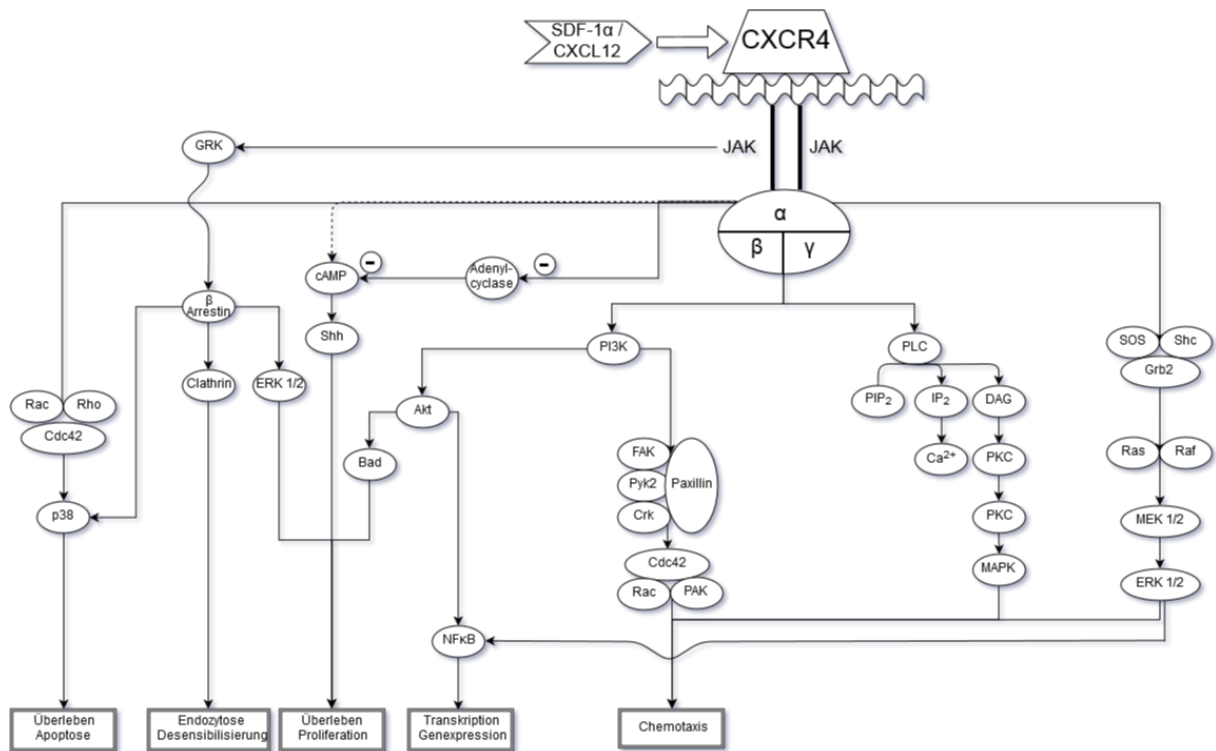


Abbildung 28: Der intrazelluläre Signalweg der SDF-1α/CXCR4-Achse (eigene Darstellung nach Inhalten von (Faber et al., 2013a; Ganju et al., 1998; Goichberg et al., 2006; Teicher and Fricker, 2010))

Es werden hier die Proteine verglichen, welche eine wichtige Rolle im SDF-1α/CXCR4-Signalweg einnehmen, und jene, welche bekannte Zielstrukturen für durch HPV verursachte Mutationen darstellen. Hierbei zeigen sich einige Überschneidungen der beiden Gruppen, welche in Tabelle 18 aufgeführt sind.

Tabelle 18: Überschneidungen von häufig durch HPV mutierten Proteinen und SDF-1 α /CXCR4-Signalproteinen sowie deren funktionelle Endpunkte (nach (Agrawal et al., 2011; Faber et al., 2013a; Ganju et al., 1998; Goichberg et al., 2006; Lechner et al., 2013; Pullos et al., 2015; Swanson et al., 2016; Teicher and Fricker, 2010; Wang et al., 2015))

| durch HPV mutiertes Protein im SDF-1α/CXCR4-Signalweg | betroffene funktionelle Endpunkte der SDF-1α/CXCR4-Signalkaskade |
|--|---|
| Akt/Proteinkinase B | Proliferation, Transkription, Überleben |
| MAPK | Chemotaxis, Transkription |
| NFκB | Transkription |
| PI3K α und γ | Chemotaxis, Proliferation, Transkription, Überleben |
| Raf | Chemotaxis, Transkription |
| Ras | Chemotaxis, Transkription |
| STAT | Transkription |

Proteine, welche durch virale oder andere Mutagene verändert werden, können in nur minimaler oder in schwerwiegenderer Form von ihrem ursprünglichen Wildtyp entfremdet werden. Bei einer nur minimalen Abweichung des mutierten Proteins von seinem Wildtyp ist es möglich, dass das mutierte Protein seine physiologische Funktion weitgehend ungehindert weiter erfüllen kann. Eine phänotypische Erscheinung dieser Mutation kann dann nahezu unentdeckt bleiben. Bei schwerwiegenderen Mutationen, welche die Struktur des ganzen Proteins oder besonders kritische Schlüsselstrukturen betreffen und die mutierte Form weit von der ihres Wildtyps entfernen, besteht die Möglichkeit, dass sich auch die Funktion des mutierten Proteins von seiner physiologischen Funktion differenziert. Dabei ist einerseits eine Überfunktion im Sinne einer dauerhaften Aktivierung ohne Ansprechen auf regulatorisch inhibierende Reize möglich. Ein Beispiel hierfür ist das sogenannte Philadelphia-Chromosom-Produkt Bcr-Abl (Ultimo et al., 2017). Diese Überfunktion ist gleichzeitig autonom von physiologischerweise benötigten stimulierenden Reizen (*gain-of-function*). Andererseits besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass sich eine Unterfunktion des betroffenen Proteins entwickelt, welche nicht auf stimulierende Reize von oberhalb der Signalkaskade anspricht (*loss-of-function*). In beiden Fällen stellt die Mutation eine Entkopplung des Proteins von seinen vor- und nachgeschalteten Signalwegen dar.

Es lässt sich die Hypothese stellen, dass eben diese Mutationen, hervorgerufen durch das HPV, die intrazellulären Proteine, welche in der Signalkaskade des

SDF-1 α /CXCR4 enthalten sind, dermaßen von ihrem ursprünglichen Wildtyp entfremden, dass sie ihre physiologische Rolle im SDF-1 α /CXCR4-Signalweg nicht mehr erfüllen können. Unter der Prämisse dieses Nichtansprechens der HPV-positiven CSCs auf den Reiz von SDF-1 α lassen sich zwei Szenarien vermuten:

1. Der Mutationstyp ist *per se* nicht mehr in der Lage, von SDF-1 α stimuliert zu werden (*loss-of-function*).
2. Der Mutationstyp ist dauerhaft stimuliert und kann nicht darüber hinaus noch weiter von SDF-1 α stimuliert werden (*gain-of-function*).

Beide Optionen resultieren darin, dass die Tumorzelle auf einen situationsinduzierten Stimulus nicht situationsadäquat reagieren kann. So könnte sich erklären lassen, dass die HPV-positiven Zellen nicht in dem Maße durch SDF-1 α stimuliert werden können, wie es bei den HPV-negativen Zellen und den womöglich erhaltenen Wildtypen der Signalkaskaden-Proteine der Fall ist.

Eine besondere Bedeutung kommt hierbei dem Abschnitt der SDF-1 α /CXCR4-Achse zugute, welcher unter der Kontrolle der *Phosphoinositid-3-Kinase* (PI3K) steht, da hier die häufigsten Aberrationen bei der Entwicklung von Karzinomen zu finden sind (Janku, 2013). Durch das Andocken von spezifischen Liganden an Transmembran-Tyrosin-Kinase-Rezeptoren wie ErbB-, *fibroblast growth factor* (FGFR)-, *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) und andere Rezeptoren (Knuefermann et al., 2003; Stern, 2008) wird die PI3K aktiviert, welche wiederum *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat* (PIP₂) zu *Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat* (PIP₃) phosphoryliert (Zhao and Vogt, 2008). Die Aktivierung von PI3K kann auch durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren wie Ras erfolgen (Stephens et al., 1997; Zhao and Vogt, 2008). Durch den Second-Messenger PIP₃ kommt es zur Aktivierung der *Proteinkinase B* (Akt) (Alessi et al., 1997; Cantley, 2002), welche den *Tuberous Sclerosis Complex* (TSC) phosphoryliert und somit dessen hemmende Wirkung auf das *mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR) aufhebt. Ohne diese Phosphorylierung hydrolysiert die TSC2-Untereinheit des TSC die kleine GTPase *Ras-homolog-enriched-in-brain* (Rheb) und verhindert so deren Aktivierung von mTOR (Manning and Cantley, 2003). Die entfallende Inhibierung von mTOR wiederum führt über die Aktivierung von *eukaryotic translation initiation factor eIF4E-binding protein 1* (4EBP1) und *p70S6 kinase* (S6K) zu einer erhöhten Proteinsynthese, welche unter anderem in einer erhöhten Proliferation und einem verbesserten Zellüberleben resultiert (Engelman et al., 2006). Tumor-Suppressor-Proteine beeinflussen diesen Signalweg.

Die Tumor-Suppressor-Phosphatase *Phosphatase and tensin homologue* (PTEN) wirkt als Antagonist von PI3K, indem sie PIP_3 zu PIP_2 dephosphoryliert (Polivka and Janku, 2014), welches wiederum durch die *inositol polyphosphate 4-phosphatase type II* (IP4P 2) zu *phosphatidylinositol monophosphate* (PIP) umgewandelt wird (Agoulnik et al., 2011). Die *Serin-Threonin-Kinase 11* (STK11) aktiviert die *AMP-aktivierte Proteinkinase* (AMPK), welche die TSC2-Untereinheit phosphoryliert, sie somit aktiviert und dadurch zur Hemmung von mTOR beiträgt. Die Bedeutung der STK11 zeigt sich bei Patienten mit dem sogenannten Peutz-Jeghers-Syndrom, bei welchen sie inaktiviert vorliegt und ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung von kolorektalen, Magen- und Mamma-Karzinomen begünstigt (Kuwada and Burt, 2011). Die Tatsache, dass der PI3K-Akt-mTOR-Signalweg unter strenger Kontrolle von Tumorsuppressor-Proteinen steht und dass ein Ausfall dieser Regulation zur Entwicklung von Malignitäten führen kann, unterstreicht seine Bedeutung für die neoplastische Progression. Gleichzeitig lässt sich daraus aber auch ableiten, dass sowohl eine *loss-of-function*-, als auch eine *gain-of-function*-Mutation im Sinne einer Entkopplung der SDF-1 α /CXCR4-Achse hemmende Auswirkungen auf eine HPV-infizierte Tumorzelle hätten. Ein vergleichbarer Mutationsmechanismus, wie er von uns in der SDF-1 α /CXCR4-Achse zur Erklärung der überlegenen Prognose von HPV-positiven HNSCCs vorgeschlagen wird, findet sich bei speziellen HPV-induzierten Mutationen des Tumorsuppressorgens p53. Hier konnte nachgewiesen werden, dass HPV im Gegensatz zu anderen Karzinogenen einen nur partiellen Mutationstyp von p53 verursachen kann, welcher zumindest noch anteilig dem seines Wildtyps gleicht. Während hierbei niedrige Level an funktionsfähigen p53 erhalten bleiben, sind diese noch anfällig für einen Radiatio-induzierten DNA-Schaden, welcher nach einem Ansprechen des p53 zum partiellen Zellarrest und einer erhöhten Rate an Zelltoden führt (Kimple et al., 2013). Auch hier sind HPV-induzierte Mutationen von Zellregulationsmechanismen der Grund für eine vermehrte Anfälligkeit von Tumorzellen gegenüber herkömmlichen Therapieoptionen wie der Bestrahlung im Vergleich zu HPV-negativen Karzinomen mit anderen Karzinogenen.

4.8 Anwendung der Bidirektionalitätsüberlegung

Die Regressionsanalysen unserer Experimente deuten auf einen linearen Zusammenhang zwischen steigenden SDF-1 α -Konzentrationen und den morphologischen und chemotaktischen Auswirkungen auf die CSCs *in vitro* hin. Bei dem Design der Experimente wurde jedoch der Einfluss der Stammzellnische über den SDF-1 α /CXCR4-Signalweg unidirektional isoliert betrachtet. Im menschlichen Körper ist jedoch von einer Bidirektionalität auszugehen, bei der nicht nur die Stammzellnische die CSCs, sondern auch die CSCs die Stammzellnische stimulieren (Bao et al., 2006). Es handelt sich somit hierbei um zwei voneinander abhängige Stimulatoren, welche über eine positive Feedbackschleife miteinander verknüpft sind und sich gegenseitig potenzieren. *In vivo* ist kein linearer Zusammenhang zu erwarten, sondern vielmehr eine Exponentialfunktion, deren Störung oder kompletter Ausfall gravierendere Einschränkungen zur Folge hätten, als es der Wegfall eines konstanten Stimulus hätte.

4.9 Bedeutung von endogenen Leveln an SDF-1 α

Studien haben bereits gezeigt, dass HPV-positive HNSCC eine bessere klinische Prognose für den betroffenen Patienten erwarten lassen als HPV-negative HNSCC (Ang et al., 2010; Fakhry et al., 2008; Henneman et al., 2015; Rieckmann et al., 2013). Die Bestimmung von prognostischen Faktoren besitzt im klinischen Alltag einen hohen Wert im Rahmen von Risiko-Nutzen-Abwägungen bei der Entscheidung von Diagnostik- und Therapie-Schemata. Zeigen Patienten mit gewissen Risikofaktoren eine grundsätzlich gute Prognose, so spielt die Anwendung von invasiven und nebenwirkungsreichen Therapien wie Chemotherapeutika oder einer Radiatio-Therapie eine andere Rolle als bei Patienten, welche mit dem Vorhandensein oder der Abwesenheit anderer Risikofaktoren eine grundsätzlich schlechtere Prognose haben. Die wissenschaftliche Empirik zeigt, dass Prognosen nur selten von einzelnen Faktoren abhängig sind. Vielmehr ergeben sich Konstellationen mehrerer Faktoren, welche durch gegenseitige Interaktionen und in ihrer Gesamtheit eine Einschätzung der Prognose von individuellen Patienten mit der gleichen Grunderkrankung erlauben. Unsere Fragestellung war nun, inwiefern die endogene Konzentration eines Individuums an SDF-1 α einen Einfluss auf die Bedeutung des HPV-Status in HNSCC hat. Die signifikant positive Korrelation der

Differenzen in Bezug auf Morphologie und Migration zwischen HPV-positiven und HPV-negativen HNSCC-Zelllinien mit der Konzentration von SDF-1 α legt die Vermutung nahe, dass HPV-positive und HPV-negative HNSCCs sich wahrscheinlich nicht grundsätzlich mit derselben Relevanz im klinischen Outcome unterscheiden. Wäre dies der Fall, so wäre zu erwarten gewesen, dass die Differenzen im Migrations- und Morphologieverhalten von HPV-positiven und HPV-negativen Zelllinien über die verschiedenen Konzentrationen an SDF-1 α sogar konstant, mindestens aber statistisch unabhängig von der SDF-1 α -Konzentration gewesen wären. Der Impact, welchen der HPV-Status des HNSCC auf das klinische Ergebnis, das Outcome und die Rezidivfreiheit hat, ist daher jedoch viel mehr von verschiedenen endogenen Faktoren des individuellen Patienten abhängig. So wäre zu vermuten, dass bei Patienten, welche aufgrund verschiedenster Faktoren und Präpositionen hohe endogene Level an SDF-1 α produzieren, der HPV-Status eines HNSCC oder eines sonstigen Plattenepithelkarzinoms einen stärkeren Einfluss auf ihre Prognose hat, als bei Patienten, welche niedrige Level an SDF-1 α besitzen. Natürlich ist es sehr unwahrscheinlich, dass SDF-1 α der einzige Faktor zur Entscheidung dieses Einflusses ist. Vielmehr lässt sich die Hypothese aufstellen, dass aufgrund multipler und vielfältiger Faktoren der individuelle Impact des HPV-Status bei HNSCC-Patienten interindividuell variiert. Es stellt sich also die Frage, ob aufgrund von verschiedenen Untersuchungen die Relevanz des HPV-Status von HNSCC vorhergesagt werden kann. Diese Frage ist insofern noch zukunftsorientiert, dass aufgrund der bislang noch nicht vollständig verstandenen Pathomechanismen von HPV in HNSCC insbesondere im Zusammenspiel mit den CSCs und Stammzellnischenfaktoren wie SDF-1 α die Bestimmung des HPV-Status erst seit kurzem Einzug in die klinische Routinediagnostik zur TNM-Klassifikation bei Oropharynx-Karzinomen gehalten hat (Brierley J et al., 2017). Insofern bleibt der Einfluss der Anpassung des Therapieregimes an das Ergebnis der prätherapeutischen Bestimmung des HPV-Status von HNSCCs im klinischen Alltag in der Zukunft von weiterem Interesse. Weiterhin ist es, wie oben aufgeführt, gut vorstellbar, dass nicht nur der alleinige HPV-Status für eine Risiko-Nutzen-Kalkulation von eventuellen Therapiemöglichkeiten wie Chemotherapie oder Radiatio zu Rate gezogen wird.

Vielmehr könnte dieser mit einer Reihe von Untersuchungen kombiniert werden, wie zum Beispiel der Bestimmung der endogenen Level an SDF-1 α , um so seinen

Einfluss auf das Outcome des Patienten besser quantifizieren zu können. Dies würde eine adäquatere Kalkulation des Risiko-Nutzen-, beziehungsweise Nebenwirkung-Nutzen-Verhältnisses erlauben und damit eine individualisierte und adäquate Therapie der Patienten mit HNSCC.

4.10 Schlussfolgerung und Ausblick

SDF-1 α hat keinen signifikanten Einfluss auf das Proliferationsverhalten von SCC-Zelllinien. HPV-negative SCC-Zelllinien lassen sich signifikant durch SDF-1 α stimulieren in Bezug auf eine erhöhte Migrationsrate und eine vermehrte Podienbildung. Die Stimulation von zur Migration befähigenden Podien geschieht dabei in konzentrationsabhängiger Korrelation. Die HPV-positive SCC-Zelllinie war durch keine der Konzentrationen an SDF-1 α in Bezug auf eine der oben genannten Charakteristiken stimulierbar. Dies passt zu der klinisch beobachteten überlegenen Überlebensrate von HPV-positiven HNSCCs. Denn die Fähigkeit zur Migration, welche unter anderem durch Zytokine wie SDF-1 α vermittelt wird, ist für lokale Invasivität und Fernmetastasierung von Karzinomen zwingend erforderlich. Auch für den protektiven Einfluss der CSC-Nische auf die CSCs spielen Zytokine wie SDF-1 α eine wichtige Rolle. Eine gestörte Kommunikation zwischen CSCs und ihrer Nische resultiert in einem vermehrten Ausgeliefertsein der CSCs gegenüber antineoplastischen Faktoren wie Chemotherapeutika. Die hier formulierte Hypothese von HPV-Onkogen-assoziierten Mutationen in den Proteinen der SDF-1 α /CXCR4-Achse ist in der Lage, die *in vitro* Ergebnisse unserer Experimente auf molekularer Ebene zumindest anteilig zu erklären. Die Ergebnisse dieser Arbeit bieten somit auch einen schlüssigen Erklärungsansatz für die klinisch überlegene Prognose von HPV-positiven HNSCCs. Zukünftige Herausforderungen werden sein, die Pathophysiologie der Tumorgenese, vor allem auch der HPV-assoziierten, besser zu verstehen und diesen Erklärungsansatz weiter auszubauen. Im Sinne der translationalen Forschung wäre ein weiteres Ziel, die geschwächten Resistenzmechanismen in HPV-positiven CSCs zu instrumentalisieren, sie auf medikamentöser Basis zu etablieren und der klinischen Praxis zugänglich zu machen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Es wird diskutiert, dass Tumorstammzellen dafür verantwortlich sind, dass maligne Tumore nach initialem Therapieansprechen lokale Rezidive und Metastasen bilden. Diese Zellpopulation zeigt eine Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung. Ein möglicher Faktor für die Vermittlung dieser Resistenz stellt ihre Kommunikation mit ihrer Mikroumgebung, der Tumorstammzellnische, dar. Dabei gilt das Zytokin SDF-1 α mit seinem Rezeptor CXCR4 als bedeutsamer Mediator. Patienten mit Humane-Papillomaviren (HPV)-positiven Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region (HNSCC) haben eine deutlich höhere Überlebensrate als solche mit HPV-negativen. In dieser Dissertation wurde der Einfluss von SDF-1 α auf das Proliferations-, Migrations- und Morphologieverhalten einer HPV-positiven und zweier HPV-negativer Tumorzelllinien untersucht. Es wurde die Expression des Tumorstammzell-Markers CD44 und des SDF-1 α -Rezeptors CXCR4 mittels Immunfluoreszenz und Immunhistologie in allen drei Zelllinien nachgewiesen. Unter dem Einfluss von SDF-1 α wurden signifikant mehr Zellen der HPV-negativen Zelllinie UM-SCC 14C zur chemotaktischen Migration stimuliert, nicht jedoch in der HPV-positiven Zelllinie CERV196. SDF-1 α stimulierte die Podienbildung der HPV-negativen Zelllinien in einer dosisabhängigen Korrelation. Im Gegensatz dazu war die Ausbildung von Podien in der HPV-positiven Zelllinie durch SDF-1 α nicht signifikant stimulierbar. Die Proliferation war in keiner der Zelllinien durch SDF-1 α beeinflussbar. Die HPV-negativen Zelllinien waren somit deutlich besser durch SDF-1 α stimulierbar als die HPV-positive Zelllinie. Dies passt zu der klinisch überlegenen Prognose von HPV-positiven HNSCC, da die Podienbildung und die zielgerichtete Migration Voraussetzungen für lokale Invasion und Metastasierung darstellen. Zusätzlich dazu wäre der protektive Einfluss der Tumorstammzellnische auf die Tumorstammzellen eingeschränkt. Eine mögliche Erklärung hierfür bietet die formulierte Hypothese, dass Schlüsselproteine der SDF-1 α /CXCR4-Achse durch virale Onkogene des HPV mutiert werden und ihre physiologische Funktion nicht mehr erfüllen können. Die hier gewonnenen Erkenntnisse tragen dazu bei, die Kommunikation in der Tumorstammzellnische besser zu verstehen. Ein verbessertes Verständnis derselben könnte neue therapeutische Strategien aufzeigen, welche gezielt die bestehenden Resistenzmechanismen angreifen könnten.

6 LITERATURVERZEICHNIS

(2006). In *Asbestos: Selected Cancers* (Washington (DC)).

AgoulNIK, I.U., Hodgson, M.C., Bowden, W.A., and Ittmann, M.M. (2011). INPP4B: the new kid on the PI3K block. *Oncotarget* 2, 321-328.

Agrawal, N., Frederick, M.J., Pickering, C.R., Bettegowda, C., Chang, K., Li, R.J., Fakhry, C., Xie, T.X., Zhang, J., Wang, J., *et al.* (2011). Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* 333, 1154-1157.

Ailles, L., and Prince, M. (2009). Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Methods in molecular biology* 568, 175-193.

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 3983-3988.

Alessi, D.R., James, S.R., Downes, C.P., Holmes, A.B., Gaffney, P.R., Reese, C.B., and Cohen, P. (1997). Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Current biology* : CB 7, 261-269.

Allinen, M., BeroukhiM, R., Cai, L., Brennan, C., Lahti-Domenici, J., Huang, H., Porter, D., Hu, M., Chin, L., Richardson, A., *et al.* (2004). Molecular characterization of the tumor microenvironment in breast cancer. *Cancer cell* 6, 17-32.

Ang, K.K., Harris, J., Wheeler, R., Weber, R., Rosenthal, D.I., Nguyen-Tan, P.F., Westra, W.H., Chung, C.H., Jordan, R.C., Lu, C., *et al.* (2010). Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine* 363, 24-35.

Anzenbacher, P., and Anzenbacherova, E. (2001). Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell Mol Life Sci* 58, 737-747.

Atula, S., Grenman, R., and Syrjanen, S. (1997). Fibroblasts can modulate the phenotype of malignant epithelial cells in vitro. *Experimental cell research* 235, 180-187.

Augello, A., Tasso, R., Negrini, S.M., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R., and Pennesi, G. (2005). Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *European journal of immunology* 35, 1482-1490.

Avigdor, A., Goichberg, P., Shvitiel, S., Dar, A., Peled, A., Samira, S., Kollet, O., Hershkoviz, R., Alon, R., Hardan, I., *et al.* (2004). CD44 and hyaluronic acid

cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow. *Blood* 103, 2981-2989.

Baggiolini, M., Dewald, B., and Moser, B. (1994). Interleukin-8 and related chemotactic cytokines--CXC and CC chemokines. *Advances in immunology* 55, 97-179.

Bao, S., Wu, Q., Sathornsumetee, S., Hao, Y., Li, Z., Hjelmeland, A.B., Shi, Q., McLendon, R.E., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006). Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer research* 66, 7843-7848.

Barcellos-Hoff, M.H., and Ravani, S.A. (2000). Irradiated mammary gland stroma promotes the expression of tumorigenic potential by unirradiated epithelial cells. *Cancer research* 60, 1254-1260.

Basu, S., Ray, N.T., Atkinson, S.J., and Broxmeyer, H.E. (2007). Protein phosphatase 2A plays an important role in stromal cell-derived factor-1/CXC chemokine ligand 12-mediated migration and adhesion of CD34+ cells. *Journal of immunology* 179, 3075-3085.

Bau, D.T., Chang, C.H., Tsai, M.H., Chiu, C.F., Tsou, Y.A., Wang, R.F., Tsai, C.W., and Tsai, R.Y. (2010). Association between DNA repair gene ATM polymorphisms and oral cancer susceptibility. *The Laryngoscope* 120, 2417-2422.

Bauer, E.A., Uitto, J., Walters, R.C., and Eisen, A.Z. (1979). Enhanced collagenase production by fibroblasts derived from human basal cell carcinomas. *Cancer research* 39, 4594-4599.

Begum, N.A., Coker, A., Shibuta, K., Swanson, R.S., Chen, L.B., Mori, M., and Barnard, G.F. (1996). Loss of hIRH mRNA expression from premalignant adenomas and malignant cell lines. *Biochemical and biophysical research communications* 229, 864-868.

Benard, V.B., Johnson, C.J., Thompson, T.D., Roland, K.B., Lai, S.M., Cokkinides, V., Tangka, F., Hawkins, N.A., Lawson, H., and Weir, H.K. (2008). Examining the association between socioeconomic status and potential human papillomavirus-associated cancers. *Cancer* 113, 2910-2918.

Bhowmick, N.A., and Moses, H.L. (2005). Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev* 15, 97-101.

Bhowmick, N.A., Neilson, E.G., and Moses, H.L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432, 332-337.

Biddle, A., Liang, X., Gammon, L., Fazil, B., Harper, L.J., Emich, H., Costea, D.E., and Mackenzie, I.C. (2011). Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative. *Cancer research* 71, 5317-5326.

Bissell, M.J., and Radisky, D. (2001). Putting tumours in context. *Nature reviews Cancer* 1, 46-54.

Bjerknes, M., and Cheng, H. (1999). Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* 116, 7-14.

Bjerknes, M., Cheng, H., Hay, K., and Gallinger, S. (1997). APC mutation and the crypt cycle in murine and human intestine. *The American journal of pathology* 150, 833-839.

Bleul, C.C., Farzan, M., Choe, H., Parolin, C., Clark-Lewis, I., Sodroski, J., and Springer, T.A. (1996). The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 382, 829-833.

Bocca, E., Pignataro, O., and Sasaki, C.T. (1980). Functional neck dissection. A description of operative technique. *Archives of otolaryngology* 106, 524-527.

Bol, V., and Gregoire, V. (2014). Biological basis for increased sensitivity to radiation therapy in HPV-positive head and neck cancers. *BioMed research international* 2014, 696028.

Bonnet, D., and Dick, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* 3, 730-737.

Bosch, F.X., and de Sanjose, S. (2003). Chapter 1: Human papillomavirus and cervical cancer--burden and assessment of causality. *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, 3-13.

Boyer, S.N., Wazer, D.E., and Band, V. (1996). E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer research* 56, 4620-4624.

Bozec, A., Gros, F.X., Penault-Llorca, F., Formento, P., Cayre, A., Dental, C., Etienne-Grimaldi, M.C., Fischel, J.L., and Milano, G. (2008). Vertical VEGF targeting: A combination of ligand blockade with receptor tyrosine kinase inhibition. *European journal of cancer* 44, 1922-1930.

Brenner, J.C., Graham, M.P., Kumar, B., Saunders, L.M., Kupfer, R., Lyons, R.H., Bradford, C.R., and Carey, T.E. (2010). Genotyping of 73 UM-SCC head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Head & neck* 32, 417-426.

Brierley J, Gospodarowicz M, and Wittekind, C. (2017). *TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition, Eighth edition edn* (Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.).

Brinster, R.L., and Zimmermann, J.W. (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 11298-11302.

Broxmeyer, H.E., Kohli, L., Kim, C.H., Lee, Y., Mantel, C., Cooper, S., Hango, G., Shaheen, M., Li, X., and Clapp, D.W. (2003). Stromal cell-derived factor-1/CXCL12 directly enhances survival/antiapoptosis of myeloid progenitor cells through CXCR4 and G(alpha)i proteins and enhances engraftment of competitive, repopulating stem cells. *J Leukoc Biol* 73, 630-638.

Burger, J.A., and Kipps, T.J. (2006). CXCR4: a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107, 1761-1767.

Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13, 1-27.

Cabrera, T., Lara, E., Romero, J.M., Maleno, I., Real, L.M., Ruiz-Cabello, F., Valero, P., Camacho, F.M., and Garrido, F. (2007). HLA class I expression in metastatic melanoma correlates with tumor development during autologous vaccination. *Cancer immunology, immunotherapy : CII* 56, 709-717.

Calabrese, C., Poppleton, H., Kocak, M., Hogg, T.L., Fuller, C., Hamner, B., Oh, E.Y., Gaber, M.W., Finklestein, D., Allen, M., *et al.* (2007). A perivascular niche for brain tumor stem cells. *Cancer cell* 11, 69-82.

Camps, J.L., Chang, S.M., Hsu, T.C., Freeman, M.R., Hong, S.J., Zhau, H.E., von Eschenbach, A.C., and Chung, L.W. (1990). Fibroblast-mediated acceleration of human epithelial tumor growth in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 75-79.

Cantley, L.C. (2002). The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296, 1655-1657.

Carvalho, A.L., Nishimoto, I.N., Califano, J.A., and Kowalski, L.P. (2005). Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *International journal of cancer Journal international du cancer* 114, 806-816.

Charafe-Jauffret, E., Ginestier, C., Iovino, F., Tarpin, C., Diebel, M., Esterni, B., Houvenaeghel, G., Extra, J.M., Bertucci, F., Jacquemier, J., *et al.* (2010). Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 45-55.

Chen, Q., Daniel, V., Maher, D.W., and Hersey, P. (1994). Production of IL-10 by melanoma cells: examination of its role in immunosuppression mediated by melanoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* 56, 755-760.

Chen, Y.C., Chen, Y.W., Hsu, H.S., Tseng, L.M., Huang, P.I., Lu, K.H., Chen, D.T., Tai, L.K., Yung, M.C., Chang, S.C., *et al.* (2009). Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 385, 307-313.

Chen, Y.W., Chen, K.H., Huang, P.I., Chen, Y.C., Chiou, G.Y., Lo, W.L., Tseng, L.M., Hsu, H.S., Chang, K.W., and Chiou, S.H. (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.

Chikamatsu, K., Takahashi, G., Sakakura, K., Ferrone, S., and Masuyama, K. (2011). Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head & neck* 33, 208-215.

Chiou, S.H., Yu, C.C., Huang, C.Y., Lin, S.C., Liu, C.J., Tsai, T.H., Chou, S.H., Chien, C.S., Ku, H.H., and Lo, J.F. (2008). Positive correlations of Oct-4 and Nanog in oral cancer stem-like cells and high-grade oral squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 14, 4085-4095.

Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P.D., Wu, L., Mackay, C.R., LaRosa, G., Newman, W., *et al.* (1996). The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85, 1135-1148.

Chute, J.P. (2006). Stem cell homing. *Current opinion in hematology* 13, 399-406.

Clatot, F., Picquenot, J.M., Choussy, O., Gouérant, S., Moldovan, C., Schultheis, D., Cornic, M., Francois, A., Blot, E., and Laberge-Le-Couteulx, S. (2011). Intratumoural level of SDF-1 correlates with survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral oncology* 47, 1062-1068.

Cognetti, D.M., Weber, R.S., and Lai, S.Y. (2008). Head and neck cancer: an evolving treatment paradigm. *Cancer* 113, 1911-1932.

D'Souza, G., Agrawal, Y., Halpern, J., Bodison, S., and Gillison, M.L. (2009). Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis* 199, 1263-1269.

D'Souza, G., Kreimer, A.R., Viscidi, R., Pawlita, M., Fakhry, C., Koch, W.M., Westra, W.H., and Gillison, M.L. (2007). Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine* 356, 1944-1956.

Dar, A., Goichberg, P., Shinder, V., Kalinkovich, A., Kollet, O., Netzer, N., Margalit, R., Zsak, M., Nagler, A., Hardan, I., *et al.* (2005). Chemokine receptor CXCR4-dependent internalization and resecretion of functional chemokine SDF-1 by bone marrow endothelial and stromal cells. *Nature immunology* 6, 1038-1046.

de Jong, M.C., Pramana, J., van der Wal, J.E., Lacko, M., Peutz-Kootstra, C.J., de Jong, J.M., Takes, R.P., Kaanders, J.H., van der Laan, B.F., Wachters, J., *et al.* (2010). CD44 expression predicts local recurrence after radiotherapy in larynx cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 5329-5338.

De La Luz Sierra, M., Yang, F., Narazaki, M., Salvucci, O., Davis, D., Yarchoan, R., Zhang, H.H., Fales, H., and Tosato, G. (2004). Differential processing of stromal-

derived factor-1alpha and stromal-derived factor-1beta explains functional diversity. *Blood* 103, 2452-2459.

de Sanjose, S., Quint, W.G., Alemany, L., Geraets, D.T., Klaustermeier, J.E., Lloveras, B., Tous, S., Felix, A., Bravo, L.E., Shin, H.R., *et al.* (2010). Human papillomavirus genotype attribution in invasive cervical cancer: a retrospective cross-sectional worldwide study. *Lancet Oncol* 11, 1048-1056.

Dong, H., Strome, S.E., Salomao, D.R., Tamura, H., Hirano, F., Flies, D.B., Roche, P.C., Lu, J., Zhu, G., Tamada, K., *et al.* (2002). Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine* 8, 793-800.

Doranz, B.J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R.J., Samson, M., Peiper, S.C., Parmentier, M., Collman, R.G., and Doms, R.W. (1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85, 1149-1158.

Dudley, M.E., Wunderlich, J., Nishimura, M.I., Yu, D., Yang, J.C., Topalian, S.L., Schwartzentruber, D.J., Hwu, P., Marincola, F.M., Sherry, R., *et al.* (2001). Adoptive transfer of cloned melanoma-reactive T lymphocytes for the treatment of patients with metastatic melanoma. *Journal of immunotherapy* 24, 363-373.

Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nature immunology* 3, 991-998.

Durst, M., Gissmann, L., Ikenberg, H., and zur Hausen, H. (1983). A papillomavirus DNA from a cervical carcinoma and its prevalence in cancer biopsy samples from different geographic regions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80, 3812-3815.

Dyson, N., Howley, P.M., Munger, K., and Harlow, E. (1989). The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243, 934-937.

Emmanouilides, C., Pegram, M., Robinson, R., Hecht, R., Kabbinar, F., and Isacoff, W. (2004). Anti-VEGF antibody bevacizumab (Avastin) with 5FU/LV as third line treatment for colorectal cancer. *Tech Coloproctol* 8 *Suppl* 1, s50-52.

Engelman, J.A., Luo, J., and Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat Rev Genet* 7, 606-619.

Faber, A., Goessler, U.R., Hoermann, K., Schultz, J.D., Umbreit, C., and Stern-Straeter, J. (2013a). SDF-1-CXCR4 axis: cell trafficking in the cancer stem cell niche of head and neck squamous cell carcinoma. *Oncology reports* 29, 2325-2331.

Faber, A., Hoermann, K., Stern-Straeter, J., Schultz, D.J., and Goessler, U.R. (2013b). Functional effects of SDF-1alpha on a CD44(+) CXCR4(+) squamous cell

carcinoma cell line as a model for interactions in the cancer stem cell niche. *Oncology reports* 29, 579-584.

Faber, A., Roderburg, C., Wein, F., Saffrich, R., Seckinger, A., Horsch, K., Diehlmann, A., Wong, D., Bridger, G., Eckstein, V., *et al.* (2007). The many facets of SDF-1alpha, CXCR4 agonists and antagonists on hematopoietic progenitor cells. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2007, 26065.

Fakhry, C., Westra, W.H., Li, S., Cmelak, A., Ridge, J.A., Pinto, H., Forastiere, A., and Gillison, M.L. (2008). Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute* 100, 261-269.

Federspiel, B., Melhado, I.G., Duncan, A.M., Delaney, A., Schappert, K., Clark-Lewis, I., and Jirik, F.R. (1993). Molecular cloning of the cDNA and chromosomal localization of the gene for a putative seven-transmembrane segment (7-TMS) receptor isolated from human spleen. *Genomics* 16, 707-712.

Feng, Y., Broder, C.C., Kennedy, P.E., and Berger, E.A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-877.

Finnen, R.L., Erickson, K.D., Chen, X.S., and Garcea, R.L. (2003). Interactions between papillomavirus L1 and L2 capsid proteins. *Journal of virology* 77, 4818-4826.

Fischer, K.R., Durrans, A., Lee, S., Sheng, J., Li, F., Wong, S.T., Choi, H., El Rayes, T., Ryu, S., Troeger, J., *et al.* (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance. *Nature* 527, 472-476.

Fox, J.M., Chamberlain, G., Ashton, B.A., and Middleton, J. (2007). Recent advances into the understanding of mesenchymal stem cell trafficking. *British journal of haematology* 137, 491-502.

Franco, E.L., Duarte-Franco, E., and Ferenczy, A. (2003). Prospects for controlling cervical cancer at the turn of the century. *Salud publica de Mexico* 45 Suppl 3, S367-375.

Fruehauf, S., Srbic, K., Seggewiss, R., Topaly, J., and Ho, A.D. (2002). Functional characterization of podia formation in normal and malignant hematopoietic cells. *J Leukoc Biol* 71, 425-432.

Gajjar, A., Hernan, R., Kocak, M., Fuller, C., Lee, Y., McKinnon, P.J., Wallace, D., Lau, C., Chintagumpala, M., Ashley, D.M., *et al.* (2004). Clinical, histopathologic, and molecular markers of prognosis: toward a new disease risk stratification system for medulloblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22, 984-993.

Gal, T.J., Huang, W.Y., Chen, C., Hayes, R.B., and Schwartz, S.M. (2005). DNA repair gene polymorphisms and risk of second primary neoplasms and mortality in oral cancer patients. *The Laryngoscope* 115, 2221-2231.

Ganju, R.K., Brubaker, S.A., Meyer, J., Dutt, P., Yang, Y., Qin, S., Newman, W., and Groopman, J.E. (1998). The alpha-chemokine, stromal cell-derived factor-1alpha, binds to the transmembrane G-protein-coupled CXCR-4 receptor and activates multiple signal transduction pathways. *The Journal of biological chemistry* 273, 23169-23175.

Gastman, B.R., Atarshi, Y., Reichert, T.E., Saito, T., Balkir, L., Rabinowich, H., and Whiteside, T.L. (1999). Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes. *Cancer research* 59, 5356-5364.

Gat, U., DasGupta, R., Degenstein, L., and Fuchs, E. (1998). De Novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated beta-catenin in skin. *Cell* 95, 605-614.

Geutskens, S.B., Andrews, W.D., van Stalborch, A.M., Brussen, K., Holtrop-de Haan, S.E., Parnavelas, J.G., Hordijk, P.L., and van Hennik, P.B. (2012). Control of human hematopoietic stem/progenitor cell migration by the extracellular matrix protein Slit3. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 92, 1129-1139.

Ghosh, M.C., Makena, P.S., Gorantla, V., Sinclair, S.E., and Waters, C.M. (2012). CXCR4 regulates migration of lung alveolar epithelial cells through activation of Rac1 and matrix metalloproteinase-2. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 302, L846-856.

Gillison, M.L., Castellsague, X., Chaturvedi, A., Goodman, M.T., Snijders, P., Tommasino, M., Arbyn, M., and Franceschi, S. (2014). Eurogin Roadmap: comparative epidemiology of HPV infection and associated cancers of the head and neck and cervix. *International journal of cancer Journal international du cancer* 134, 497-507.

Gillison, M.L., D'Souza, G., Westra, W., Sugar, E., Xiao, W., Begum, S., and Viscidi, R. (2008). Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 100, 407-420.

Ginestier, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., *et al.* (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell stem cell* 1, 555-567.

Gleave, M., Hsieh, J.T., Gao, C.A., von Eschenbach, A.C., and Chung, L.W. (1991). Acceleration of human prostate cancer growth in vivo by factors produced by prostate and bone fibroblasts. *Cancer research* 51, 3753-3761.

Goichberg, P., Kalinkovich, A., Borodovsky, N., Tesio, M., Petit, I., Nagler, A., Hardan, I., and Lapidot, T. (2006). cAMP-induced PKCzeta activation increases

functional CXCR4 expression on human CD34+ hematopoietic progenitors. *Blood* 107, 870-879.

Gorelik, L., and Flavell, R.A. (2001). Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells. *Nature medicine* 7, 1118-1122.

Gravitt, P.E. (2011). The known unknowns of HPV natural history. *The Journal of clinical investigation* 121, 4593-4599.

Greenlee, R.T., Hill-Harmon, M.B., Murray, T., and Thun, M. (2001). Cancer statistics, 2001. *CA: a cancer journal for clinicians* 51, 15-36.

Gregory, C.A., Prockop, D.J., and Spees, J.L. (2005). Non-hematopoietic bone marrow stem cells: molecular control of expansion and differentiation. *Experimental cell research* 306, 330-335.

Grenman, R., Burk, D., Virolainen, E., Wagner, J.G., Lichter, A.S., and Carey, T.E. (1988). Radiosensitivity of head and neck cancer cells in vitro. A 96-well plate clonogenic cell assay for squamous cell carcinoma. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 114, 427-431.

Grosse-Gehling, P., Fargeas, C.A., Dittfeld, C., Garbe, Y., Alison, M.R., Corbeil, D., and Kunz-Schughart, L.A. (2013). CD133 as a biomarker for putative cancer stem cells in solid tumours: limitations, problems and challenges. *J Pathol* 229, 355-378.

Grulich, A.E., van Leeuwen, M.T., Falster, M.O., and Vajdic, C.M. (2007). Incidence of cancers in people with HIV/AIDS compared with immunosuppressed transplant recipients: a meta-analysis. *Lancet* 370, 59-67.

Guha, N., Boffetta, P., Wunsch Filho, V., Eluf Neto, J., Shangina, O., Zaridze, D., Curado, M.P., Koifman, S., Matos, E., Menezes, A., *et al.* (2007). Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *American journal of epidemiology* 166, 1159-1173.

Hall, B., Andreeff, M., and Marini, F. (2007). The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. *Handb Exp Pharmacol*, 263-283.

Hariri, S., Unger, E.R., Sternberg, M., Dunne, E.F., Swan, D., Patel, S., and Markowitz, L.E. (2011). Prevalence of genital human papillomavirus among females in the United States, the National Health And Nutrition Examination Survey, 2003-2006. *J Infect Dis* 204, 566-573.

Hashibe, M., Straif, K., Tashkin, D.P., Morgenstern, H., Greenland, S., and Zhang, Z.F. (2005). Epidemiologic review of marijuana use and cancer risk. *Alcohol* 35, 265-275.

Hecht, S.S. (1999). DNA adduct formation from tobacco-specific N-nitrosamines. *Mutation research* 424, 127-142.

Henneman, R., Van Monsjou, H.S., Verhagen, C.V., Van Velthuysen, M.L., Ter Haar, N.T., Osse, E.M., Lopez-Yurda, M.I., Balm, A.J., and Van Den Brekel, M.W. (2015). Incidence Changes of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma and Effects on Survival in the Netherlands Cancer Institute, 1980-2009. *Anticancer research* 35, 4015-4022.

Hermann, P.C., Huber, S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J., and Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell stem cell* 1, 313-323.

Ho, A.D., and Wagner, W. (2007). The beauty of asymmetry: asymmetric divisions and self-renewal in the haematopoietic system. *Current opinion in hematology* 14, 330-336.

Howe, J.R., Roth, S., Ringold, J.C., Summers, R.W., Jarvinen, H.J., Sistonen, P., Tomlinson, I.P., Houlston, R.S., Bevan, S., Mitros, F.A., *et al.* (1998). Mutations in the SMAD4/DPC4 gene in juvenile polyposis. *Science* 280, 1086-1088.

Humans, I.W.G.o.t.E.o.C.R.t. (1988). Alcohol drinking. *Epidemiological studies of cancer in humans. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 44, 153-250.

Humans, I.W.G.o.t.E.o.C.R.t. (1995). Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 64, 1-378.

Humans, I.W.G.o.t.E.o.C.R.t. (2004). Tobacco smoke and involuntary smoking. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 83, 1-1438.

Humans, I.W.G.o.t.E.o.C.R.t. (2007a). Human papillomaviruses. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 90, 1-636.

Humans, I.W.G.o.t.E.o.C.R.t. (2007b). Smokeless tobacco and some tobacco-specific N-nitrosamines. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 89, 1-592.

Humans, I.W.G.o.t.E.o.C.R.t. (2012). Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum* 100, 1-441.

Hung, S.C., Deng, W.P., Yang, W.K., Liu, R.S., Lee, C.C., Su, T.C., Lin, R.J., Yang, D.M., Chang, C.W., Chen, W.H., *et al.* (2005). Mesenchymal stem cell targeting of microscopic tumors and tumor stroma development monitored by noninvasive in vivo positron emission tomography imaging. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 11, 7749-7756.

Inge, T.H., Hoover, S.K., Susskind, B.M., Barrett, S.K., and Bear, H.D. (1992). Inhibition of tumor-specific cytotoxic T-lymphocyte responses by transforming growth factor beta 1. *Cancer research* 52, 1386-1392.

Jabbar, S., Strati, K., Shin, M.K., Pitot, H.C., and Lambert, P.F. (2010). Human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins act synergistically to cause head and neck cancer in mice. *Virology* 407, 60-67.

Jacoby, R.F., Schlack, S., Cole, C.E., Skarbek, M., Harris, C., and Meisner, L.F. (1997). A juvenile polyposis tumor suppressor locus at 10q22 is deleted from nonepithelial cells in the lamina propria. *Gastroenterology* 112, 1398-1403.

Jaggupilli, A., and Elkord, E. (2012). Significance of CD44 and CD24 as cancer stem cell markers: an enduring ambiguity. *Clinical & developmental immunology* 2012, 708036.

Jain, R.K. (2001). Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. *Nature medicine* 7, 987-989.

Janku, F. (2013). Bringing target-matched PI3K from the bench to the clinic. *Cell cycle* 12, 1817-1818.

Jazin, E.E., Yoo, H., Blomqvist, A.G., Yee, F., Weng, G., Walker, M.W., Salon, J., Larhammar, D., and Wahlestedt, C. (1993). A proposed bovine neuropeptide Y (NPY) receptor cDNA clone, or its human homologue, confers neither NPY binding sites nor NPY responsiveness on transfected cells. *Regulatory peptides* 47, 247-258.

Jin, F., Brockmeier, U., Otterbach, F., and Metzen, E. (2012). New insight into the SDF-1/CXCR4 axis in a breast carcinoma model: hypoxia-induced endothelial SDF-1 and tumor cell CXCR4 are required for tumor cell intravasation. *Mol Cancer Res* 10, 1021-1031.

Jones, A.S., Morar, P., Phillips, D.E., Field, J.K., Husband, D., and Helliwell, T.R. (1995). Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 75, 1343-1353.

Kantarjian, H., Stein, A., Gokbuget, N., Fielding, A.K., Schuh, A.C., Ribera, J.M., Wei, A., Dombret, H., Foa, R., Bassan, R., *et al.* (2017). Blinatumomab versus Chemotherapy for Advanced Acute Lymphoblastic Leukemia. *The New England journal of medicine* 376, 836-847.

Kato, M., Kitayama, J., Kazama, S., and Nagawa, H. (2003). Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma. *Breast cancer research : BCR* 5, R144-150.

Kawasaki, B.T., Mistree, T., Hurt, E.M., Kalathur, M., and Farrar, W.L. (2007). Co-expression of the toleragenic glycoprotein, CD200, with markers for cancer stem cells. *Biochemical and biophysical research communications* 364, 778-782.

Keysar, S.B., Le, P.N., Miller, B., Jackson, B.C., Eagles, J.R., Nieto, C., Kim, J., Tang, B., Glogowska, M.J., Morton, J.J., *et al.* (2017). Regulation of Head and Neck Squamous Cancer Stem Cells by PI3K and SOX2. *Journal of the National Cancer Institute* 109.

Khakoo, A.Y., Pati, S., Anderson, S.A., Reid, W., Elshal, M.F., Rovira, II, Nguyen, A.T., Malide, D., Combs, C.A., Hall, G., *et al.* (2006). Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *The Journal of experimental medicine* 203, 1235-1247.

Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121, 1109-1121.

Kijowski, J., Baj-Krzyworzeka, M., Majka, M., Reca, R., Marquez, L.A., Christofidou-Solomidou, M., Janowska-Wieczorek, A., and Ratajczak, M.Z. (2001). The SDF-1-CXCR4 axis stimulates VEGF secretion and activates integrins but does not affect proliferation and survival in lymphohematopoietic cells. *Stem cells* 19, 453-466.

Kim, C.H., and Broxmeyer, H.E. (1998). In vitro behavior of hematopoietic progenitor cells under the influence of chemoattractants: stromal cell-derived factor-1, steel factor, and the bone marrow environment. *Blood* 91, 100-110.

Kimple, R.J., Smith, M.A., Blitzer, G.C., Torres, A.D., Martin, J.A., Yang, R.Z., Peet, C.R., Lorenz, L.D., Nickel, K.P., Klingelhutz, A.J., *et al.* (2013). Enhanced radiation sensitivity in HPV-positive head and neck cancer. *Cancer research* 73, 4791-4800.

Kjaer, S.K., Chackerian, B., van den Brule, A.J., Svare, E.I., Paull, G., Walbomers, J.M., Schiller, J.T., Bock, J.E., Sherman, M.E., Lowy, D.R., *et al.* (2001). High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 10, 101-106.

Knudson, W., Biswas, C., and Toole, B.P. (1984). Interactions between human tumor cells and fibroblasts stimulate hyaluronate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81, 6767-6771.

Knuefermann, C., Lu, Y., Liu, B., Jin, W., Liang, K., Wu, L., Schmidt, M., Mills, G.B., Mendelsohn, J., and Fan, Z. (2003). HER2/PI-3K/Akt activation leads to a multidrug resistance in human breast adenocarcinoma cells. *Oncogene* 22, 3205-3212.

Komarova, S., Kawakami, Y., Stoff-Khalili, M.A., Curiel, D.T., and Pereboeva, L. (2006). Mesenchymal progenitor cells as cellular vehicles for delivery of oncolytic adenoviruses. *Molecular cancer therapeutics* 5, 755-766.

Krebsbach, P.H., Kuznetsov, S.A., Bianco, P., and Robey, P.G. (1999). Bone marrow stromal cells: characterization and clinical application. *Crit Rev Oral Biol Med* 10, 165-181.

Kreimer, A.R., Clifford, G.M., Boyle, P., and Franceschi, S. (2005). Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 14, 467-475.

Kremer, K.N., Clift, I.C., Miamen, A.G., Bamidele, A.O., Qian, N.X., Humphreys, T.D., and Hedin, K.E. (2011). Stromal cell-derived factor-1 signaling via the CXCR4-TCR heterodimer requires phospholipase C-beta3 and phospholipase C-gamma1 for distinct cellular responses. *Journal of immunology* 187, 1440-1447.

Kuwada, S.K., and Burt, R. (2011). A rationale for mTOR inhibitors as chemoprevention agents in Peutz-Jeghers syndrome. *Fam Cancer* 10, 469-472.

La Porta, C.A. (2012). Thoughts about cancer stem cells in solid tumors. *World journal of stem cells* 4, 17-20.

Lataillade, J.J., Clay, D., Dupuy, C., Rigal, S., Jasmin, C., Bourin, P., and Le Bousse-Kerdiles, M.C. (2000). Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood* 95, 756-768.

Lavaf, A., Genden, E.M., Cesaretti, J.A., Packer, S., and Kao, J. (2008). Adjuvant radiotherapy improves overall survival for patients with lymph node-positive head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer* 112, 535-543.

Lechner, M., Frampton, G.M., Fenton, T., Feber, A., Palmer, G., Jay, A., Pillay, N., Forster, M., Cronin, M.T., Lipson, D., *et al.* (2013). Targeted next-generation sequencing of head and neck squamous cell carcinoma identifies novel genetic alterations in HPV+ and HPV- tumors. *Genome Med* 5, 49.

Lin, M.I., and Sessa, W.C. (2004). Antiangiogenic therapy: creating a unique "window" of opportunity. *Cancer cell* 6, 529-531.

Liyanage, U.K., Moore, T.T., Joo, H.G., Tanaka, Y., Herrmann, V., Doherty, G., Drebin, J.A., Strasberg, S.M., Eberlein, T.J., Goedegebuure, P.S., *et al.* (2002). Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *Journal of immunology* 169, 2756-2761.

Loetscher, M., Geiser, T., O'Reilly, T., Zwahlen, R., Baggiolini, M., and Moser, B. (1994). Cloning of a human seven-transmembrane domain receptor, LESTR, that is highly expressed in leukocytes. *The Journal of biological chemistry* 269, 232-237.

Mack, B., and Gires, O. (2008). CD44s and CD44v6 expression in head and neck epithelia. *PLoS one* 3, e3360.

Mackie, E.J., Chiquet-Ehrismann, R., Pearson, C.A., Inaguma, Y., Taya, K., Kawarada, Y., and Sakakura, T. (1987). Tenascin is a stromal marker for epithelial malignancy in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84, 4621-4625.

Maddon, P.J., Dalgleish, A.G., McDougal, J.S., Clapham, P.R., Weiss, R.A., and Axel, R. (1986). The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47, 333-348.

Majka, M., Janowska-Wieczorek, A., Ratajczak, J., Kowalska, M.A., Vilaire, G., Pan, Z.K., Honczarenko, M., Marquez, L.A., Poncz, M., and Ratajczak, M.Z. (2000). Stromal-derived factor 1 and thrombopoietin regulate distinct aspects of human megakaryopoiesis. *Blood* 96, 4142-4151.

Mannelli, G., and Gallo, O. (2012). Cancer stem cells hypothesis and stem cells in head and neck cancers. *Cancer treatment reviews* 38, 515-539.

Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2003). Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem Sci* 28, 573-576.

Mapara, M.Y., and Sykes, M. (2004). Tolerance and cancer: mechanisms of tumor evasion and strategies for breaking tolerance. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 22, 1136-1151.

Marrogi, A.J., Munshi, A., Merogi, A.J., Ohadike, Y., El-Habashi, A., Marrogi, O.L., and Freeman, S.M. (1997). Study of tumor infiltrating lymphocytes and transforming growth factor-beta as prognostic factors in breast carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* 74, 492-501.

Martin, H., Del Valle, B., Ehrlich, H., and Cahan, W.G. (1951). Neck dissection. *Cancer* 4, 441-499.

Maximow, A. (1909). Der Lymphozyt als gemeinsame Stammzelle der verschiedenen Blutelemente in der embryonalen Entwicklung und im postfetalen Leben der Säugetiere. *Folia Haematologica* 8, 125-134.

McCulloch, E.A., Till, J.E., and Siminovitch, L. (1965). The role of independent and dependent stem cells in the control of hemopoietic and immunologic responses. *Wistar Inst Symp Monogr* 4, 61-68.

Menon, L.G., Picinich, S., Koneru, R., Gao, H., Lin, S.Y., Koneru, M., Mayer-Kuckuk, P., Glod, J., and Banerjee, D. (2007). Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells. *Stem cells* 25, 520-528.

Mohle, R., Bautz, F., Rafii, S., Moore, M.A., Brugger, W., and Kanz, L. (1998). The chemokine receptor CXCR-4 is expressed on CD34+ hematopoietic progenitors and leukemic cells and mediates transendothelial migration induced by stromal cell-derived factor-1. *Blood* 91, 4523-4530.

Mueller, M.M., and Fusenig, N.E. (2004). Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nature reviews Cancer* 4, 839-849.

Muller, A., Homey, B., Soto, H., Ge, N., Catron, D., Buchanan, M.E., McClanahan, T., Murphy, E., Yuan, W., Wagner, S.N., *et al.* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410, 50-56.

Murillo-Sauca, O., Chung, M.K., Shin, J.H., Karamboulas, C., Kwok, S., Jung, Y.H., Oakley, R., Tysome, J.R., Farnebo, L.O., Kaplan, M.J., *et al.* (2014). CD271 is a functional and targetable marker of tumor-initiating cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* 5, 6854-6866.

Nagasawa, T., Hirota, S., Tachibana, K., Takakura, N., Nishikawa, S., Kitamura, Y., Yoshida, N., Kikutani, H., and Kishimoto, T. (1996). Defects of B-cell lymphopoiesis

and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 382, 635-638.

Naito, Y., Saito, K., Shiiba, K., Ohuchi, A., Saigenji, K., Nagura, H., and Ohtani, H. (1998). CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer research* 58, 3491-3494.

Nakajima, M., Gohji, K., Fabra, A., Fidler, I.A., and Tsuruo, T. (1993). [Regulation of tumor metastasis and extracellular matrix degradative enzyme production by microenvironments]. *Gan to kagaku ryoho Cancer & chemotherapy* 20, 380-386.

Nakamizo, A., Marini, F., Amano, T., Khan, A., Studeny, M., Gumin, J., Chen, J., Hentschel, S., Vecil, G., Dembinski, J., *et al.* (2005). Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer research* 65, 3307-3318.

Nakamura, K., Ito, Y., Kawano, Y., Kurozumi, K., Kobune, M., Tsuda, H., Bizen, A., Honmou, O., Niitsu, Y., and Hamada, H. (2004). Antitumor effect of genetically engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther* 11, 1155-1164.

Nakano, O., Sato, M., Naito, Y., Suzuki, K., Orikasa, S., Aizawa, M., Suzuki, Y., Shintaku, I., Nagura, H., and Ohtani, H. (2001). Proliferative activity of intratumoral CD8(+) T-lymphocytes as a prognostic factor in human renal cell carcinoma: clinicopathologic demonstration of antitumor immunity. *Cancer research* 61, 5132-5136.

Nakashima, M., Sonoda, K., and Watanabe, T. (1999). Inhibition of cell growth and induction of apoptotic cell death by the human tumor-associated antigen RCAS1. *Nature medicine* 5, 938-942.

Nguyen, M., Song, S., Liem, A., Androphy, E., Liu, Y., and Lambert, P.F. (2002). A mutant of human papillomavirus type 16 E6 deficient in binding alpha-helix partners displays reduced oncogenic potential in vivo. *Journal of virology* 76, 13039-13048.

Ohshima, K., Muta, K., Nakashima, M., Haraoka, S., Tutiya, T., Suzumiya, J., Kawasaki, C., Watanabe, T., and Kikuchi, M. (2001). Expression of human tumor-associated antigen RCAS1 in Reed-Sternberg cells in association with Epstein-Barr virus infection: a potential mechanism of immune evasion. *International journal of cancer Journal international du cancer* 93, 91-96.

Orsini, M.J., Parent, J.L., Mundell, S.J., Marchese, A., and Benovic, J.L. (1999). Trafficking of the HIV coreceptor CXCR4. Role of arrestins and identification of residues in the c-terminal tail that mediate receptor internalization. *The Journal of biological chemistry* 274, 31076-31086.

Papadopoulos, E.B., Ladanyi, M., Emanuel, D., Mackinnon, S., Boulad, F., Carabasi, M.H., Castro-Malaspina, H., Childs, B.H., Gillio, A.P., Small, T.N., *et al.* (1994). Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *The New England journal of medicine* 330, 1185-1191.

Park, C.C., Bissell, M.J., and Barcellos-Hoff, M.H. (2000). The influence of the microenvironment on the malignant phenotype. *Mol Med Today* 6, 324-329.

Petit, I., Goichberg, P., Spiegel, A., Peled, A., Brodie, C., Seger, R., Nagler, A., Alon, R., and Lapidot, T. (2005). Atypical PKC-zeta regulates SDF-1-mediated migration and development of human CD34+ progenitor cells. *The Journal of clinical investigation* 115, 168-176.

Phillips, R.J., Burdick, M.D., Lutz, M., Belperio, J.A., Keane, M.P., and Strieter, R.M. (2003). The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med* 167, 1676-1686.

Pickard, R.K., Xiao, W., Broutian, T.R., He, X., and Gillison, M.L. (2012). The prevalence and incidence of oral human papillomavirus infection among young men and women, aged 18-30 years. *Sex Transm Dis* 39, 559-566.

Pignon, J.P., le Maitre, A., Maillard, E., Bourhis, J., and Group, M.-N.C. (2009). Meta-analysis of chemotherapy in head and neck cancer (MACH-NC): an update on 93 randomised trials and 17,346 patients. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 92, 4-14.

Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.

Polivka, J., Jr., and Janku, F. (2014). Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacol Ther* 142, 164-175.

Pries, R., Wittkopf, N., Hasselbacher, K., and Wollenberg, B. (2008). [Constitutive expression of the potential stem cell marker CD44 in permanent HNSCC cell lines]. *Hno* 56, 461-466.

Prince, M.E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G.T., Kaplan, M.J., Dalerba, P., Weissman, I.L., Clarke, M.F., and Ailles, L.E. (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 973-978.

Pullos, A.N., Castilho, R.M., and Squarize, C.H. (2015). HPV Infection of the Head and Neck Region and Its Stem Cells. *Journal of dental research* 94, 1532-1543.

Ramirez-Castillejo, C., Sanchez-Sanchez, F., Andreu-Agullo, C., Ferron, S.R., Aroca-Aguilar, J.D., Sanchez, P., Mira, H., Escribano, J., and Farinas, I. (2006). Pigment epithelium-derived factor is a niche signal for neural stem cell renewal. *Nat Neurosci* 9, 331-339.

Rasmussen, A.A., and Cullen, K.J. (1998). Paracrine/autocrine regulation of breast cancer by the insulin-like growth factors. *Breast Cancer Res Treat* 47, 219-233.

Rempel, S.A., Dudas, S., Ge, S., and Gutierrez, J.A. (2000). Identification and localization of the cytokine SDF1 and its receptor, CXC chemokine receptor 4, to regions of necrosis and angiogenesis in human glioblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 6, 102-111.

Rieckmann, T., Tribius, S., Grob, T.J., Meyer, F., Busch, C.J., Petersen, C., Dikomey, E., and Kriegs, M. (2013). HNSCC cell lines positive for HPV and p16 possess higher cellular radiosensitivity due to an impaired DSB repair capacity. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 107, 242-246.

Riley, R.R., Duensing, S., Brake, T., Munger, K., Lambert, P.F., and Arbeit, J.M. (2003). Dissection of human papillomavirus E6 and E7 function in transgenic mouse models of cervical carcinogenesis. *Cancer research* 63, 4862-4871.

Rimland, J., Xin, W., Sweetnam, P., Saijoh, K., Nestler, E.J., and Duman, R.S. (1991). Sequence and expression of a neuropeptide Y receptor cDNA. *Molecular pharmacology* 40, 869-875.

Roberts, A.B., Sporn, M.B., Assoian, R.K., Smith, J.M., Roche, N.S., Wakefield, L.M., Heine, U.I., Liotta, L.A., Falanga, V., Kehrl, J.H., *et al.* (1986). Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 4167-4171.

Rohrer, J.W., Barsoum, A.L., Dyess, D.L., Tucker, J.A., and Coggin, J.H., Jr. (1999). Human breast carcinoma patients develop clonable oncofetal antigen-specific effector and regulatory T lymphocytes. *Journal of immunology* 162, 6880-6892.

Ronnov-Jessen, L., Petersen, O.W., and Bissell, M.J. (1996). Cellular changes involved in conversion of normal to malignant breast: importance of the stromal reaction. *Physiol Rev* 76, 69-125.

Ronnov-Jessen, L., Petersen, O.W., Koteliansky, V.E., and Bissell, M.J. (1995). The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. *The Journal of clinical investigation* 95, 859-873.

Rooney, C.M., Smith, C.A., Ng, C.Y., Loftin, S., Li, C., Krance, R.A., Brenner, M.K., and Heslop, H.E. (1995). Use of gene-modified virus-specific T lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation. *Lancet* 345, 9-13.

Sappino, A.P., Schurch, W., and Gabbiani, G. (1990). Differentiation repertoire of fibroblastic cells: expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 63, 144-161.

Saucier, C., Khoury, H., Lai, K.M., Peschard, P., Dankort, D., Naujokas, M.A., Holash, J., Yancopoulos, G.D., Muller, W.J., Pawson, T., *et al.* (2004). The Shc adaptor protein is critical for VEGF induction by Met/HGF and ErbB2 receptors and

for early onset of tumor angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2345-2350.

Scheffner, M., Huibregtse, J.M., Vierstra, R.D., and Howley, P.M. (1993). The HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as a ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell* 75, 495-505.

Schlecht, N.F., Franco, E.L., Pintos, J., and Kowalski, L.P. (1999). Effect of smoking cessation and tobacco type on the risk of cancers of the upper aero-digestive tract in Brazil. *Epidemiology* 10, 412-418.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood cells* 4, 7-25.

Schrader, A.J., Lechner, O., Templin, M., Dittmar, K.E., Machtens, S., Mengel, M., Probst-Kepper, M., Franzke, A., Wollensak, T., Gatzlaff, P., *et al.* (2002). CXCR4/CXCL12 expression and signalling in kidney cancer. *British journal of cancer* 86, 1250-1256.

Schultz, J.D., Rotunno, S., Erben, P., Sommer, J.U., Anders, C., Stern-Straeter, J., Hofheinz, R.D., Hormann, K., and Sauter, A. (2011). Down-regulation of MMP-2 expression due to inhibition of receptor tyrosine kinases by imatinib and carboplatin in HNSCC. *Oncology reports* 25, 1145-1151.

Schumacher, K., Haensch, W., Roefzaad, C., and Schlag, P.M. (2001). Prognostic significance of activated CD8(+) T cell infiltrations within esophageal carcinomas. *Cancer research* 61, 3932-3936.

Schwartz, R.H. (2012). Historical overview of immunological tolerance. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a006908.

Sehgal, A., Keener, C., Boynton, A.L., Warrick, J., and Murphy, G.P. (1998). CXCR-4, a chemokine receptor, is overexpressed in and required for proliferation of glioblastoma tumor cells. *J Surg Oncol* 69, 99-104.

Shai, A., Brake, T., Somoza, C., and Lambert, P.F. (2007). The human papillomavirus E6 oncogene dysregulates the cell cycle and contributes to cervical carcinogenesis through two independent activities. *Cancer research* 67, 1626-1635.

Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN γ and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-1111.

Shen, Q., Goderie, S.K., Jin, L., Karanth, N., Sun, Y., Abramova, N., Vincent, P., Pumiglia, K., and Temple, S. (2004). Endothelial cells stimulate self-renewal and expand neurogenesis of neural stem cells. *Science* 304, 1338-1340.

Shibuta, K., Begum, N.A., Mori, M., Shimoda, K., Akiyoshi, T., and Barnard, G.F. (1997). Reduced expression of the CXC chemokine hIRH/SDF-1 α mRNA in hepatoma and digestive tract cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 73, 656-662.

Shirozu, M., Nakano, T., Inazawa, J., Tashiro, K., Tada, H., Shinohara, T., and Honjo, T. (1995). Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28, 495-500.

Sidney, S., Quesenberry, C.P., Jr., Friedman, G.D., and Tekawa, I.S. (1997). Marijuana use and cancer incidence (California, United States). *Cancer Causes Control* 8, 722-728.

Sing, A.P., Ambinder, R.F., Hong, D.J., Jensen, M., Batten, W., Petersdorf, E., and Greenberg, P.D. (1997). Isolation of Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic T lymphocytes that lyse Reed-Sternberg cells: implications for immune-mediated therapy of EBV+ Hodgkin's disease. *Blood* 89, 1978-1986.

Sipkins, D.A., Wei, X., Wu, J.W., Runnels, J.M., Cote, D., Means, T.K., Luster, A.D., Scadden, D.T., and Lin, C.P. (2005). In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature* 435, 969-973.

Spradling, A., Drummond-Barbosa, D., and Kai, T. (2001). Stem cells find their niche. *Nature* 414, 98-104.

Springer, T.A. (1995). Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration. *Annu Rev Physiol* 57, 827-872.

St Guily, J.L., Jacquard, A.C., Pretet, J.L., Haesebaert, J., Beby-Defaux, A., Clavel, C., Agius, G., Birembaut, P., Okais, C., Leocmach, Y., *et al.* (2011). Human papillomavirus genotype distribution in oropharynx and oral cavity cancer in France--The EDiTH VI study. *J Clin Virol* 51, 100-104.

Stephens, L.R., Eguinoa, A., Erdjument-Bromage, H., Lui, M., Cooke, F., Coadwell, J., Smrcka, A.S., Thelen, M., Cadwallader, K., Tempst, P., *et al.* (1997). The G beta gamma sensitivity of a PI3K is dependent upon a tightly associated adaptor, p101. *Cell* 89, 105-114.

Stern, D.F. (2008). ERBB3/HER3 and ERBB2/HER2 duet in mammary development and breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia* 13, 215-223.

Sterz, C.M., Kulle, C., Dakic, B., Makarova, G., Bottcher, M.C., Bette, M., Werner, J.A., and Mandic, R. (2010). A basal-cell-like compartment in head and neck squamous cell carcinomas represents the invasive front of the tumor and is expressing MMP-9. *Oral oncology* 46, 116-122.

Strand, S., Hofmann, W.J., Hug, H., Muller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S.M., Stremmel, W., Krammer, P.H., and Galle, P.R. (1996). Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion? *Nature medicine* 2, 1361-1366.

Strati, K., and Lambert, P.F. (2007). Role of Rb-dependent and Rb-independent functions of papillomavirus E7 oncogene in head and neck cancer. *Cancer research* 67, 11585-11593.

Studený, M., Marini, F.C., Champlin, R.E., Zompetta, C., Fidler, I.J., and Andreeff, M. (2002). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer research* 62, 3603-3608.

Sturgis, E.M. (2004). A review of social and behavioral efforts at oral cancer preventions in India. *Head & neck* 26, 937-944.

Sturgis, E.M., Castillo, E.J., Li, L., Zheng, R., Eicher, S.A., Clayman, G.L., Strom, S.S., Spitz, M.R., and Wei, Q. (1999). Polymorphisms of DNA repair gene XRCC1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis* 20, 2125-2129.

Sturgis, E.M., and Cinciripini, P.M. (2007). Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer* 110, 1429-1435.

Swanson, M.S., Kokot, N., and Sinha, U.K. (2016). The Role of HPV in Head and Neck Cancer Stem Cell Formation and Tumorigenesis. *Cancers* 8.

Tada, T., Ohzeki, S., Utsumi, K., Takiuchi, H., Muramatsu, M., Li, X.F., Shimizu, J., Fujiwara, H., and Hamaoka, T. (1991). Transforming growth factor-beta-induced inhibition of T cell function. Susceptibility difference in T cells of various phenotypes and functions and its relevance to immunosuppression in the tumor-bearing state. *Journal of immunology* 146, 1077-1082.

Tashiro, K., Tada, H., Heilker, R., Shirozu, M., Nakano, T., and Honjo, T. (1993). Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 261, 600-603.

Taylor, G., Lehrer, M.S., Jensen, P.J., Sun, T.T., and Lavker, R.M. (2000). Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis. *Cell* 102, 451-461.

Teicher, B.A., and Fricker, S.P. (2010). CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 16, 2927-2931.

Tezal, M. (2012). Interaction between Chronic Inflammation and Oral HPV Infection in the Etiology of Head and Neck Cancers. *International journal of otolaryngology* 2012, 575242.

Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews Cancer* 2, 442-454.

Thiery, J.P. (2003). Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol* 15, 740-746.

Tlsty, T.D. (2001). Stromal cells can contribute oncogenic signals. *Semin Cancer Biol* 11, 97-104.

Tozer, G.M., Kanthou, C., and Baguley, B.C. (2005). Disrupting tumour blood vessels. *Nature reviews Cancer* 5, 423-435.

Trottier, H., and Franco, E.L. (2006). The epidemiology of genital human papillomavirus infection. *Vaccine 24 Suppl 1*, S1-15.

Trumpp, A., and Wiestler, O.D. (2008). Mechanisms of Disease: cancer stem cells--targeting the evil twin. *Nature clinical practice Oncology 5*, 337-347.

Ultimo, S., Simioni, C., Martelli, A.M., Zauli, G., Evangelisti, C., Celeghini, C., McCubrey, J.A., Marisi, G., Ulivi, P., Capitani, S., *et al.* (2017). PI3K isoform inhibition associated with anti Bcr-Abl drugs shows in vitro increased anti-leukemic activity in Philadelphia chromosome-positive B-acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Oncotarget 8*, 23213-23227.

van Buul, J.D., Voermans, C., van Gelderen, J., Anthony, E.C., van der Schoot, C.E., and Hordijk, P.L. (2003). Leukocyte-endothelium interaction promotes SDF-1-dependent polarization of CXCR4. *The Journal of biological chemistry 278*, 30302-30310.

van den Hooff, A. (1988). Stromal involvement in malignant growth. *Adv Cancer Res 50*, 159-196.

van Houdt, I.S., Sluijter, B.J., Moesbergen, L.M., Vos, W.M., de Gruijl, T.D., Molenkamp, B.G., van den Eertwegh, A.J., Hooijberg, E., van Leeuwen, P.A., Meijer, C.J., *et al.* (2008). Favorable outcome in clinically stage II melanoma patients is associated with the presence of activated tumor infiltrating T-lymphocytes and preserved MHC class I antigen expression. *International journal of cancer Journal international du cancer 123*, 609-615.

Vandenbrouck, C., Sancho-Garnier, H., Chassagne, D., Saravane, D., Cachin, Y., and Micheau, C. (1980). Elective versus therapeutic radical neck dissection in epidermoid carcinoma of the oral cavity: results of a randomized clinical trial. *Cancer 46*, 386-390.

Walboomers, J.M., Jacobs, M.V., Manos, M.M., Bosch, F.X., Kummer, J.A., Shah, K.V., Snijders, P.J., Peto, J., Meijer, C.J., and Munoz, N. (1999). Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol 189*, 12-19.

Walker, P.R., Saas, P., and Dietrich, P.Y. (1998). Tumor expression of Fas ligand (CD95L) and the consequences. *Curr Opin Immunol 10*, 564-572.

Wang, J., Shiozawa, Y., Wang, J., Wang, Y., Jung, Y., Pienta, K.J., Mehra, R., Loberg, R., and Taichman, R.S. (2008). The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *The Journal of biological chemistry 283*, 4283-4294.

Wang, Y., Springer, S., Mulvey, C.L., Silliman, N., Schaefer, J., Sausen, M., James, N., Rettig, E.M., Guo, T., Pickering, C.R., *et al.* (2015). Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas. *Science translational medicine 7*, 293ra104.

Weiner, D.B., Huebner, K., Williams, W.V., and Greene, M.I. (1991). Human genes other than CD4 facilitate HIV-1 infection of murine cells. *Pathobiology* 59, 361-371.

Werness, B.A., Levine, A.J., and Howley, P.M. (1990). Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. *Science* 248, 76-79.

Wicha, M.S., Liu, S., and Dontu, G. (2006). Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer research* 66, 1883-1890; discussion 1895-1886.

Willis, R.A. (1967). The unusual in tumour pathology. *Can Med Assoc J* 97, 1466-1479.

Wollenberg, B. (2011). [Implication of stem cells in the biology and therapy of head and neck cancer]. *Laryngo- rhino- otologie* 90 *Suppl* 1, S110-119.

Woo, E.Y., Chu, C.S., Goletz, T.J., Schlienger, K., Yeh, H., Coukos, G., Rubin, S.C., Kaiser, L.R., and June, C.H. (2001). Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer research* 61, 4766-4772.

Woo, E.Y., Yeh, H., Chu, C.S., Schlienger, K., Carroll, R.G., Riley, J.L., Kaiser, L.R., and June, C.H. (2002). Cutting edge: Regulatory T cells from lung cancer patients directly inhibit autologous T cell proliferation. *Journal of immunology* 168, 4272-4276.

Wright, N.A. (2000). Epithelial stem cell repertoire in the gut: clues to the origin of cell lineages, proliferative units and cancer. *Int J Exp Pathol* 81, 117-143.

Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., and Weinberg, R.A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927-939.

Yang, Z.J., and Wechsler-Reya, R.J. (2007). Hit 'em where they live: targeting the cancer stem cell niche. *Cancer cell* 11, 3-5.

Zagzag, D., Krishnamachary, B., Yee, H., Okuyama, H., Chiriboga, L., Ali, M.A., Melamed, J., and Semenza, G.L. (2005). Stromal cell-derived factor-1alpha and CXCR4 expression in hemangioblastoma and clear cell-renal cell carcinoma: von Hippel-Lindau loss-of-function induces expression of a ligand and its receptor. *Cancer research* 65, 6178-6188.

Zhang, L., Conejo-Garcia, J.R., Katsaros, D., Gimotty, P.A., Massobrio, M., Regnani, G., Makrigiannakis, A., Gray, H., Schlienger, K., Liebman, M.N., *et al.* (2003). Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *The New England journal of medicine* 348, 203-213.

Zhang, Q., Shi, S., Yen, Y., Brown, J., Ta, J.Q., and Le, A.D. (2010). A subpopulation of CD133(+) cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer letters* 289, 151-160.

Zhang, Y., and Kalderon, D. (2001). Hedgehog acts as a somatic stem cell factor in the *Drosophila* ovary. *Nature* 410, 599-604.

Zhang, Z., Filho, M.S., and Nor, J.E. (2012). The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral oncology* 48, 1-9.

Zhao, L., and Vogt, P.K. (2008). Class I PI3K in oncogenic cellular transformation. *Oncogene* 27, 5486-5496.

Zhao, M., Sano, D., Pickering, C.R., Jasser, S.A., Henderson, Y.C., Clayman, G.L., Sturgis, E.M., Ow, T.J., Lotan, R., Carey, T.E., *et al.* (2011). Assembly and initial characterization of a panel of 85 genomically validated cell lines from diverse head and neck tumor sites. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 7248-7264.

Zheng, X., Carstens, J.L., Kim, J., Scheible, M., Kaye, J., Sugimoto, H., Wu, C.C., LeBleu, V.S., and Kalluri, R. (2015). Epithelial-to-mesenchymal transition is dispensable for metastasis but induces chemoresistance in pancreatic cancer. *Nature* 527, 525-530.

Teile dieser Arbeit wurden publiziert und auf einem Fachkongress als Postervortrag präsentiert:

Originalpublikation:

Jungbauer F, Aderhold C, Birk R, Hoermann K, Kramer B, Kuhlin B, Thorn C, Umbreit C, Lammert A (2017)

“Communicate or Die – A model for HPV+ and HPV– CSCs and their interactions with SDF-1 α “

Anticancer Res. 2017 Sep;37(9):4827-4836

Postervortrag:

Jungbauer F, Rotter N, Aderhold C, Kramer B, Kuhlin B, Hoermann K, Thorn C, Lammert A (2018)

„Die SDF1 α -CXCR4 -Achse in HPV-positiven und HPV-negativen Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals-Region“

89. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e.V., Bonn; in Lübeck (12.05.18)

7 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Jungbauer, Frederic
Geburtsdatum: 01.06.1992
Geburtsort: Malsch
Familienstand: ledig
Vater: Uwe Jungbauer
Mutter: Susanne Jungbauer, geb. Häfner
Schwester: Katinka Jungbauer

SCHULISCHER WERDEGANG

2003 - 2011 Gymnasium: Heimschule Lender, Sasbach
01.06.2011 Allgemeine Hochschulreife

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS 2011/12 Beginn des Studiums der Humanmedizin
 an der Universität Heidelberg,
 Medizinische Fakultät Mannheim
10.09.2013 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
13.10.2016 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06.12.2017 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

8 DANKSAGUNG

An dieser Stelle gilt mein Dank all den Menschen, die diese Arbeit möglich gemacht haben.

Meiner Doktormutter, Betreuerin und Mentorin, **Priv.-Doz. Dr. med. Anne Lammert**, für die Begeisterung und die Überlassung des Themas, die unermüdliche Unterstützung, Motivation und die ständige Erreichbarkeit. Vor allem für die andauernde Forderung und Förderung und dafür, dass ich durch sie das selbstständige wissenschaftliche Arbeiten lernen konnte.

Den Direktoren der Univ.-Hals-Nasen-Ohren-Klinik Mannheim, **Prof. Dr. med. K. Hörmann** und **Prof. Dr. med. N. Rotter**, für die Möglichkeit an Ihrer Klinik zu forschen, die finanzielle Unterstützung und für die Überlassung des Labors.

Große Dankbarkeit empfinde ich gegenüber **Petra Prohaska**, von der ich so vieles in der Laborarbeit gelernt habe, für ihre riesige Unterstützung bei den Experimenten und mit den Gerätschaften und Instrumenten.

Meinen Co-Autoren für ihre Anregungen, Ideen und für die Unterstützung bei den Publikationen. Allen Ober-, Fach- und Assistenzärzten, die mich für die Hals-Nasen-Ohrenheilkunde begeistert haben und die meine onkologischen Forschungsinteressen unterstützt haben.

Ohne meine Familie wäre ich nicht da, wo ich heute bin. Danke an meine Schwester, **Katinka Jungbauer**, meine Mutter, **Susanne Jungbauer**, und meinen Vater, **Uwe Jungbauer**.

Vielen Dank an **Margot Thiaucourt**, für die andauernde, liebevolle Unterstützung. Für ihre fachliche Meinung, aber vor allem für ihren motivierenden Ansporn.