

Aus dem Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin der
Universität Würzburg
Leitung: Professor Dr. Heike Walles

**Entwicklung und Charakterisierung eines humanen oralen
Plattenepithelkarzinomäquivalentes**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Anna Teresa Mineif
aus Buxheim

Würzburg, Juni 2018

Referentin: Univ.-Prof. Dr. hum. biol. Heike Walles

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Stephan Hackenberg,
i.V. Priv.-Doz. Dr. Agmal Scherzad

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 11. Juli 2019

Die Promovendin ist Zahnärztin.

1	Einleitung	1
1.1	Mundschleimhaut	1
1.1.1	Aufbau der Mundschleimhaut.....	1
1.1.1.1	Epithel	3
1.1.1.2	Basalmembran	6
1.1.1.3	Lamina propria	7
1.1.1.4	Submukosa	8
1.1.2	Funktion der Mundschleimhaut	8
1.2	Das orale Plattenepithelkarzinom.....	9
1.2.1	Ätiologie des Plattenepithelkarzinoms.....	10
1.2.2	Klinische Symptome des Plattenepithelkarzinoms	11
1.2.3	Histopathologie des Plattenepithelkarzinoms.....	12
1.2.4	Diagnostik des Plattenepithelkarzinoms.....	15
1.2.5	Therapie des Plattenepithelkarzinoms	15
1.3	Tissue Engineering – Prinzip und Anwendungsgebiete	17
1.4	Tissue Engineering der Mundschleimhaut	18
1.4.1	Zellen für Mundschleimhautäquivalente	19
1.4.2	Zellträger für Mundschleimhautäquivalente.....	20
1.4.3	<i>In vitro</i> Testsysteme	23
1.4.3.1	In vitro Mundschleimhautmodelle zur Testung von Materialien und Medikamenten.....	23
1.4.3.2	In vitro Mundschleimhautmodelle zur Erforschung von Krankheiten	24
1.4.4	Humanes orales Plattenepithelkarzinomäquivalent.....	25
1.4.4.1	Verwendete Zellen für in vitro Tumormodelle der Mundschleimhaut	26
1.4.4.2	Verwendete Zellträger für in vitro Tumormodelle der Mundschleimhaut	29
1.4.4.3	Tumormodelle in vitro.....	29
1.5	Ziel der Arbeit.....	34

2	Material	36
2.1	Gewebe und Zellen	36
2.1.1	Humanes Gewebe: Mundschleimhautbiopsien	36
2.1.2	Verwendete Zellarten für den Aufbau von Tumormodellen	36
2.1.2.1	Primäre Zellen	36
2.1.2.2	RFP-transduzierte Zellen der Zelllinie FaDu	37
2.1.3	Porcines Gewebe: Small Intestinal Submucosa (SIS/MUC).....	37
2.2	Geräte	37
2.3	Labormaterialien.....	41
2.4	Verbrauchsmaterialien	42
2.5	Chemikalien und Lösungen.....	44
2.6	Medien, Lösungen und Zusätze für die Zellkultur.....	47
2.7	Lösungen für die Histologie.....	50
2.8	Lösungen für die Immunhistologie.....	51
2.8.1	Antikörper.....	51
2.8.2	Immunhistochemie-Kit.....	52
2.8.3	Puffer und Lösungen	52
2.9	Software	54
3	Methoden.....	55
3.1	Zellkultur.....	55
3.1.1	Ablösen von Zellen.....	55
3.1.1.1	Keratinozyten	56
3.1.1.2	Fibroblasten und FaDu-Zelllinie.....	56
3.1.2	Zellzählung mit Trypanblau	57
3.1.2.1	Population Doublings (PD) und Population Doubling Time (PDT)....	57
3.1.3	Medienwechsel.....	58
3.1.4	Einfrieren von Zellen	58
3.1.4.1	Keratinozyten	58
3.1.4.2	Fibroblasten und FaDu-Zellen	59
3.1.5	Auftauen von Zellen	59
3.2	Methode zur Isolierung primärer Zellen aus MSH-Biopsaten	60

3.2.1	Vorbereitung von MSH-Biopsaten zur Isolierung.....	60
3.2.2	Isolation primärer Keratinozyten.....	60
3.2.3	Isolation primärer Fibroblasten.....	61
3.3	Transduktion von Lentiviren auf FaDu-Zellen.....	62
3.3.1	Phase der RFP-Transduktion auf FaDu-Zellen	62
3.3.2	Phase der Selektion transduzierter von nicht-transduzierten Zellen	63
3.3.3	Überprüfung des S2-Status.....	65
3.4	Aufbau der Tumormodelle auf der Basis von OMÄ auf SIS/MUC Scaffolds	65
3.4.1	Wachstumsphase 1: Fibroblastenapplikation	66
3.4.2	Kontrollmodelle.....	67
3.4.3	Tumormodell mit Spots	68
3.4.4	Tumormodell mit multizellulären Tumorzellsphäroiden	68
3.4.5	Tumormodell: Keratinozyten und FaDu-Zellen vermischt.....	69
3.5	Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER) ...	69
3.6	Histologie	71
3.6.1	Paraffineinbettung und Herstellung von Paraffinblöcken.....	71
3.6.2	Herstellung der Paraffinschnitte	72
3.6.3	Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	73
3.6.4	Immunhistologische Färbung mit HRP-basiertem Nachweissystem	75
3.7	Mikroskopie	77
3.7.1	Lichtmikroskopie.....	77
3.7.2	Fluoreszenzmikroskopie.....	77
4	Ergebnisse	78
4.1	Population Doublings (PD)	80
4.2	Transduktion des Lentivirus RFP auf Tumorzelllinie FaDu.....	81
4.3	Kontrollmodell – OMÄ ohne Integration von Tumorzellen	85
4.3.1	Histologische Charakterisierung.....	85
4.3.2	Immunhistologische Charakterisierung	87

4.3.3	TEER-Wert Messung	89
4.4	Tumormodell - basierend auf OMÄ	91
4.4.1	Tumormodelle durch Applikation der Tumorzellen mittels Spots.....	91
4.4.1.1	Histologische Charakterisierung.....	91
4.4.1.2	Immunhistologische Charakterisierung	92
4.4.1.3	TEER-Wert Messung	93
4.4.2	Tumormodelle durch Applikation von Tumorzellsphäroiden.....	94
4.4.2.1	Histologische Charakterisierung.....	95
4.4.2.2	Immunhistologische Charakterisierung	96
4.4.2.3	TEER-Wert Messung	96
4.4.3	Tumormodelle durch Applikation eines Gemisches aus RFP- transduzierten FaDu-Zellen und primären Keratinozyten in unterschiedlichen Konzentrationen	97
4.4.3.1	Histologische Charakterisierung.....	98
4.4.3.2	Immunhistologische Charakterisierung	102
4.4.3.3	TEER-Wert Messung	107
5	Diskussion.....	110
5.1	Humanes orales Mukosaäquivalent basierend auf SIS/MUC als Grundlage zur Generierung eines Tumormodells.....	110
5.2	Eignung der RFP-Transduktion auf FaDu-Zellen zur Erleichterung der Identifikation von Tumorzellen innerhalb der Tumormodelle	112
5.3	Eignung unterschiedlicher Applikationsformen zur Generierung von Tumormodellen.....	115
5.3.1	Eignung der Applikation von Spots.....	115
5.3.2	Eignung der Applikation von Sphäroiden	117
5.3.3	Eignung der Applikation von Zellgemischen aus Tumorzellen und Keratinozyten unterschiedlicher Mischungsverhältnisse	118
5.4	Rückschluss der PDs und der PDT auf die Qualität der Modelle ...	122
5.5	Rückschluss des TEER-Wertes auf das Tumorwachstum	123

6	Fazit und Ausblick	126
	Literaturverzeichnis	131
	Abkürzungsverzeichnis	139
	Abbildungsverzeichnis	142
	Tabellenverzeichnis	145

1 Einleitung

1.1 Mundschleimhaut

Die Mundhöhle (Cavum oris) wird durch orale Strukturen in unterschiedliche Regionen eingeteilt. So bilden die Alveolarfortsätze und Zahnreihen des Ober- und Unterkiefers zwei Räume. Der größere Bereich der Mundhöhle wird von den lingualen und palatinalen Zahnflächen, dem harten und weichen Gaumen, dem Mundboden, der Zunge und den Gaumenbögen nach posterior eingegrenzt [1]. Der kleinere Bereich, das Vestibulum oris, wird nach anterior durch die Lippenschleimhaut, lateral durch die Wangenschleimhaut des Planum buccale und posterior durch die Alveolarschleimhaut, sowie durch die labialen und bukkalen Zahnoberflächen begrenzt [2]. Alle Bereiche der Mundhöhle werden von der Mundschleimhaut (Tunica mucosa oris) bedeckt [3].

1.1.1 Aufbau der Mundschleimhaut

Die Mundschleimhaut (s. Abbildung 1, oberste Schicht) weist einen ähnlichen Schichtaufbau wie die Haut auf [2] und kann unterschiedlich stark verhornt, von komplett verhornt (keratinisiert) bis nahezu gänzlich unverhornt (parakeratinisiert) sein [4]. Die gesunde Schleimhaut besteht aus mehreren Schichten, dem mehrschichtigen Plattenepithel, der darunterliegenden bindegewebigen Lamina propria, der Basalmembran, welche das Epithel von der Lamina propria trennt und der Submukosa, in der sich Speicheldrüsen, größere Blutgefäße und Fettzellen befinden [4, 5]. Die Lamina propria ist durch Bindegewebspapillen und Epithelzapfen mit dem Epithel verzahnt [5]. Die nervale Innervation endet in der Lamina propria, allerdings können freie Nervenendigungen bis in das Epithel reichen [5].

Einleitung

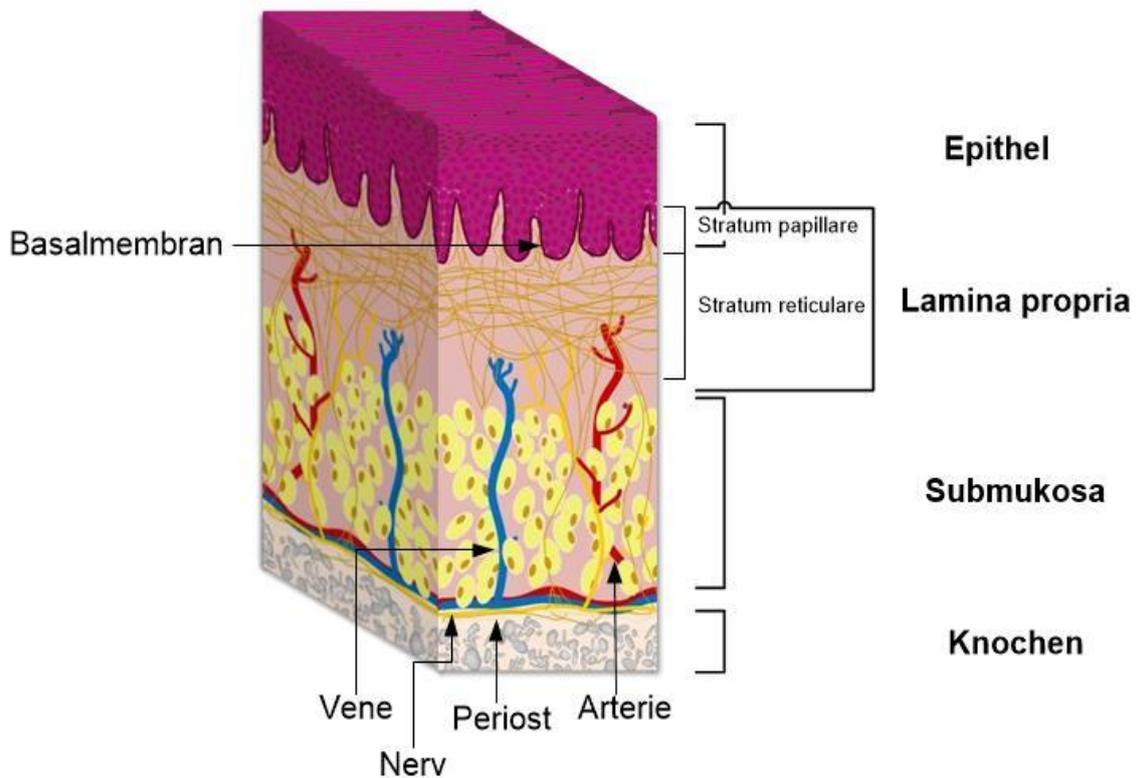


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Mundschleimhaut

Gezeigt wird eine schematische Darstellung des Aufbaus der Mundschleimhaut. Die Basalmembran trennt das Epithel von der Lamina propria, welche sich aus den Schichten Stratum papillare und Stratum reticulare zusammensetzt. Angrenzend basalwärts schließt sich die bindegewebige Schicht der Submukosa an, welche wiederum dem von Periost bedeckten Knochen aufliegt. Die Abbildung wurde persönlich erstellt.

Durch funktionelle Anpassung der unterschiedlich beanspruchten Regionen der Mundschleimhaut lassen sich drei Arten von Mundschleimhaut beschreiben: Die auskleidende Schleimhaut bedeckt Lippe, Mundvorhof, Wangen, weichen Gaumen, ventrale Seite der Zunge, Mundboden und Alveolarfortsätze [6]. Sie wird während des Kauvorgangs kaum beansprucht, auf Grund dessen sie ein nahezu unverhorntes Epithel über einer dünnen elastischen Lamina propria mit relativ lockerem Bindegewebe aus elastischen Fasern aufweist [4, 6]. Die Dicke des Epithels schwankt zwischen 0,1 mm im Mundbodenbereich und 0,5 mm im Bereich der Wange [6]. Die auskleidende Schleimhaut ist lose mit der darunter befindlichen Muskelunterlage verbunden, weshalb auch von einer verschieblichen Lamina propria gesprochen wird, die einen weniger dichten Papillarkörper bildet [1].

Einleitung

Die mastikatorische Schleimhaut, welche sich im Gebiet der befestigten Gingiva und des harten Gaumens befindet, ist während des Kauvorgangs hohen mechanischen Ansprüchen ausgesetzt [1]. Sie besitzt eine derbe, stabile Lamina propria, die direkt mit dem Periost des darunterliegenden Knochens oder den Muskelfasern verbunden und somit unverschieblich (mukostabil) ist [1, 4]. Sie bildet einen sehr dichten Papillarkörper und wird von einem orthokeratinisierten 0,25 mm dicken Epithel am Gaumen und einem vierschichtigen parakeratinisierten Epithel im Bereich der Gingiva bedeckt [1, 6]. Das parakeratinisierte Epithel ist ein geschichtetes Epithel, welches in vier ineinander übergehende Schichten, dem Stratum basale, Stratum spinosum (Stachelzellschicht), Stratum granulosum (Körnerschicht) und dem Stratum corneum (verhornte Schicht) unterteilt ist [7].

Die spezialisierte Schleimhaut ist auf dem Zungenrücken lokalisiert. Sie ermöglicht die Wahrnehmung von Tast- (Papillae filiformes), Temperatur-, und Geschmacksempfindungen (Papillae fungiformes, foliatae, vallatae) durch eine große Zahl vom Epithel überzogener Papillen [5]. Dabei ist sie im vorderen Zungenrücken orthokeratinisiert, hingegen ist sie in den hinteren Bereichen nicht keratinisiert und formt dort Krypten, welche von lymphoepithelialelem Gewebe umgeben sind [6].

1.1.1.1 Epithel

Das Mundschleimhautepithel (s. Abbildung 1, oberste Schicht) lässt sich grundsätzlich in vier Schichten mit unterschiedlicher Morphologie einteilen [4], manche Schichten jedoch können in einigen Teilen der Mundhöhle fehlen [5]. Die ersten drei Schichten werden von vitalen Keratinozyten gebildet, wohingegen sich in der obersten, vierten Schicht tote Hornzellen befinden, die für den Aufbau der Diffusionsbarriere verantwortlich sind [7]. Darüber hinaus befinden sich im Epithel pigment-bildende Melanozyten, sowie Merkel-Zellen (Mechanorezeptoren für Druck- und Tastempfinden) im Stratum basale und Langerhans-Zellen (dendritische Zellen des Immunsystems) im Stratum spinosum [5].

Einleitung

Es wird zwischen verhorntem und unverhorntem Epithel unterschieden. Das unverhornte Epithel, beziehungsweise teilweise verhornte (parakeratinisierte) Epithel kleidet alle Anteile der Mundhöhle bis auf die Gingiva und den harten Gaumen aus und besitzt oft nur drei Schichten des Epithels, das Stratum basale, Stratum granulosum, auch bezeichnet als Stratum filamentosum und das Stratum superficiale [1, 5]. Wegen der ausbleibenden Verhornung werden die obersten beiden Schichten zum Stratum distendum zusammengefasst, die Hornschicht fehlt also [5]. Die starke Beweglichkeit und Dehnfähigkeit des unverhornten Epithels wird durch den strukturellen Aufbau des Stratum distendum gewährleistet (s.u.: Stratum corneum) [5].

Das verhornte Epithel befindet sich auf der Gingiva und am harten Gaumen und ist ein typisches, vierschichtiges Epithel [5].

Allen Epithelarten ist der Aufbau in drei bis vier unterschiedliche Schichten gemein, welche nun beginnend von innen (Stratum basale) nach außen (Stratum corneum) der Reihe nach aufgeführt werden:

Das Stratum basale (Basalzellschicht), auch Stratum germinativum genannt, liegt der Basalmembran direkt auf und besteht aus prismatischen Zellen, zusammengesetzt aus epidermalen Stammzellen und Progenitorzellen (Vorläuferzellen) mit hoher Teilungsrate [7]. Es werden fortlaufend neue Zellen gebildet, die an die Epitheloberfläche wandern und dabei einen Differenzierungsprozess durchlaufen, in dem sie sichtbar ihre Struktur (von kubisch bis hochprismatisch) und ihre Eigenschaften verändern [1, 5]. Da im Epithel keine Blutgefäße vorhanden sind, wird die Versorgung durch sog. Gap junctions gewährleistet - Zell-Zell-Kontakte – über die die Zellen miteinander kommunizieren und Nährstoffe austauschen können [5]. Die Keratinozyten sind durch zahlreiche Desmosomen untereinander und zusätzlich durch Hemidesmosomen mit der Basalmembran verknüpft [7].

Im Stratum spinosum (Stachelzellschicht), das mehrere Schichten von polygonalen Zellen aufweist, befinden sich differenzierende Zellen [1]. Tonofibrillen und Desmosomen sorgen für ausreichend Stabilität der Zellen untereinander [8]. Im histologischen Schnitt werden durch Wasserentzug die

Einleitung

Desmosomenverbindungen zwischen den Zellen sichtbar, was den Zellen einen stacheligen Charakter und der Schicht ihren Namen verleiht [5].

Das Stratum granulosum (Körnerzellschicht) enthält weniger Zellen, diese werden jedoch größer und flacher und im Zytoplasma sind lichtmikroskopisch Keratohyalingranula nachweisbar [1, 5]. Keratohyalingranula bestehen aus fusionierten Zytokeratinfilamenten und Begleitproteinen wie z.B. Profilaggrin und Loricrin, die mit dem Verhornungsprozess vernetzt sind [7]. In den äußeren Bereichen des Stratum granulosums wandern die Granula in die Peripherie und nähern sich der Innenseite der Zellmembran an, woraufhin unpolare Lipide in den Interzellularraum abgegeben werden und dadurch eine Permeabilitätsbarriere für Wasser und wasserlösliche Substanzen gebildet wird [5]. Somit tragen die Granula einen Anteil zur Diffusionsbarriere bei.

Das Stratum corneum (Hornschicht) stellt die äußerste Zellschicht des Epithels dar. Die Dicke und auch der Grad des Verhornungsprozesses variieren stark und die Zellen besitzen nun weder Kern noch Organellen [1, 7]. Die 0,5 µm dicken Hornschuppen sind aus Keratinfilamenten zusammengesetzt und werden durch eine Matrix zusammengehalten. Sie besitzen einen Durchmesser zwischen 30 µm (Alveolarschleimhaut) und 80 µm (Gingiva) [5, 7]. Das Stratum corneum stellt die Permeabilitätsbarriere gegen Toxine, Antigene und Mikroorganismen dar [1]. Der Übergang von Epithelzellen in Hornschuppen geschieht enzymatisch vermittelt, spontan und unvorhersehbar. Daher wird bei diesem Vorgang auch von einem „Verhornungssprung“ gesprochen, bei dem der Kern und viele zytoplasmatische Organellen aufgelöst werden [1, 5]. Dieser Sprung kann unterschiedliche Verhornungsgrade des Epithels hervorbringen. Zum einen den Grad der Orthokeratinisation, aus dem eine homogene Struktur aus sehr flachen und dicht aufeinanderliegenden Hornschuppen, deren Zellen keine Zellkerne enthalten, resultiert [1]. Zum anderen der Grad der Parakeratinisation, bei der die gleichen Entwicklungsvorgänge ablaufen, wie bei der Orthokeratinisation, allerdings enthalten die Zellen pyknotische Zellkerne und Reste von Zellorganellen und der Keratohyalingranula [5]. Beim unvollständig parakeratinisierten Epithel, auch nichtkeratinisiertes Epithel genannt, ist das Stratum corneum stark inhomogen und weist zwei Zelltypen auf, die

Einleitung

Hornschuppe, die der des parakeratinisierten Stratum corneum entspricht, und eine kernhaltige Zelle, die scheinbar ohne Verhornungssprung aus dem Stratum granulosum in das Stratum corneum gewandert ist und selbst die Granula noch enthält, allerdings sind die Zellorganellen leicht verkleinert [1, 5]. Da bei Zellen des zweiten Typs die Form zwar abgeflacht ist, aber keine Dehydratation stattgefunden hat, verleihen diese Zellen der Epithelschicht Flexibilität und Dehnbarkeit [5]. Die Hornzellen werden nach der Proteolyse der Desmosomen zwischen den Zellen des Stratum corneums einzeln abgeschilfert, dieser Vorgang wird als Desquamation bezeichnet [7].

1.1.1.2 Basalmembran

Die Basalmembran ist eine etwa 0,5 µm – 1 µm dicke, lichtmikroskopisch erkennbare, dünne, helle, strukturlose Linie, die von den Keratinozyten gebildet wird und sehr komplex aufgebaut ist [7]. Primär ist es ihre Aufgabe, eine rein mechanische Verbindung zwischen Epithel und der Lamina propria aufzubauen und dient somit der direkten Verankerung der Zellen, die auf ihr angesiedelt sind [5, 7]. Ultrastrukturell setzt sich die Basalmembran aus zwei Schichten zusammen - der Basallamina und der Lamina fibroreticularis [7]. Die Basallamina ist 50 µm – 100 µm dick, enthält hauptsächlich Kollagen Typ IV, Laminin und Heparansulfat-Proteoglykane und ist wiederum in zwei Schichten unterteilt: In die Lamina lucida, ein Präparationsartefakt, das durch Schrumpfung und Entwässerung entsteht und in die Lamina densa, deren Hauptbestandteil Kollagen Typ IV und Laminin ist und direkt mit den Zellmembranen verbunden ist [5, 7]. Die Verknüpfung der Zellen des Stratum basale mit der Basallamina findet über Hemidesmosomen mit zahlreichen Tonofilamentbündeln statt, die über Intermediärfilament-assoziierte Proteine an den Hemidesmosomen verbunden sind [1, 5]. Durch die Lamina fibroreticularis und deren darin enthaltenen retikulären Fasern wird die Basallamina im umgebenden Stroma verankert [7]. Durch eine leisten- und zapfenartige Verzahnung wird eine stark vergrößerte Verbindungsfläche zwischen Epithel und der darunter liegenden Lamina propria erzielt [5]. Das Ausmaß der Verzahnung richtet sich nach dem funktionellen

Einleitung

Anspruch der jeweiligen Region in der Mundhöhle, so ist sie im Bereich kaufunktionell beanspruchter Gebiete, wie der Gingiva und dem harten Gaumen, stärker ausgeprägt, wobei in anderen Regionen die Verzahnung ganz fehlen kann [5].

1.1.1.3 *Lamina propria*

Die Lamina propria ist das kollagenfaser- und zellreiche, subepitheliale Bindegewebe der Mundschleimhaut und kann in zwei Schichten eingeteilt werden [5]. Direkt an das Epithel anliegend befindet sich der Papillarkörper, das Stratum papillare, der die Lamina propria mit den Zapfen des Epithels verzahnt, in dem sich locker angeordnete Kollagenfasern befinden und in das kleine kapillare Blutgefäße einstrahlen [5]. Am Ende dieser Papillen strahlen Meissner-Tastkörperchen und Krause-Körperchen (beides Mechanorezeptoren) ein und auch freie Nervenendigungen, die bis in das Epithel einstrahlen können (s. Abbildung 1), kommen vor [1]. Unter dieser Schicht befindet sich das Stratum reticulare, ein dichtes Netzwerk dicker, parallel angeordneter Bündel von Kollagenfasern (Kollagen Typ I, III, V und VI), in der sich zahlreiche Fibroblasten, Mastzellen, und Leukozyten (v.a. T-Lymphozyten, T-Suppressor-Zellen, T-Helferzellen und Makrophagen) befinden [1, 5].

Die Hauptzellen der Lamina propria sind die Fibrozyten, wobei aktive Zellen als Fibroblasten bezeichnet werden [9]. Sie besitzen einen gestreckten Zelleib und lange Ausläufer, die sich histologisch allerdings kaum darstellen lassen. Ihre Aufgabe ist es, den Stoffwechsel der Matrix-Bestandteile zu regulieren, wie zum Beispiel Neusynthese und Abbau des Bindegewebes [7]. Ein weiterer Hauptbestandteil der Lamina propria ist die Extrazellulärmatrix (EZM), die in allen Gewebsarten vorkommt und sich in zwei funktionell eng miteinander kooperierende Komponenten einteilen lässt, die amorphe Grundsubstanz aus Glycosaminoglykanen (GAG) und Proteoglykanen (PG), wie Aggrecan, Dekorin, Perlecan, Vesican und Bindegewebsfasern wie Kollagenfibrillen aus hauptsächlich Kollagen Typ I, II und III und elastischen Fasern [9]. Sie füllt die extrazellulären Räume zwischen den Zellen aus und enthält alle Makromoleküle,

Einleitung

die von den Zellen sezerniert werden und dort über komplexe Vorgänge miteinander reagieren [7].

1.1.1.4 Submukosa

Die Submukosa besteht aus sehr locker angeordneten kollagenen und elastischen Fasern, aus Fettzellen, sowie aus zahlreichen Gefäßen und überwiegend mukösen Speicheldrüsen [5]. Sie verbindet die Schleimhaut mit dem Periost des darunter befindlichen Knochengewebes oder dem Muskelgewebe [1]. Im Bereich der mastikatorischen Schleimhaut fehlt sie jedoch ganz, im Bereich der auskleidenden Schleimhaut befindet sie sich als zusätzliche Gewebsschicht unter der Lamina propria. Abhängig von der Dichte der elastischen Fasern ist die aufliegende Mundschleimhaut mehr oder weniger gegen die Unterlage verschiebbar, bzw. abhebbar. Je dichter das Netzwerk der elastischen Fasern, umso verschiebbarer die Mundschleimhaut und umgekehrt [5].

1.1.2 Funktion der Mundschleimhaut

Die Mundschleimhaut gewährleistet den Schutz der Atem- und Verdauungswege, aber auch Sinnes-, Sekretions- und Resorptionsfunktionen gehören zu ihrem Aufgabenbereich [8]. Die Barrierefunktion, also die Verhinderung des Eindringens von Mikroorganismen und anderen Noxen in den Körper über die Mundschleimhaut beim Kau-, Sprech-, oder Schluckvorgang, ist unverzichtbar [2]. Sie bildet zum einen eine mechanische Barriere, welche eine Schutzfunktion der Gewebe z.B. beim Kauen fester Nahrung, nicht zuletzt auch durch ihre feuchte Oberfläche, gewährleistet [8]. Diese wird durch desmosomale Verbindungen zwischen den Zellen, sowie durch die variierenden Verbindungsmechanismen zwischen dem Mundschleimhautepithel und dem darunterliegenden Bindegewebe hergestellt [2]. Zum anderen ist die Permeabilitätsfunktion der oralen Mukosa entscheidend. Sie ist sowohl in der Lage, chemische und mechanische Noxen vom Körper abzuwehren, als auch,

abhängig von der chemischen Zusammensetzung der Substanz, das Eindringen in den menschlichen Organismus zu gewähren [8]. Diese Eigenschaft ist für die Pharmakotherapie sehr nützlich. Der höchste Grad an Permeabilitätsleistung ist sublingual im Mundbodenbereich festzustellen, was eine schnelle Aufnahme eines Wirkstoffes, wie z.B. Nitroglycerin, unter Umgehung des Pfortaderkreislaufes und somit einen schnellen Wirkstoffeintritt ermöglicht [8, 10]. Die Speichelsekretionsfunktion von bis zu 1,5 l täglich ist nicht nur für das Andauen (α -Amylase) und die Erhöhung der Gleitfähigkeit des Speisebolus von Nutzen. Auch für die Remineralisation und Reinigung der Zähne, für den Schutz vor thermischen und chemischen Noxen und für die Sprachfunktion ist Speichel notwendig [8, 11]. Als wichtiger Bestandteil des Speichels trägt das Immunglobulin A zur immunologischen Abwehr bei und ist für die Eliminierung von Bakterien und Viren verantwortlich [8]. Geschmacks- und Sinnesempfindungen werden durch Sinnesrezeptoren für Druck, Temperatur, Berührung und Geschmack vermittelt [11]

1.2 Das orale Plattenepithelkarzinom

Maligne, ektodermale Tumore wie das Plattenepithelkarzinom (PECA) sind die häufigsten malignen Tumore der Mundhöhle. Der Anteil beträgt 80 % aller malignen Neubildungen innerhalb der Mundhöhle und des Oropharynx [2, 12, 13]. Im Jahre 2016 wurden laut einer Studie des Zentrums für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut in Deutschland eine absolute Neuerkrankungsrate von 4 532 Frauen und 12 992 Männern an Krebserkrankungen der Lippe, Mundhöhle, des Rachens und der oberen Atemwege („Kopf-Hals-Tumoren“) publiziert [14]. Im Vergleich zu allen auftretenden Krebsarten hat das orale PECA einen Anteil von ca. 5 % bei Männern und ca. 2 % bei Frauen mit einer Malignomerkrankung [14]. Das mittlere Erkrankungsalter liegt hierbei bei 66,2 Jahren bei Frauen und 63,8 Jahren bei Männern, die 5-Jahres-Überlebensrate ist vor allem abhängig vom Tumorstadium, sowie vom Ausmaß der Metastasierung und liegt nach Aussage des Robert Koch-Instituts bei 61 % bei Frauen und 51 % bei Männern [14]. Gründe dafür sind späte Erkennung in

Kombination mit frühzeitiger Metastasierung in vorwiegend zervikale Lymphknoten, sowie eine große Varianz der Lokalisation [2], denn PECA können grundsätzlich in allen Regionen der Mundschleimhaut der Mundhöhle und des Pharynx vorkommen [15] und die Lage hängt zusätzlich von traditionellen Habitus in bestimmten Völkern der Erde ab. So ist eine sehr hohe Prävalenzrate von PECA im Mundboden in Indien und Südwestasien zu beobachten, die auf das Kauen von Betelnuss zurückzuführen ist [13]. Das PECA hat verschiedene Erscheinungsformen, wie z.B. das verruköse Karzinom (Ackermann-Tumor) und unterschiedliche Differenzierungsgrade. Es werden verhornende, nicht-verhornende und entdifferenzierte PECA unterschieden [12].

1.2.1 Ätiologie des Plattenepithelkarzinoms

Die Entstehung des oralen PECAs ist multifaktoriell und kann nicht auf ein alleiniges Karzinogen beschränkt werden. Es ist eher die Kombination von mehreren Karzinogenen, die sowohl extrinsisch, wie z.B. Alkohol- und Tabakkonsum oder die Erkrankung mit Syphiliserregern oder HPV 16 & HPV 18 Erregern [16], als auch intrinsisch, wie zum Beispiel seltene Genodermatosen, wie die Dyskeratosis congenita [17], das Xeroderma pigmentosum [18] oder die Epidermolysis bullosa dystrophica [19] sein können [2, 12, 20]. Vor allem Tabak- und übermäßiger, regelmäßiger Alkoholkonsum zählen zu den allgemein anerkannten Risikofaktoren für die Entstehung eines oralen PECAs [2, 21]. Obwohl Alkohol nicht zu den eigentlichen Karzinogenen gezählt wird, besteht ein enger Zusammenhang zwischen übermäßigem Alkoholkonsum und der Entstehung von Mundhöhlenkarzinomen [13, 21]. Erhöhter Alkohol- und Tabakkonsum und das Bestehen einer Abhängigkeit, vor allem bei Männern, führt zu Vernachlässigung der Mundhygiene. Infolgedessen wird durch erhöhtes Plaquevorkommen, starke Bakterienbesiedlung und daraus resultierende chronische Entzündungen im Schleimhautbereich die Entstehung eines Plattenepithelkarzinoms erheblich begünstigt [2, 12]. Zudem agiert Alkohol als Irritator der Mundschleimhaut und ist Lösungsmittel für karzinogene Stoffe, insbesondere von Karzinogenen in Tabak [13]. Mechanische Traumata,

verursacht durch überstehende Füllungsränder, schlecht modellierte Kronenränder oder schlechtsitzende Prothesen, können ebenfalls die Krebsentstehung begünstigen, wenngleich sie in manchen Fällen nicht die Hauptursache sind, aber durchaus ein Beschleunigungsfaktor zur Krebsentstehung sein können [13, 22]. Studien beweisen einen direkten Zusammenhang zwischen dem Vorkommen von *Candida albicans* bei Plattenepithelkarzinompatienten [23, 24], in denen N-nitrosobenzylmethylamine, welche von *C. albicans* produziert werden, das Karzinogen darstellen [25].

1.2.2 Klinische Symptome des Plattenepithelkarzinoms

Mundhöhlenkarzinome können prinzipiell ubiquitär vorkommen, häufen sich jedoch im Bereich des anterioren und seitlichen Mundbodens, des weichen Gaumens, retromolar und der Zunge im Bereich des seitlichen Zungenrandes [12]. Die klinischen Symptome sind oft relativ unspezifisch. So kann Schmerz ein frühes Symptom sein, der aber auch auf unzählige andere Ursachen zurückzuführen ist [2, 12]. Meist imponieren sie als schmerzlose Schleimhautveränderungen, sowie als Leukoplakie oder Erythroplakie (weißliche bzw. gemischt weißliche bis rötliche Schleimhautveränderung) und sollten so lange untersucht und beobachtet werden, bis eine definitive Malignität ausgeschlossen werden kann [15]. PECA können sowohl endophytisch (ulzerierend mit meist aufgeworfenen Rändern) als auch exophytisch (über das Niveau der umgebenden Schleimhaut hinauswachsend, verrukös, zerklüftet, erhaben, z.T. fibrinbelegt) wachsen, wobei beide Formen das umliegende Gewebe infiltrieren und nicht exakt abzugrenzen sind [12]. Bei fortgeschrittenem Tumorwachstum können Mundgeruch, Schluckbeschwerden, Schmerzen, Blutung, Gewichtsverlust, zervikale Lymphknotenschwellungen und Verlust der Fähigkeit der Mundöffnung und des Sprachvermögens auftreten [15].

1.2.3 Histopathologie des Plattenepithelkarzinoms

Die histologischen Veränderungen und Merkmale beim PECA der Mundhöhle unterscheiden sich kaum von den Merkmalen des Karzinoms in anderen Körperregionen [2]. Es werden Zell- und Kernpleomorphismen, vermehrte und atypische Mitosen, sowie eine Ansammlung von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen um infiltrierende Tumorzellnester als Antwort auf eine Entzündungsreaktion beobachtet [13]. Zudem können Invasionen in Blut- und Lymphgefäße, sowie Nerven festgestellt werden und innerhalb des Tumorgewebes können zeitweise nekrotische Zonen vorkommen [20]. Der Ursprung des Karzinoms stellt die Dysplasie dar [20]. Um eine Aussage über die Aggressivität, die Heilungsprognose und den möglichen Therapieablauf tätigen zu können, gibt es mehrere Schemata zur genaueren Beurteilung der Tumorstadien. So wurden von Broders vier Grading-Stufen eingeführt, welche im Folgenden in Tabelle 1 aufgelistet werden [26]:

Tabelle 1: Grading nach Broders

Grad	Differenzierung	Merkmal
1	gut differenziert	große Ähnlichkeit mit Plattenepithel sichtbare Keratinisierung selten atypische Mitosen mäßiger Zell- und Kernpleomorphismus
2	mäßig differenziert	wenig Keratinisierung erhöhte Mitoseaktivität, atypische Mitosen erhöhter Zell- und Kernpleomorphismus

Grad	Differenzierung	Merkmal
3	schlecht differenziert	veränderte Epithelstruktur viele atypische Mitosen hoher Zell- und Kernpleomorphismus
4	undifferenziert	sehr hoher Anteil undifferenzierter Tumorzellen keine erkennbare Epithelstruktur

Die TNM-Klassifikation (s. Tabelle 2) ermöglicht ebenfalls ein Tumorstaging (T: Tumor, N: Nodus, M: Metastasen).

Das Wachstum zeichnet sich durch den Durchbruch des Tumors durch die Basalmembran und Infiltration in das darunterliegende Binde- und Muskelgewebe aus, was eine entsprechende stromale Reaktion, wie z.B. eine Entzündungsreaktion hervorruft [15]. Findet das Tumorstadium in der Nähe von Knochen statt, sind Infiltrationen des Plattenepithelkarzinoms mit fortgeschrittenem Stadium in das ossäre Gewebe zu beobachten. Die Knochenstruktur ist dabei entweder zersetzt oder vollständig aufgelöst und von tumorösem Gewebe infiltriert [26].

Tabelle 2: TNM-Klassifikation

TNM-Klassifikation	Tumormerkmale
T _x	Primärtumor nicht beurteilbar
T _{is}	Carcinoma in situ
T ₀	Kein Primärtumor festzustellen
T ₁	Tumor ≤ 2cm
T ₂	Tumor > 2 und ≤ 4 cm

Einleitung

TNM-Klassifikation	Tumormerkmale
T ₃	Tumor >4 cm
T _{4a}	Tumor infiltriert durch kortikalen Knochen in die äußere Muskulatur der Zunge, Kieferhöhle oder Gesichtshaut
T _{4b}	Tumor infiltriert Spatium masticatorium, Proc. pterygoideus oder Schädelbasis oder umschließt die A. carotis interna
N _x	Kein Lymphknotenbefall beurteilbar
N ₀	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N ₁	Metastase in einem solitären, ipsilateralen Lymphknoten, ≤ 3 cm in größter Ausdehnung
N _{2a, 2b, 2c}	Metastase(n) in einem solitären, ipsilateralen (2a), multiplen ipsilateralen (2b), kontra- oder bilateralen (2c) Lymphknoten, 3-6 cm in größter Ausdehnung
N ₃	Metastase(n) von mehr als 6 cm in größter Ausdehnung
M _x	Keine Metastasierung beurteilbar
M ₀	Keine Metastasierung
M ₁	Fernmetastasen

1.2.4 Diagnostik des Plattenepithelkarzinoms

Jede Schleimhautveränderung in Form eines Ulkus, entzündlichen offenen Stellen, weißliche oder rötliche Veränderungen, welche mehrere Wochen persistieren und nicht rückläufig sind oder sich gar vergrößert haben, sind malignitätsverdächtig und es sollten sowohl umliegende Strukturen optisch begutachtet, sowie regionale Lymphknotenregionen palpiert werden [2]. Eine weitere bildgebende Diagnostik ist unumgänglich, um das Ausmaß des Tumorwachstums angemessen beurteilen zu können. Dazu gehören dreidimensionale Verfahren wie die Computertomographie (CT), die Positron-Elektron-Computertomographie (PET-CT), die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT) und die Sonographie [12]. Auch die PAN-Endoskopie, eine endoskopische Kombinationsuntersuchung der Atem- und Speisewege ist ein Mittel der Tumordiagnostik [12]. Da eine sichere Diagnosestellung nur durch histologische Abklärung erfolgen kann, ist eine Probebiopsie unumgänglich. Dabei ist unbedingt zu beachten, die Probeexzision nach den bildgebenden Verfahren durchzuführen, um die Tumorausdehnung nicht durch lokale Entzündungsreaktionen nach der Biopsie-Entnahme zu verschleiern [12]. Die Kategorisierung des Tumors, das sog. „Staging“ erfolgt im Rahmen der TNM-Klassifikation (s. Tabelle 2).

1.2.5 Therapie des Plattenepithelkarzinoms

Das Hauptziel der Therapie ist abhängig vom Stadium des Tumors. Ist keine Tumorheilung angestrebt bzw. möglich, ist eine palliative Therapie anzuraten, deren Ziel es ist, das Tumorleiden und die damit verbundenen Schmerzen und Einschränkungen so gering wie möglich zu halten [12]. Bei geeigneter Ausgangslage kann eine kurative Therapie mit Heilungsaussichten, abhängig vom Tumorstadium, vorgenommen werden. Dazu gehört eine vollständige, radikale Tumorentfernung, je nach Metastasierung und Lymphknotenbefall in Kombination mit einer Lymphadenektomie, deren Ausmaß vom Grad der Lymphknotenmetastasierung abhängig ist [12]. Grundsätzlich bestehen mehrere

Einleitung

kurative Therapieprinzipien [27]: Eine alleinige chirurgische Therapie, die alleinige Strahlentherapie, die Strahlentherapie in Kombination mit einer Chemotherapie oder eine Kombination aus chirurgischer Therapie, Strahlentherapie und Chemotherapie mit Chemotherapeutika wie Cisplatin, Paclitaxel oder Docetaxel, Methotrexat, 5-Fluoruracil, die weitgehend Standard und Grundlage des therapeutischen Vorgehens sind [15, 28]. Außerdem kommen Immuntherapeutika wie Cetuximab oder Immun-Checkpoint-Inhibitoren zur Therapie des PECA zur Anwendung.

Die Totalresektion eines Tumors im Mundbereich bringt allerdings überwiegend großflächige, den Patienten stark belastende und beeinträchtigende Konsequenzen und eine erheblich verminderte Lebensqualität mit sich. Auch chemotherapeutische Maßnahmen haben nach wie vor schwerwiegende Nebenwirkungen. Die hohe Toxizität der Chemotherapeutika in gesunden Zellen bei intravenöser Gabe, aber auch die erniedrigte Permeabilität, geringe Löslichkeit und schlechte Bioverfügbarkeit bei oraler Gabe führen zu sehr hohen Therapiekosten, eine geringe Ansprechrate und letztendlich zu einer erheblich reduzierten Lebensqualität [29]. Deshalb ist es umso wichtiger, geeignete, neuartige Testverfahren an möglichst realitätsgetreuen 3D-Tumormodellen zu entwickeln, um die nach wie vor sehr schlechten Heilungsaussichten bei der Erkrankung an einem Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle zu verbessern und neuartige, vielversprechendere Chemotherapeutika zu entwickeln. Ein Beispiel dafür wären sogenannte „nanodelivery“-Systeme, denen es möglich ist, gezielt maligne Zellen zu detektieren und lokal das eigentliche Chemotherapeutikum mittels Polymersome in die malignen Zellen einzubringen, ohne dabei große Schäden an dem benachbarten gesundem Gewebe hervorzurufen [28].

1.3 Tissue Engineering – Prinzip und Anwendungsgebiete

Der Begriff „Tissue Engineering“ (TE) wurde erstmals im Jahr 1987 durch die „National Science Foundation“ der USA geprägt [30] und bezeichnet ein interdisziplinäres Gebiet der Wissenschaft, dessen Ziel es ist, geschädigte oder erkrankte Körperteile in voller Funktionsfähigkeit in *in vitro* Verfahren künstlich nachzubilden und diese Körperteile durch rekonstruierte Transplantate mit voller Funktionsfähigkeit zu ersetzen [31, 32]. Dabei ist eine enge interdisziplinäre Zusammenarbeit zwischen klinischen Wissenschaftlern, Biologen, Ingenieuren und Chemikern unerlässlich [33].

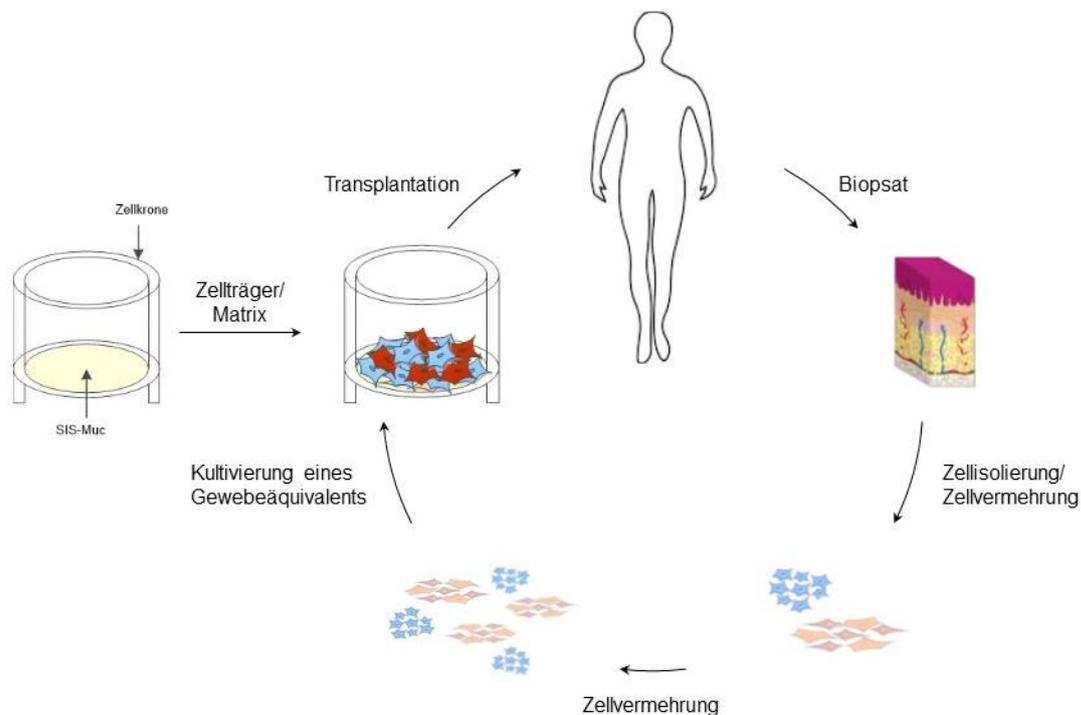


Abbildung 2: Prinzip des Tissue Engineering

Zuerst erfolgt die Biopsieentnahme aus einem Spender und die Isolierung von primären Zellen aus dem Biopsat. Nach Zellkultivierung und Zellvermehrung werden die Zellen auf eine geeignete Matrix ausgesät und Gewebeäquivalente kultiviert, die daraufhin einem Patienten zu therapeutischen Zwecken als Transplantat eingesetzt werden können.

Die Grundprinzipien des Tissue Engineering (s. Abbildung 2) beruhen darauf, dem Patienten Gewebe zu entnehmen, die darin enthaltenen Zellen *in vitro* zu isolieren und zweidimensional zu kultivieren. Äquivalente des Gewebes werden durch Aussäen der Zellen auf eine geeignete Trägermatrix generiert und diese

nach erfolgreicher Reifung dem Patienten zu implantieren [34]. Um Abstoßungsreaktionen zu vermeiden und eine physiologische Einheilung der Transplantate gewährleisten zu können, ist es förderlich, wenn es sich um autologe Zellen handelt [34].

Nicht nur das Generieren von Transplantaten, sondern auch die Testung von pharmakologischen Substanzen und kosmetischen Produkten an *in vitro* hergestellten Testsystemen sind wichtige Anwendungsgebiete im TE [35]. Dabei kann durch die Herstellung von Gewebeäquivalenten, die dem Ursprungsgewebe möglichst identisch sind, eine Vielzahl von Tierversuchen vermieden werden [36]. Durch Anlegen von dreidimensionalen *in vitro*-Modellen können zudem sowohl pathologische (z.B.: tumoröse) als auch physiologische (z.B. Wundheilungsmechanismen) Prozesse besser analysiert und verstanden werden, sowie Studien zu Toxizität und Biokompatibilität von bestimmten Materialien durchgeführt werden [36, 37].

1.4 Tissue Engineering der Mundschleimhaut

Oral- und Mund-Kiefer-Gesichtschirurgen werden gerade bei Rekonstruktionen nach Traumata oder kongenitalen Defekten, bei Defektdeckungen nach Tumorresektionen, bei parodontalen Rezessionsdeckungen oder bei präprothetischen chirurgischen Maßnahmen mit einem hohen Bedarf an Mundschleimhautepithel bei einem geringen Angebot der selbigen konfrontiert [38, 39]. Bei diesen Eingriffen werden bis heute entweder autologe Spalthauttransplantate oder Transplantate aus dem Bereich des harten Gaumens als „Goldstandard“ entnommen, wobei ersteres Nachteile in der Textur der Haut mit sich bringt und das Angebot an Mukosa in der palatinalen Region sehr schlecht ist [39]. Die Entwicklung von 3D oralen Mukosaäquivalenten (OMÄ) *in vitro*, abhängig von den Anwendungsgebieten, bietet der Medizin und der Wissenschaft völlig neue Möglichkeiten, um Problemen, wie z.B. Morbidität des Entnahmegebietes, Abstoßungsreaktionen oder Gewebeknappheit zu vermeiden und ein dem Originalgewebe stark entsprechendes Äquivalent zu schaffen [37].

Einleitung

In den frühen 80-ern wurden aus kleinen Biopsaten der Haut oder Schleimhaut dünne, epitheliale Zellblätter generiert, um Brandwunden zu behandeln [40] oder kleine präprothetische Maßnahmen zu ergreifen [41, 42]. Allerdings wiesen diese Transplantate keine Lamina propria auf und ohne diesen stabilisierenden Gewebeabschnitt fehlte die Stabilität - die Transplantate waren fragil, die Handhabbarkeit war schlecht und die Tendenz zu kontrahieren groß [39, 43]. Aus diesen Gründen wurden dreidimensionale OMÄ konstruiert, die sowohl Epithel, als auch die darunterliegende Lamina propria, sowie eine dazwischenliegende Basalmembran aufweisen, um o.g. Probleme zu vermeiden und eine möglichst exakte *in vitro* Situation zu simulieren [37, 39]. Für den Aufbau eines OMÄ werden drei wesentliche Komponenten benötigt: Zellen, Zellträger und ein geeignetes Zellkulturmedium.

Im Allgemeinen erfolgt zuerst das Aussäen von Fibroblasten auf den Zellträger und eine ca. 1-wöchige Inkubationszeit mit regelmäßigem Mediumwechsel. Während dieser Zeit erfolgt die Entwicklung des bindegewebigen Anteils des Modells unter Submerskultivierung, bei der die Modelle vollständig mit Medium bedeckt sind. Dann werden Keratinozyten auf den Zellträger aufgebracht und für weitere Tage unter vollständiger Bedeckung mit Medium kultiviert, um die Ausbildung eines durchgehenden Keratinozytenmonolayers zu erreichen. Die anschließende Air-to-Liquid-Interface-Methode (ALI), bei der die Modelle lediglich von basolateral über Diffusion des Mediums durch eine permeable Membran mit Nährstoffen versorgt werden, verbesserte die Entwicklung und die Differenzierung des Gewebes im Vergleich zu Monolayerkulturen [44]. Dabei entsteht mehrschichtiges Epithel [45], welches z.B. Basalmembranbildung, Differenzierungsvorgänge wie Keratinisierung (falls in dem Spendergewebe vorhanden) und Expression von Zytokeratinen, zeigt [37, 46].

1.4.1 Zellen für Mundschleimhautäquivalente

Die Zellen, die für den Aufbau von OMÄ verwendet werden, sind Keratinozyten und Fibroblasten. Fibroblasten sind die Hauptzellen des Bindegewebes und für die Bildung der Extrazellulärmatrix (EZM) verantwortlich (s. 1.1.1.3). Sie werden

aus dem bindegewebigen Anteil der autologen Biopsate isoliert und haben Einfluss auf die Morphogenese, Keratinozyten-Adhäsion und auf die Formation der Komplexbildung von dermal-epithelialen Verbindungen. Sie sind für die Generierung von realitätsnahen OMÄ unerlässlich [37].

Die Keratinozyten sind entweder primär und aus dem epithelialen Anteil der autologen Biopsate isoliert oder es werden Keratinozytenzelllinien verwendet. Zelllinien ermöglichen die Herstellung von standardisierten, gut reproduzierbaren *in vitro* Modellen, die vor allem für Biokompatibilitätstests geeignet sind, wohingegen *in vitro* Modelle mit primären Keratinozyten als Transplantate verwendet werden, da durch die Verwendung von autologen Zellen die Abstoßungsreaktion auf ein Minimum reduziert wird [37].

Die Keratinozytenzelllinie TR146, gewonnen aus einer Lymphknotenmetastase einer 67-jährigen Frau mit der Diagnose Plattenepithelkarzinom, ist die am häufigsten verwendete Zelllinie für OMÄ-Modelle und wird auch bei einem der kommerziell erhältlichen *in vitro* Modellen des Herstellers SkinEthic™ verwendet [37, 47, 48]. Allerdings sollten die Ergebnisse von Modellen mit Zellen der Linie TR146 mit Vorsicht betrachtet werden und diese durch andere Modelle mit normalen Zellen verifiziert werden, da sie tumorassoziierte Zellen und keine apathologischen Zellen sind [49].

Die Zelllinie OKF6/TERT-2, eine immortalisierte Zelllinie aus „normalen“ Keratinozyten, ermöglicht eine Reproduzierbarkeit ohne einer tumorassoziierten Zelllinie wie TR146 und vermeidet somit dyskeratotische Veränderungen [49].

1.4.2 Zellträger für Mundschleimhautäquivalente

Die Wahl des geeigneten Zellträgers, der eine künstliche Extrazellulärmatrix (EZM) für die Zellen darstellt und einen dreidimensionalen Aufbau der Modelle ermöglicht, spielt eine wichtige Rolle für den Aufbau eines OMÄ. Dabei wird zwischen natürlichen und synthetischen Zellträgern unterschieden, wobei auf ideale Biokompatibilität, Porosität, die nötige Biostabilität und gute mechanische Eigenschaften geachtet werden muss [37].

Einleitung

Synthetische Zellträger können beispielsweise aus Biopolymeren wie Polyglycolsäure (PGA) oder Polylactatsäure (PLA) oder deren Co-Polymeren (PLGA), sowie Polydioxanone (PDO) und CO-Polymere von Trimethylencarbonat (TMC) aufgebaut sein [37]. Synthetische Zellträger haben die Vorteile, dass kein Risiko besteht, dass Krankheiten übertragen werden können. Es ist immer eine höhere Reproduzierbarkeit als bei natürlichen Zellträgern gegeben und sie sind in großen Mengen verfügbar [50]. Allerdings muss gesagt werden, dass diese Materialien Fremdkörperreaktionen und infolge dessen Narbenbildung und Fibrosierung hervorrufen können [51].

Natürliche Zellträger sind meist allogene, aus Leichen gewonnene Matrizes, oder xenogene dezellularisierte Matrizes, welche von Tieren gewonnen wurden [39]. Ein Beispiel hierfür ist allogene deepithelialisierte Dermis (DED) von Leichen (AlloDerm™), welche kommerziell erworben werden kann und überwiegend für humane epidermal-dermale Äquivalente verwendet wird [39, 52]. Die Verwendung von Leichenderivaten bringt allerdings einige Nachteile mit sich. So wird DED von unterschiedlichen Spendern aus unterschiedlichen Regionen entnommen, woraus abweichende Dicke und abweichende charakteristische Merkmale resultieren, was gerade für *in vitro* Testverfahren ein Problem darstellt [47]. Davon abgesehen ist AlloDerm™ aufgrund der hohen Anschaffungskosten als Zellträger für *in vitro* Testmodelle nicht kosteneffektiv [47].

Außerdem kann Gewebe der deepithelialisierten Rinderzunge [53] oder amniotische humane Membran [54] zum Aufbau von OMÄ verwendet werden. Azellularisierte, natürliche Zellträger besitzen eine kollagenreiche EZM, reich an strukturellen und funktionellen Proteinen (vascular-endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor [55, 56]) und haben mehr Vorteile durch die Verbesserung von epitheliale Zell-Attachement als synthetische EZM [57, 58]. Weitere Vorteile der natürlichen Matrix sind gute Haltbarkeit und geringe Antigenität [37], die Fähigkeit, strukturelle Eigenschaften, selbst nachdem sie gefroren war, zu erhalten [59] und die Lagerbarkeit in Glycerol [60].

Das für den Aufbau von OMÄ am meisten verwendete Polymer ist Kollagen Typ I, das aus Tieren extrahiert wird. Vorteile sind zum einen, dass es in der Lage ist,

Einleitung

auf äußere Einflüsse mittels Degeneration oder Remodellation durch Enzyme zu reagieren, zum anderen ist es auch in hohen Dosen nicht toxisch [39, 61]. Es vereinfacht die Einwanderung von Fibroblasten, die wiederum Substrate produzieren, die wichtig für die Entstehung der vielschichtigen Formation des Epithels durch Keratinozyten sind und für die Einwanderung in das Bindegewebe sorgen [62]. Kollagen war das erste Material, das zur Konstruktion von dermalen *in vitro* Äquivalenten verwendet wurde [63] und sorgt nach wie vor in vielen Studien für vielversprechende Resultate [39]. Der Nachteil der Kollagenmembran ist die geringe Biostabilität [64]. Ebenso werden andere natürliche Materialien, wie z.B. Fibrin [65], Elastin [66], und Glycosaminoglykane [67] verwendet, zum Teil auch in Kombination mit Kollagen [37, 39].

Rekombinante Polymere sind Polypeptide, die rekombinante DNA-Technologie verwenden, um gewünschte Aminosäuren in einer bestimmten, für spezielle Projekte in der Biotechnologie geforderten Aminosäuresequenz miteinander zu verbinden [39]. Dadurch ist es möglich, biotechnisch proteinbasierende Polymere (PBSs) mit einer komplexen und definierten Struktur herzustellen [39]. Beispiel dafür sind Elastin-like rekombinante Polymere (ELRs), die als Beschichtungen [68], Fasern [69] und Filme [70] verwendet wurden und deren Präsenz für einen Anstieg der Proliferationsrate von Epithelzellen, Fibroblasten und epithelialen Stammzellen sorgten [39]. Es gibt unterschiedliche Herstellungsverfahren, um Polymere zu einem für OMÄ geeignete Zellträger zu formieren, wie z.B. das Freeze drying oder Elektrosponning, auf die in dieser Arbeit allerdings nicht näher eingegangen werden soll.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Wahl des geeigneten Zellträgers mit den jeweiligen spezifischen charakteristischen Eigenschaften stark von den Anwendungsgebieten abhängig ist. Für klinische Anwendungen zum Beispiel, wie Transplantate oder geführte Gewebserneuerungen, ist die biologische Abbaubarkeit von großer Bedeutung, da dies den optimalen Ersatz des Ursprungsgewebes ermöglicht, während hingegen ein nicht resorbierbares Material eine Fremdkörperreaktion hervorrufen kann [64]. *In vitro* Testsysteme erfordern wiederum neben einer kostengünstigen Beschaffungsmöglichkeit, eine Herstellbarkeit in großen Mengen, ausreichende maximale Biostabilität, um die

Struktur während des gesamten Testzeitraums aufrechterhalten zu können [64], sowie gute Reproduzierbarkeit, um verifizierte, aussagekräftige Ergebnisse erzielen zu können.

1.4.3 *In vitro* Testsysteme

Tissue Engineering eröffnet zahlreiche Möglichkeiten in unterschiedlichen Anwendungsgebieten. So werden einerseits *in vitro* Gewebe generiert, die letztendlich zur klinischen Anwendung kommen. Andererseits werden *in vitro* Testsysteme angesetzt, um zum Beispiel genaue Mechanismen der Pathogenese von Erkrankungen oder die Interaktion der Mukosa mit oralen Mikroben genauestens analysieren und verstehen und die Reaktionen der Mukosa auf bestimmte Werkstoffe und Substanzen testen zu können. Hierfür eignen sich generierte OMÄ hervorragend als *in vitro* Testsysteme [36].

1.4.3.1 *In vitro* Mundschleimhautmodelle zur Testung von Materialien und Medikamenten

Der rasante Fortschritt der Wissenschaft mit fortlaufend neuen Werkstoffen in der Zahnheilkunde, dentalen und oralen Pflegeprodukten und Medikamenten auf dem Markt, erfordert möglichst detailgetreue *in vitro* Testmodelle, um die genauen Wechselwirkungen mit oraler Mukosa, sowie mögliche Nebenwirkungen erfassen zu können.

So wurden Untersuchungen durchgeführt, die sich mit der Biokompatibilität von dentalen Materialien beschäftigen, wie z.B. die Erprobung von Bonding-Systemen bei Anwendung von adhäsiven Kompositfüllungen [71], die Testung neuartiger Komposite, die auf Triethylenglycoldimethacrylat (TEGDMA), Bisphenol-A-Diglycidylmethacrylat (BisGMA), Urethandimethacrylat (UDMA) oder BisGMA/TEGDMA basieren [72], oder Legierungsbestandteile wie Nickelchlorid [73], Kobaltchlorid oder Palladiumchlorid von prothetischen Metallkonstruktionen [74], oder die Analyse der Biokompatibilität von Drähten, welche in kieferorthopädischen Behandlungen verwendet werden [75]. Ebenso

wurde in verschiedenen Modelldurchläufen die Biokompatibilität von Implantaten anhand von Untersuchungen des periimplantären Weichgewebes untersucht [76, 77], sowie der Einfluss von alkohol- und ethanolhaltigen Mundspüllösungen, auch in Bezug auf die Permeabilität der Mundschleimhaut [78, 79]. Auf Grund der Fähigkeit der Mukosa zur systemischen Aufnahme von Medikamentenwirkstoffen im Gegensatz zur parenteralen Aufnahme werden auch Medikamente entwickelt, deren Wirkstoffe über die Mundschleimhaut in den menschlichen Organismus diffundieren [80]. Die starke Durchblutung und die schnelle Regenerationsfähigkeit der oralen Mukosa macht eine rapide systemische Wirkstoffabgabe bei geringer lokaler Gewebeschädigung und geringem Wirkverlust möglich [80]. Für derartige Tests stehen unter anderem auch kommerziell erhältliche Testsysteme, wie z.B. das dreidimensionale *in vitro* Modell von SkinEthic Laboratories (Nizza, Frankreich), das aus der Keratinozytenzelllinie TR146 auf Polycarbonat-Inserts besteht oder EpiOral™ (unverhornt) und EpiGingival™ (verhornt) von der Firma MatTek Corp. (Ashland, USA) zur Verfügung.

1.4.3.2 In vitro Mundschleimhautmodelle zur Erforschung von Krankheiten

Neben der Anwendung gesunder *in vitro* Mundschleimhautmodelle zur Testung von Materialien und Medikamenten, hat die Generierung von pathologischen dreidimensionalen Mundschleimhautmodellen einen großen Stellenwert im Bereich des TE. 3D-OMÄ, gekoppelt mit pathogenen Keimen, Viren oder tumorassoziierten Zellen, stellen eine ideale Grundlage dar, Zusammenhänge und pathogene Mechanismen erforschen zu können.

So beschäftigt sie die Studie von Mostefaoui et al. (2004), in der ein sehr realitätsgetreues 3D-OMÄ etabliert wird, intensiv mit der Reaktion der oralen Mukosa nach Infektion mit dem Hefepilz *Candida albicans* und es konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Infektion und lokaler Abwehrreaktionen der Mukosa festgestellt werden [81]. Darüber hinaus kann anhand von *in vitro* OMÄ die Reaktion der Mukosa auf andere pathogene Erreger und Bakterien analysiert werden [36].

Die Studie von Gursoy et al. (2007) beschäftigt sich mit der Überlebensfähigkeit des Bakteriums *Fusobacterium nucleatum* in aerober Umgebung und fand heraus, dass das Bakterium der Art *F. nucleatum* AHN 9508, eingebettet in einem Biofilm, in der Lage ist, durch die epitheliale und basale Membran in das darunterliegende Bindegewebe einzudringen. Die Invasivität und die zytotoxischen Effekte dieses Bakteriums in der Formation eines Biofilms ist erheblich höher, als in einem frei umherschwimmenden Zustand [82]. Eine weitere Studie über parodontalpathogene Keime bestätigte die Fähigkeit des gram-negativen, anaeroben Bakteriums *Porphyromonas gingivalis* (P.G.), das parodontale Gewebe infiltrieren und die Antwort des Immunsystems auf proinflammatorische Reize modulieren zu können. Damit spielt P.G., das als Leitkeim für chronische Parodontitis angesehen wird, eine entscheidende Rolle in der daraus resultierenden Gewebsdestruktion [83]. Ebenso wurden mit Hilfe von OMÄ die Interaktion des HIV Virus mit der Mukosa, sowie Infektionsvorgänge und Übertragungswege genauer untersucht [84].

1.4.4 Humanes orales Plattenepithelkarzinomäquivalent

Manifestieren sich lediglich Symptome vieler systemischer Autoimmunerkrankungen oder Infektionskrankheiten durch pathologische Schleimhautveränderungen in der Mundhöhle, so ist das PECA der Mundschleimhaut eine maligne Neubildung, die direkt aus dem Gewebe hervorgeht und eine primäre lokale Therapie erfordert. Das PECA ist die häufigste maligne tumoröse Erkrankungsform im Kopf-Hals-Bereich. Obwohl zahlreiche Forschungen über Krankheitsverlauf, -entstehung und -behandlung durchgeführt werden, bleibt die 5-Jahres-Überlebensrate der Patienten sehr klein und liegt lediglich bei ca. 51 % bei Männern und 61 % bei Frauen [14]. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Studien über das PECA der Mundschleimhaut, dessen Vorstufen und unterschiedlich fortgeschrittenen Stadien veröffentlicht. Dafür konnten *in vitro* Tumor-Modelle mittels Tissue Engineering generiert werden, die sich sowohl im Gebrauch der verwendeten Zellarten, als auch in der Wahl der Matrix unterscheiden.

Dabei ist bei allen Studien eine klare Tendenz zur Generierung von dreidimensionalen Modellen erkennbar und es wurde z.B. ein stärkeres Tumorwachstum in 3D-Modellen als in Monolayer-Kulturen beobachtet [85]. Um *in vitro* Tumormodelle aufzubauen, die der *in vivo* Situation möglichst nahekommen, werden also sowohl eine geeignete Matrix, als auch die gewünschten zu untersuchenden Zellen verwendet. Da auch bei Forschungen von präkanzerösen Läsionen im Rahmen von Tierversuchen keine einheitlichen Ergebnisse festgestellt werden konnten [86], diese schwierig zu etablieren sind [87] und auch aus ethischer Sicht Tierversuche höchst bedenklich sind, ist es wichtig, ein 3D-Tumormodell zu etablieren, das sich einer *in vivo* Situation stark annähert.

1.4.4.1 Verwendete Zellen für *in vitro* Tumormodelle der Mundschleimhaut

Für den Aufbau der Modelle werden sowohl primäre Zellen, als auch immortalisierte Zelllinien verwendet. Unter den primären Zellen befinden sich sowohl primäre normale Keratinozyten und Fibroblasten, gewonnen aus Biopsien gesunder Mundschleimhautpartien [88], also auch Keratinozyten und Fibroblasten, welche aus präkanzerösen oder tumorösen Läsionen isoliert wurden [87]. Von allen Zellarten (Keratinozyten, Fibroblasten, Tumorzellen) wurden sowohl primäre Zellen, als auch etablierte Zelllinien verwendet, die in Tabelle 3 nun genauer dargestellt werden.

Tabelle 3: Beispiele von Zelllinien und etablierten Kulturen von Zellen des Plattenepithelkarzinoms

Zellart	Zelllinie	Herkunft	Studie
Fibroblasten	3T3-J2	Subklon eines embryonalen Mausfibroblasten	Gaballah et al. (2007, 2008) [87, 89]
	HHF (human foreskin fibroblasts)	Human, Vorhaut	Nyström et al. (2005) [90]
Keratinozyten	C1	Human, Zunge, PECA	Nyström et al. (2005) [90]

Einleitung

Zellart	Zelllinie	Herkunft	Studie
	CA1	Human, PECA	Nyström et al. (2005) [90] Marsh et al. (2011) [91]
	Cal27	Human, PECA, Zunge, wenig differenziert	Colley et al. (2011) [92]
	CDOK	human, milde Dysplasie an Kommissur	Gaballah et al. (2007, 2008) [87, 89]
	D20 [93]	human, Leukoplakie, laterale Zunge/ Mundboden, schwere Dysplasie	Gaballah et al. (2007, 2008) [87, 89] Colley et al. (2011) [92]
	D6 [93]	human, Leukoplakie, laterale Zunge/ Mundboden, mäßige Dysplasie	Gaballah et al. (2007, 2008) [87, 89]
	DOK	human, Zunge, milde Dysplasie	Gaballah et al. (2007, 2008) [87, 89] Dalley et al. (2013) [94] Kulasekara et al. (2009) [95] Costea et al. (2005) [88]
	FaDu	human, Pharynx, PECA	Colley et al. (2011) [92]
	G26	Human, PECA	Mackenzie et al (2004) [96]
	G28	Human, PECA	Mackenzie et al (2004) [96]
	G29	Human, PECA	Mackenzie et al (2004) [96]

Einleitung

Zellart	Zelllinie	Herkunft	Studie
	H357	Human, Zunge, PECA	Nyström et al. (2005) [90]
	LDOK	human, lingualer Alveolus, carcinoma in situ	Gaballah et al. (2007, 2008) [87, 89]
	LLC	Maus, Lungenkarzinom	Fischbach et al. (2007) [85]
	LTDOK	human, mäßige Dysplasie an lateralem Zungenrand	Gaballah et al. (2007, 2008) [87, 89]
	MCF-7	Human, Mammakarzinom	Fischbach et al. (2007) [85]
	OKF6/TERT2	Human, Mundboden, nicht pathogen	Dalley et al. (2013) [94]
	OSCC-3	human, Zunge	Fischbach et al. (2007) [85]
	PE/CA-PJ 15	human, Zunge, PECA	Costea et al. (2005) [88] Dalley et al. (2013) [94] Kulasekara et al. (2009) [95]
	POE9n [97]	human, prämalig, mäßige Dysplasie	Gaballah et al. (2007, 2008) [87, 89] Dalley et al. (2013) [94]
	SPDOK	human, milde Dysplasie, weicher Gaumen	Gaballah et al. (2007, 2008) [87, 89]
	U87	Human, Glioblastom	Fischbach et al. (2007) [85]
	UM-SCC5	Human, PECA Larynx	Mackenzie et al. (2004) [96]

Zellart	Zelllinie	Herkunft	Studie
	UM-SCC-5PT	Human, PECA Larynx, Sublinie	Mackenzie et al (2004) [96]
	VB6	Human, Zunge, PECA	Nyström et al. (2005) [90] Marsh et al. (2011) [91]

1.4.4.2 Verwendete Zellträger für *in vitro* Tumormodelle der Mundschleimhaut

Aufgrund einfacher Handhabung wurden die meisten Modelle auf einer Matrix aus Kollagen Typ I aufgebaut [87, 88, 90, 91, 95], wie z. B. bei Kulasekara et al. (2007), Nyström et al. (2005), Costea et al. (2005), Marsh et al. (2011) oder Gaballah et al. (2008).

Es konnten aber auch erfolgreich Modelle mit DED als Matrix, wie es Colley et al. (2011) oder Dalley et al. (2012) gelang, oder mit PLG (Polylactid-co-glycolid) von Fischbach et al. (2007) etabliert werden.

1.4.4.3 Tumormodelle *in vitro*

Bis zum heutigen Zeitpunkt haben sich schon viele Wissenschaftler mit der Thematik Tissue Engineering und der Generierung von Tumormodellen beschäftigt, welche das Plattenepithelkarzinom der Mundschleimhaut *in vitro* möglichst exakt imitieren sollten.

Alle Studien verfolgen dabei unterschiedliche Ziele. So sind der Aufbau und die Wahl der Zellen und der Matrix eines jeden Tumormodells abhängig von dem jeweiligen Ziel der Studie. Dalley et al. (2013) [94] generierten Tumormodelle, um die Regulation der Expression unterschiedlicher an der Entstehung von malignen Veränderungen beteiligter Proteine, wie zum Beispiel CD44 oder p75^{NTR}, sowie die Rolle der Stammzellen in der präkanzerösen Phase während der Karzinogenese zu untersuchen. Es gelang, DED mit unterschiedlichen Keratinozytenzelllinien (s. Tabelle 3) zu besiedeln und somit Dermis-basierende

Einleitung

Tumormodelle anzulegen. Dabei wurde auf Fibroblasten verzichtet. Parallel dazu wurden dieselben Parameter in Monolayerkulturen untersucht. Es wurde herausgefunden, dass anhand von 3D-Modellen mehr Information über die hierarchische Regulation von Zellen *in vitro* gewonnen werden kann als in Monolayerkulturen. Die hierdurch gewonnenen Informationen über die hierarchische Zellregulation waren entscheidend für die Analyse der empirischen Daten über die Expression von Stammzellmarkern in unterschiedlichen Zelllinien. So konnten beispielsweise Colley et al. (2011) zum einen 3D-Modelle von gesunder Mundschleimhaut, basierend auf allogener DED, mittels primärer Fibroblasten und Keratinozyten erzeugen. Zum anderen generierten sie 3D-Modelle auf Basis von DED und Fibroblasten, auf die sie mittels unterschiedlicher Methoden Tumorzellen des oralen PECA's verschiedener Tumorzelllinien (s. Tabelle 3) aufbrachte. Ziel der Studie war es, Modelle mit unterschiedlichen dysplastischen Schweregraden bis hin zum *Carcinoma in situ* zu etablieren. Die Modelle unterschieden sich, abhängig von der Art der Tumorzelllinie, der Kultivierungsdauer und der Applikationsmethode, im Schweregrad der Dysplasien. Es kamen architektonische Störungen wie milde und schwere Dysplasie (Cal27, D20), wie die eines früh-invasiven Karzinoms (Cal27, D20) und eines Carcinoma in situ (FaDu) vor, die folglich unterschiedliche architektonische und zelluläre Veränderungen aufwiesen. [92, 98].

Marsh et al. (2011) untersuchten den Einfluss hoher smooth muscle actin (SMA) Expression, die die Myofibroblastendifferenzierung induziert, auf die Mortalität, unabhängig vom Krankheitsstadium des oralen PECA. Dafür wurde ein Tumormodell entwickelt, das aus primären Fibroblasten und den genannten Tumorzelllinien (s. Tabelle 3) mittels ALI-Methode auf einer Kollagen Typ I-Matrix aufgebaut wurde. Anhand der 3D-Modelle wurde die funktionale Rolle der Myofibroblasten *in vitro* untersucht. Reine Fibroblastenkulturen, sowie Co-Kulturen aus Fibroblasten und Tumorzellen zeigten bei Zugabe von TGF- β 1, einem Zytokin, das für die Differenzierung zu Myofibroblasten hauptsächlich verantwortlich ist, eine induzierte myofibroblastische Transdifferenzierung. Dies alles korrelierte mit einem Anstieg der SMA-Expression. Außerdem führten sie eine retrospektive Studie über Plattenepithelkarzinompatienten durch. Dabei

Einleitung

stellte sich heraus, dass stromale SMA Expression der signifikanteste und aussagekräftigste unabhängige Prognosefaktor unter den klinischen, pathologischen molekularen Faktoren bezüglich der Mortalität war. Schon in diagnostischen Biopsien ließ sich eine hohe SMA-Expression feststellen und so auf einen aggressiven Tumor schließen [91].

Kulasekara et al. (2009) bewiesen einen Zusammenhang zwischen Krebsentwicklung und Expression von Basalmembranproteinen. Obwohl zuvor davon ausgegangen wurde, dass Basalmembranproteine für Tumorzellen eine Barriere darstellen, die es zuerst zu überwinden gilt, wurde dann vermutet, dass während des Tumorwachstums Basalmembranproteine nicht nur angegriffen, sondern auch neu gebildet werden. Die Modelle basierten auf einer Kollagen Typ I-Matrix und unterschiedlichen Tumorzelllinien (s. Tabelle 3). Zusätzlich variierten diese Modelle in Anwesenheit bzw. Abwesenheit von Fibroblasten. Es wurde beobachtet, dass die Expression von Basalmembranproteinen in neoplastischen Modellen von allen drei Proteinen angestiegen war, verglichen zu normalen Mukosamodellen und zusätzlich eine noch höhere Expression bei Anwesenheit von Fibroblasten stattfand. Durch Etablierung dieser *in vitro* Modelle, die der *in vivo* Situation sehr nahekamen, wurde geschlossen, dass eine vermehrte Basalmembranproteinexpression während der Karzinogenese stattfindet und sowohl die epithelial-mesenchymale Komponente, als auch die Anwesenheit von Fibroblasten dabei eine entscheidende Rolle spielten [95].

Gaballah et al. (2008) entwickelten zuerst ein Schema, das eine einheitliche Einteilung der Läsionen in die unterschiedlichen Schweregrade mittels eines Punktescores ermöglichte. Damit konnten unter Berücksichtigung von architektonischen und zytologischen Merkmalen (Unterschieden in Zellform, -größe, Veränderungen im Zellkern), sowie unter der Berücksichtigung von bestimmten Proteinexpressionen normales Epithel, leichte, mäßige und schwere Dysplasien, sowie *Carcinoma in situ* genauer definiert werden. Sie bauten Modelle basierend auf einer Matrix aus Kollagen Typ I auf und verwendeten sowohl normale primäre Keratinozyten und Fibroblasten aus gesunder Mundschleimhaut, sowie aus Läsionen isoliert, als auch Tumorzellen aus

Einleitung

etablierten Zellkulturen und Zelllinien (s. Tabelle 3). Es konnte dadurch aufgezeigt werden, dass Modelle, die unter unterschiedlichen Wachstumsbedingungen kultiviert waren, eine Veränderung in der Proliferation und dem Grad der Dysplasie aufwiesen. Außerdem wurde festgestellt, dass beim Modellaufbau mit dysplastischen primären Fibroblasten im Vergleich zu normalen Fibroblasten, gewonnen aus Läsionen, die Proliferationsrate sank und der Grad der Dysplasie stieg. Dieses Ergebnis bestätigte die Tatsache, dass eine Modulierung des Karzinomwachstums durch das Bindegewebe während der präkanzerösen Phase stattfand [87, 99].

Fischbach et al. (2007) legten den Schwerpunkt ihrer Studie auf den Vergleich von 3D- zu 2D-Modellen mit Zelllinien des Plattenepithelkarzinoms und verglichen diese Modelle mit anderen Tumorzelllinien (s. Tabelle 3). Dabei wurden Zellen auf einer Polylactid-glycolid (PLG)-Membran angesiedelt und auf Fibroblasten verzichtet. Die Modelle wurden anschließend entweder für drei Wochen in Mäuse eingepflanzt oder mittels „Scanning electron microscopy“ (SEM) nach 10 d Kultivierungsdauer analysiert. Zudem wurde an 2D- und 3D-Modellen nach 5 Tagen Kultur für 48 h das neuartige Medikament PI3K-Inhibitor LY294002 (Sigma) getestet, das den VEGF-Signalweg und damit die Tumorangiogenese blockierte. Danach wurde die Zell-Viabilität überprüft und es konnte auf Unterschiede in der Reaktionsfähigkeit zwischen 2D- und 3D-Modellen geschlossen werden [85].

Costea et al. (2005) gewichteten die Studie ausschließlich auf den Einfluss auf die Morphogenese von darunterliegenden Fibroblasten in 3D-Tumormodellen. Dabei wurden unterschiedliche Keratinozyten (s. Tabelle 3) auf eine Kollagen Typ I-Matrix ausgesät, einmal mit und einmal ohne Anwesenheit von Fibroblasten. Bei Betrachtung der Morphogenese mittels Histomorphometrie, Immunhistochemie und der TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP in situ nick end-labelling) -Methode wurde deutlich, dass die Anwesenheit von Fibroblasten die Zellproliferation aller Keratinozytenarten deutlich erhöhte und das Wachstum der Tumorzelllinien induzierte. Durch eine Veränderung (DOK-Zellen) oder völliges Ausbleiben (PE/CA-PJ 15) der Expression der Marker in Anwesenheit von Tumorzellen wurde darauf

Einleitung

geschlossen, dass Fibroblasten durch Tumorzellen die Kontrolle über die Epitheldifferenzierung sukzessive verlieren [88].

Auch Nyström et al. (2005) beschäftigten sich mit der quantitativen Analyse der Tumorzellinvasion und etablierten ein computerunterstütztes digitales Bildanalyzesystem. Dieses System beurteilte objektiv den Grad der Invasion und entwickelte folgend einen numerischen „Invasionsindex“, der Invasionstiefe mit Invasionsmuster kombinierte. Daraus entstand ein quantitativer Wert, der die Beurteilung des Einflusses auf positive und negative Regulation der Tumorzellinvasion ermöglicht. Die Tumormodelle basierten ebenfalls auf einer Kollagen Typ I-Matrix, wobei sieben unterschiedliche Zusammensetzungen des Gels verwendet wurden und es wurden unterschiedlich invasive Tumorzelllinien (s. Tabelle 3) getestet. Es wurden *in vitro* Modelle für 6 Wochen in Mäuse verpflanzt und untersucht. Der „Invasionsindex“ brachte hervor, dass zum einen das etablierte organotypische Modell auch bei individuellen Gelen eine Invasion erlaubt. Zum anderen, dass eine Reproduzierbarkeit gegeben ist, dass eine genaue Repräsentation der Invasivität der Tumorzellen gegeben ist und dass die Methode auch bei Modellen, welche in Mäuse verpflanzt wurden, anwendbar ist. Zudem wurde der Einfluss von Matrixbeschaffenheit und unterschiedlicher Anzahl ausgesäter Fibroblasten auf die Tumorzellinvasion erkannt [90].

Mackenzie et al. (2004) etablierten ein Tumormodell, indem sie auf gesunde organotypische Modelle mit einer Matrix aus Kollagen Typ I, die einen Tag zuvor unter Submerskultur mit primären Fibroblasten besiedelt wurde, sowohl eine Suspension, bestehend aus reinen Tumorzellen, also auch eine Suspension, bestehend aus primären Keratinozyten und Tumorzelllinien (s. Tabelle 3) zu unterschiedlichen prozentualen Anteilen (0,1 %-5 %) applizierten. Modelle, die mit reinen Tumorzellpopulationen generiert wurden, zeigten in der Epithelschichtung geringgradige Veränderungen, abhängig von der Art der Zelllinie. Bemerkenswert war, dass sich reine Tumorzellpopulationen wie normale Zellen verhielten und sich zu einer epithelähnlichen Struktur formierten. Keines der Modelle zeigte eine ausgeprägte Bildung des Stratum corneum. Bei Modellen mit Subpopulationen der Tumorzellen wurde eine Persistenz der Tumorzellen in basalen Bereichen der Modelle und eine fortschreitende

Clusterbildung beobachtet, wohingegen gesunde primäre Keratinozyten regulär in Richtung Epitheloberfläche differenzierten. Nach 2-3 Wochen expandierten diese Cluster und ersetzten umliegendes Epithel. Die Bildung dieser Cluster schien dabei von nur einer Zelle ausgegangen zu sein, wobei die Anzahl der initial eingebrachten Tumorzellen viel größer war als die eigentliche Clusterbildung. Darauf wurde geschlossen, dass clusterbildende Tumorzellen eine Subpopulation von Tumorzellen darstellen. Dies könnte ein anfänglicher Beweis für eine Form von Stamm- und Vorläufertumorzellen sein [96].

Es gibt wie oben aufgeführt, schon etliche Studien, die gezeigt haben, dass es möglich ist, ein Tumormodell zu generieren und somit plattenepithelkarzinomähnliche Modelle zu erstellen. Dabei konnte allerdings nirgends ein ausreichend ausgeprägtes, dreidimensionales Tumormodell generiert werden, das auf durch TE generierter gesunder Mundschleimhaut basiert. Zur Erforschung der Karzinogenese und der Wachstumsmechanismen eines PECA und in der Konsequenz der Therapiemöglichkeiten mittels Radiotherapie oder Chemotherapeutika spielt aber genau dies eine entscheidende Rolle. Auch, um die Reaktion der umgebenden gesunden, noch nicht mit Tumorzellen infiltrierten Mundschleimhaut während der Karzinogenese bzw. therapeutischer Maßnahmen einschätzen und erforschen zu können. Ein PECA zu generieren, eingebettet in zuvor generierter, gesunder Mundschleimhaut, welche aus primären Zellen auf der Matrix aus SIS/MUC aufgebaut wurde und dreidimensional wachsen und sich entwickeln kann, konnte in dieser Form noch nicht gezeigt werden.

1.5 Ziel der Arbeit

Trotz hochmoderner Technologien und ausgefeilter therapeutischer und rekonstruktiver chirurgischer Heilungsmethoden beträgt die 5-Jahres Überlebensrate bei der Diagnose PECA der Mundhöhle im Durchschnitt auch im Jahre 2017 nur 55 % und die Heilungsmethoden haben sich in den letzten drei Jahrzehnten kaum verbessert [100]. Umso wichtiger ist es deshalb, die Forschung voranzutreiben und ein aussagekräftiges Tumormodell zu etablieren,

Einleitung

das bei der Entwicklung neuer Therapieansätze schnell und sicher gute Ergebnisse liefert.

In dieser Studie soll mit Hilfe des TE ein in gesunder MSH integriertes 3D-Tumormodell generiert werden, welches bestmöglich die Analyse pathologischer Mechanismen im Tumorzentrum, sowie im Randbereich von gesundem und erkranktem Gewebe, und auch die Analyse der Auswirkungen neuartiger Chemotherapeutika auf gesunde und maligne Zellen in direkter Nachbarschaft ermöglicht – ohne Tierversuche. In der Konsequenz würde dies die Testung von neuen, effektiveren Chemotherapeutika, wie die Anwendung von Polymersomen – neuartiger „nanodelivery“-Systeme - oder Radiotherapien erlauben und es könnte in der Konsequenz ein erheblicher Fortschritt mit höheren Erfolgsaussichten der Therapieansätze erzielt werden.

Es wird ein Tumormodell generiert, in dem auf Basis eines gesunden MSH-Modells Tumorzellen eingebracht werden, um - genauso, wie die Tumorentstehung *in vivo* von statten gehen würde – Tumorentstehung und Tumorstadium in der Umgebung von gesunder MSH analysieren zu können. Das Modell basiert dabei auf einer Matrix aus dezellularisierter, porciner, small-intestinal-submucosa (SIS/MUC), die mit primären Fibroblasten, primären Keratinozyten und Tumorzellen der Tumorzelllinie FaDu besiedelt wird. Eine Besonderheit der FaDu-Zellen ist die vorangegangene Transduktion mit dem Lentivirus RFP – um die eingewanderten Zellen von gesunden Zellen unterscheiden zu können.

Für den Modellaufbau werden unterschiedliche Applikationsweisen der Tumorzellen evaluiert. Zuverlässigkeit des Tumorstadiums stehen bei den Versuchsaufbauten im Fokus und es werden drei Applikationsarten getestet. Einerseits werden Tumorzellen direkt mit primären gesunden Keratinozyten vermischt und auf die mit zuvor Fibroblasten besiedelte Matrix appliziert. Andererseits werden auf bereits vorkultivierte MSH-Modelle Spots aus Tumorzellen oder Tumorzellsphäroide in die Modelle integriert. Es sollen sowohl die optimale Konzentration der Tumorzellen, welche für die Entstehung von Tumoren nötig ist, als auch die geeignetste Applikationsmethode eruiert werden, um optimale Tumormodelle zuverlässig reproduzierbar ansetzen zu können.

2 Material

2.1 Gewebe und Zellen

Die Modelle in dieser Arbeit wurden sowohl mit Zelllinien, also auch mit primären Zellen, welche aus humanen Mundschleimhautbiopsien gewonnen wurden, aufgebaut. Als zelltragende Gewebeunterlage wurden porcine dezellularisierte Dünndärme verwendet (SIS/MUC).

2.1.1 Humanes Gewebe: Mundschleimhautbiopsien

Die Mundschleimhautbiopsien wurden von Chirurgen des Klinikums der Universität Würzburg, Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie Würzburg, bzw. von Chirurgen der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten der Uniklinik Würzburg entnommen. Die Proben wiesen eine Größe von ca. 5 x 10 mm bis ca. 10 x 20 mm auf und wurden ausschließlich von gesunden Patienten mit unversehrter Mundschleimhaut im Rahmen von kieferchirurgischen Umstellungsosteotomien, chirurgischen Zahnsanierungen, Metallentfernungen nach Frakturen oder chirurgischen Operationen nach Traumata entnommen. Die männlichen und weiblichen Patienten wiesen ein Alter zwischen 19 und 67 Jahren auf. Es erfolgte einen Tag präoperativ eine mündliche und schriftliche Aufklärung gemäß des Ethikvotums 182/10, 4. April 2011. Das exzidierte Gewebe wurde am Tag der Probeentnahme verarbeitet.

2.1.2 Verwendete Zellarten für den Aufbau von Tumormodellen

2.1.2.1 Primäre Zellen

Es wurden aus den Mundschleimhautbiopsien gewonnene primäre Fibroblasten und Keratinozyten verwendet. Dabei wurde darauf geachtet, dass in einem Modellversuch sowohl die Fibroblasten, als auch die Keratinozyten vom selben Biopsat abstammten.

2.1.2.2 RFP-transduzierte Zellen der Zelllinie FaDu

Für die Generierung von Tumormodellen wurden Zellen der Tumorzelllinie FaDu verwendet. Die Zellen wurden 1968 aus einem Plattenepithelkarzinom im Hypopharynx eines 56 Jahre alten indischen Mannes isoliert. Die Zellen wurden von der Arbeitsgruppe Ökogenotoxikologie unter der Leitung von Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen des Universitätsklinikums Würzburg zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden nachträglich mit dem Lentivirus RFP transduziert.

2.1.3 Porcines Gewebe: Small Intestinal Submucosa (SIS/MUC)

Die SIS/MUC wurde im Rahmen eines Dezellularisierungsprozesses aus dem Dünndarm von sechs Wochen alten Schweinen gewonnen. Dabei wurde das Gewebe mit einer Natriumdesoxycholat-haltigen Lösung gespült, azellularisiert und die Serosa an der Außenseite der Darmwand mechanisch entfernt. Nach diesem Prozess blieben lediglich die Submukosa und die luminale Mukosa übrig, welche als Zellträger für die Modellversuche dienen.

2.2 Geräte

Tabelle 4: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Absaugpumpe	VacuBoy VacuSafe	Integra Biosciences (Fernwald, D)
Abzug		Prutscher Laboratory Systems (Neudörfel, A)

Material

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklaven:		
Autoklav	Tecnoclave	Biomedis (Gießen, D)
Tischautoklav	DX-45	Systemec (Wettenberg, D)
Dampfsterilisator	Varioclave	
		HP Medizintechnik (Oberschleißheim, D)
Brutschrank	Haeraeus BBD 6220	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D)
Dampfkocher	MultiGourmet	Braun (Kronberg, D)
FACS-Messsystem	BD FACSCalibur™	BD GmbH (East Rutherford, USA)
Flockeneisbetreiber	AF 89	Scotsman (Mailand, I)
Flüssigstickstofftank, -180 °C	MVE 815 P-190	German-Cryo (Jüchen, D)
Gefrierbehälter	Mr. Frosty	VWR (Darmstadt, D)
Gefrierschrank, -20 °C	Comfort	Liebherr (Biberach a. d. Riss)
Gefrierschrank, -80 °C	HFU586 Basic	Heraeus (Hanau, D)
Gewebeeinbettautomat	Microm STP 120	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Heißluftsterilisator		Memmert (Schwabach, D)
Kassettendrucker	VCP 5001	Vogel Medizintechnik (Gießen, D)
Kühlraum	4 °C	Genheimer (Höchberg, D)

Material

Gerät	Modell	Hersteller
Kühlschrank	4 °C MedLine	Liebherr (Biberach a. d. Riss, D)
Laborspülmaschine	Desinfector Automatic G7735	Miele (Gütersloh, D)
Mikroskope:		
Fluoreszenzmikroskop	Biorevo BZ-9000	Keyence (Neu-Isenburg, D)
Lichtmikroskop	Axio Vert.A1	Carl Zeiss (Oberkochen, D)
Lichtmikroskop	Evos XL	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D)
Modulares Einbettssystem	Kühlplatte EG1150 C Paraffinausgießstation EG1150 H	Leica (Wetzlar, D)
Multistep Pipette	Multipipette M4	Eppendorf (Hamburg, D)
Objektträger Schnelltrockner	TDO 66	Medite GmbH (Burgdorf, D)
Objektträgerdrucker	VSP5001	Vogel Medizintechnik (Gießen, D)
Paraffinstreckbad	1052	GFL (Burgwedel, D)
Pipetten	Research plus 10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipettierhilfe	Accu-jet pro	Brand (Wertheim, D)
Schlittenmikrotom	SM2010 R	Leica (Wetzlar, D)

Material

Gerät	Modell	Hersteller
Septophag	22	Hesse (Emmerich, D)
Sicherheitswerkbank	Safe 2020	Thermo Fischer Scientific (Dreieich, D)
Vortex	Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Waagen:		
Analysenwaage	PFB 1200-2	Kern (Balingen-Frommern, D)
Mikrowaage	Cubis MSE3.6P-000-DM	Sartorius (Göttingen, D)
Wasserbad	WNE10	Memmert (Schwabach, D)
Wasserbad	EH 4.1	Ika (Staufen, D)
Zählkammer	Neubauer	Hartenstein (Würzburg, D)
Zellzählgerät	NucleoCounter NC-200	Chemometec (Allerod, Dänemark)
Zentrifugen:		
Tischzentrifuge	Heraeus Multifuge X3R	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D)
Minizentrifuge	Rotilabo	Carl Roth (Karlsruhe)

2.3 Labormaterialien

Tabelle 5: Labormaterialien

Labormaterial	Hersteller
Bechergläser	Schott (Mainz, D)
Blockförmchen	Labonord (Mönchengladbach, D)
Färbetröge	Mercateo (München, D)
Fettstift	Dako (Hamburg)
Feuchtekkammer	Lehrstuhl für Tissue Engineering und regenerative Medizin (Würzburg, D)
Glasküvetten	Mercateo (München, D)
Hand-Stückzähler	neoLab (Heidelberg, D)
Kälteschutz-Handschuhe	VWR (Darmstadt, D)
Kunststoffbechergläser	Brand (Wertheim, D)
Kunststoff-Zellkronen Minusheets 13mm	Minucells & Minutissue Vertriebs GmbH (Bad Abbach, D)
Laborglasflaschen	Schott (Mainz, D)
Löffelspatel	Hartenstein (Würzburg, D)
Messzylinder	Hirschmann (Eberstadt, D)
Objektträgerhalter (Glas, Edelstahl)	Mercateo (München, D)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim, D)
Pinzetten	Assistant (Sondheim, D)
Feine Pinzetten	FST (Heidelberg, D)
Reagenzglasständer	neoLab (Heidelberg, D)
Schutzbrille	neoLab (Heidelberg, D)
Skapellhalter	Bayha (Tuttlingen, D)

Labormaterial	Hersteller
Sprayflasche	Hartenstein (Würzburg, D)
Trichter	Hartenstein (Würzburg, D)

2.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Abfallbeutel	Hartenstein (Würzburg, D)
Aluminiumfolie	Carl Roth (Karlsruhe, D)
Combitips Plus für Multistep Pipette	Eppendorf (Hamburg, D)
Deckgläser 24 x 60 mm	Menzel-Gläser (Braunschweig, D)
Einbettfilterpapier für Einbettkassetten	Labonord (Mönchengladbach, D)
Einbettkassetten	Klinipath (Duiven, VL)
Einwegpipetten 5 ml, 10ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Faltenfilterpapier	Hartenstein (Würzburg, D)
Kryoröhrchen 1,8 ml	Nunc (Wiesbaden, D)
Mikrotomklinge S35	Pmf medikal (Köln, D)
Nitrilhandschuhe	Medline (Kleve, D)
Objektträger	
Polysine	Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D)
SuperFrost Plus	R. Langenbrinck (Emmendingen, D)
Papiertücher	IGEFA (Ahrensfelde, D)
Parafilm M	Carl Roth (Karlsruhe, D)

Material

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Petrischalen 60 x 15 mm, 100 x 20 mm	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Pipettenspitzen 0,5-10 µl, 10-100 µl, 10-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf (Hamburg, D)
Reagiergefäß 1,5 ml Safeseal	Sarstedt (Nürnbrecht, D)
Septophagenbeutel	Porod (Frauenhofen, A)
Skalpellklingen, rund	Bayha (Tuttlingen, D)
Spritzen 5 ml, 10 ml	Braun (Melsungen, D)
Sterilfilter 0,2 µm, 0,45 µm	Sartorius Stedium Biotech (Göttingen, D)
Waagschale	Hartenstein (Würzburg, D)
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ²	TTP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, CH)
25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Zellkulturplatten 6-well, 12-well, 24-well, 96-well	TTP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, CH)
24-well Brand-Plate für Inserts	Brand Life Science (Wertheim, D)
Zellzählkassette Via1-Cassette	Chemometec (Allerød, Dänemark)
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)

2.5 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 7: Chemikalien und Lösungen

Substanz	Hersteller	Bestell-Nr.
Accutase	Life Technologies (Darmstadt, D)	A11105-01
Aceton	Sigma-Aldrich (München, D)	650501
Agarose-Gel Pulver	Carl Roth (Karlsruhe, D)	3810.1
Aluminiumkaliumsulfat- Dodecahydrat	VWR (Darmstadt, D)	1.01047.1000
Antikörper- Verdünnungslösung	DCS Innovative Diagnostik-Systeme (Hamburg, D)	1.01047.1000
Ascorbyl-2-phosphat	Sigma-Aldrich (München, D)	A8960
Calciumchlorid	VWR (Darmstadt, D)	1.02391.1000
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma-Aldrich (München, D)	C7902-500G
Chloralhydrat	Merck (Darmstadt, D)	1.002425.1000
Descosept	Dr. Schumacher (Malsfeld, D)	00311L-100
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (München, D)	D8418,472301
Dinatriumhydrogenphosphat- Dihydrat	Merck (Darmstadt, D)	1.06580.1000
Dispase II	Life-Technologies (Darmstadt, D)	1.06580.1000
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS ⁻)	Sigma-Aldrich (München, D)	D8537
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS ⁺)	Sigma-Aldrich (München, D)	D8537D8662

Material

Substanz	Hersteller	Bestell-Nr.
Entellan	Merck (Darmstadt, D)	1.07960.0500
Eosin	Sigma-Aldrich (München, D)	861006
Essigsäure	Sigma-Aldrich (München, D)	A6283-2.5L
Ethanol 96 %, vergällt	Carl Roth (Karlsruhe, D)	T171.4
Ethanol absolut	Carl Roth (Karlsruhe, D)	9065.4
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Dinatriumsalz-Dihydrat	Sigma-Aldrich (München, D)	E5134-1KG
Fetal Calf Serum (FCS)	Bio&Sell (Feucht, D)	FCS.ADD.0500
Fluoromount-G™ with DAPI	eBioscience, Thermo Fisher Scientific (Dreieich, D)	00-4959-52
Hämatoxylin	Carl Roth (Karlsruhe, D)	3861.1
Humaner Keratinozytenwachstumsfaktor (HKGS)	Life Technologies (Darmstadt, D)	S0015
Incidin Plus	Ecolab (Monheim a. Rh., D)	3011520
Isopropanol	Carl Roth (Karlsruhe, D)	2316.5
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt, D)	1.04936.1000
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, D)	1.04873.1000
Keratinocate Growth Factor (KGF)	Sigma-Aldrich (München, D)	K1757-10UG
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Carl Roth (Karlsruhe, D)	HN03.3

Material

Substanz	Hersteller	Bestell-Nr.
Natriumchlorid	Carl Roth (Karlsruhe, D)	HN00.3
Natriumhydroxid-Pellets	Carl Roth (Karlsruhe, D)	6711.3
Natriumiodat	AppliChem (Darmstadt, D)	A5072,0025
Natriumpyruvat (100 mM)	Life Technologies (Darmstadt, D)	11360-039
Nicht-essenzielle Aminosäuren (NEAA)	Invitrogen (Darmstadt, D)	11140-035
Paraffin	Carl-Roth (Karlsruhe, D)	6642.6
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ ml/ 10.00 µg/ml	Life Technologies (Darmstadt, D)	15140-122
Puromycin	InvivoGen (Toulouse, F)	58-58-2
Polybrene	Sigma-Aldrich (München, D)	H9268
Roti®-Histofix 4 %	Carl Roth (Karlsruhe, D)	P087.5
Trypanblau (0,4 %)	Sigma-Aldrich (München, D)	T8154
Trypsin/EDTA (0,5 %)	Life Technologies (Darmstadt, D)	15400-054
Tween-20	Sigma-Aldrich (München, D)	P7949
Wasserstoffperoxid (30 %)	Sigma-Aldrich (München, D)	216763
Xylol	Carl Roth (Karlsruhe, D)	9713.3
Zitronensäure-Monohydrat	VWR (Darmstadt, D)	1.00244.100

2.6 Medien, Lösungen und Zusätze für die Zellkultur

Tabelle 8: Medien für die Zellkultur

Medium	Zusammensetzung		
EpiLife®Medium 1 (E1)	500 ml	EpiLife®Medium (Life technologies MEPI500 CA): + 60 µM Calciumchlorid	
	+	5 ml Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS) (Life Technologies S-001-5):	
		0,2 % v/v Bovine Pituitary Extract	
		1 µg/ml Insuline-like Growth Factor-I (rekomb. hum.)	
		0,18 µg/ml Hydrocortison	
		5 µg/ml Transferrin (bovin)	
		0,2 ng/ml Epidermal Growth Factor (hum.)	
	+	1 % v/v Penicillin/Streptomycin	
	EpiLife®Medium 2 (E2)	500 ml	EpiLife®Medium (Life technologies MEPI500 CA): + 60 µM Calciumchlorid
		+	5 ml Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS) (Life Technologies S-001-5):
		0,2 % v/v Bovine Pituitary Extract	
		1 µg/ml Insuline-like Growth Factor-I (rekomb. hum.)	
		0,18 µg/ml Hydrocortison	
		5 µg/ml Transferrin (bovin)	
		0,2 ng/ml Epidermal Growth Factor (hum.)	
+		2,4 ml 300 mM Calciumchlorid	
+		1 % v/v Penicillin/Streptomycin	

Material

Medium	Zusammensetzung	
ALI-Medium		
EpiLife®Medium 3 (E3)	500 ml	EpiLife®Medium (Life technologies MEPI500 CA): + 60 µM Calciumchlorid
	+ 5 ml	Human Keratinocyte Growth Supplement (HKGS) (Life Technologies S-001-5):
	0,2 % v/v	Bovine Pituitary Extract
	1 µg/ml	Insuline-like Growth Factor-I (rekomb. hum.)
	0,18 µg/ml	Hydrocortison
	5 µg/ml	Transferrin (bovin)
	0,2 ng/ml	Epidermal Growth Factor (hum.)
	+ 2,4 ml	300 mM Calciumchlorid
	+ 500 µl	Keratinocyte Growth Factor
	+ 500 µl	Ascorbylphosphat
	+ 1 % v/v	Penicillin/Streptomycin
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	500 ml	DMEM + GlutaMAX™-I (Life Technologies 32430-027): GlutaMAX™ Supplement (L-Ala-L-Gln) Erhöhte D-Glukosekonzentration 4,5 g/l
	+ 25 mM	HEPES-Puffer
	+ 1 %	100 mM Natriumpyruvat
	+ 10 %	FCS
	+ 1 %	Penicillin/Streptomycin

Material

Medium	Zusammensetzung	
RPMI Medium 1640	500 ml	RPMI Medium 1640 (Life Technologies 11875085): 11,1 mM D-Glucose
	+	1 % Natriumpyruvat
	+	1 % NEAA
	+	1 % Penicillin/Streptomycin
	+	10 % FCS

Tabelle 9: Lösungen für die Zellkultur

Lösung	Zusammensetzung	
Ascorbylphosphat-Lösung	73 mg/l	Ascorbylphosphat in E1-Medium sterilfiltrieren Lagerung al 500 µl Aliquot bei -20 °C
Calciumchlorid-Lösung CaCl ₂ Lösung 300mM	44 mg/ml	Calciumchlorid-Dihydrat in Reinstwasser sterilfiltrieren Lagerung als 5 ml Aliquot bei 4 °C
Dispase II (2U/ml)		400 mg Dispase-Pulver in 100 ml DPBS ⁻ (c = 2 U/ml) sterilfiltrieren Lagerung als 5 ml-Aliquot bei -20 °C
DPBS ⁻ /EDTA-Stammlösung (c = 0,54 mol/l)	0,2 g/l	EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat in DPBS ⁻ sterilfiltrieren Lagerung als 500 µl-Aliquot bei -20 °C

Material

Lösung	Zusammensetzung
0,05 % Trypsin/EDTA- Gebrauchslösung (0,05 %)	1:10 10 % Trypsin/EDTA Stammlösung 10x in PBS ⁻ Trypsin/EDTA- Stammlösung (0,5 %) mit DPBS ⁻ /EDTA verdünnt Lagerung bei 4 °C
Waschpuffer (DPBS ⁻ /EDTA- Gebrauchslösung, c = 0,54 mmol/l)	1:1000 DPBS ⁻ /EDTA- Stammlösung (c = 0,54 mol/l) in DPBS ⁻ Lagerung bei 4 °C

2.7 Lösungen für die Histologie

Tabelle 10: Lösungen für die Histologie

Lösung	Zusammensetzung
Eosin	10 mg/ml Eosin in VE-Wasser Lagerung bei Raumtemperatur
Hämalaun (Mayer)	1,2 g/l Hämatoxylin 0,2 g/l Natriumiodat 20 g/l Aluminiumkaliumsulfat- Dodecahydrat 20 g/l Chloralhydrat 1 g/l Zitronensäure in VE-Wasser Lagerung bei Raumtemperatur (4 Wochen Reifung bis Gebrauch)

2.8 Lösungen für die Immunhistologie

2.8.1 Antikörper

Tabelle 11: Antikörper

Antikörper	Spezies	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
CK10	Mouse	anti-human	1:100	DAKO Cytomation (Eching, D) M7002
CK14	Rabbit	anti-human	1:2000	Sigma-Aldrich (München, D) HPA023040
Ki67	Rabbit	anti-human	1:100	Abcam (Camebridge, E) ab16667
Kollagen 4	Rabbit	anti-human	1:500	Abcam (Camebridge, E) ab6586
p53	Mouse	anti-human	1:50	DAKO Cytomation (Eching, D) M7001
Vimentin	Mouse	Anti-human	1:2000	Abcam (Camebridge, E) ab92547

2.8.2 Immunhistochemie-Kit

Tabelle 12: Immunhistochemie-Kit

IHC-Kit	Hersteller	Bestell-Nr.
SuperVision 2 HRP	DCS Innovative Diagnostik-Systeme (Hamburg, D)	PD000KIT

2.8.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 13: Puffer und Lösungen für die Immunhistologie

Lösung	Zusammensetzung	
Citratpuffer- Gebrauchslösung (1 x)	1:10	Citratpuffer-Stammlösung mit VE- Wasser verdünnt Lagerung bei Raumtemperatur
Citratpuffer- Stammlösung (10 x)	42 g/l 17,6 g/l	Zitronensäure-Monohydrat Natriumhydroxyd-Pellets in VE- Wasser pH = 6 Lagerung bei Raumtemperatur
DAB-Chromogen	1 Tropfen Je ml	DAB-Konzentrat DAB-Puffer Lagerung bei Raumtemperatur
Peroxidase- Blockierungslösung (3 %)	1:10	Wasserstoffperoxid 30 % mit VE-Wasser verdünnt Lagerung bei Raumtemperatur

Material

Lösung	Zusammensetzung	
Phosphate Buffered Saline (PBS ⁻)-Stammlösung	8 g/l	Natriumchlorid
	0,2 g/l	Kaliumchlorid
	0,2 g/l	Kaliumdihydrogenphosphat
	1,15 g/l	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
		in Reinstwasser pH = 7,2 Lagerung in 1l-Flaschen bei 4 °C
Phosphate Buffered Saline (PBS ⁺)-Stammlösung	8 g/l	Natriumchlorid
	0,2 g/l	Kaliumchlorid
	0,2 g/l	Kaliumdihydrogenphosphat
	1,15 g/l	Dinatriumhydrogenphosphat-Dihydrat
	0,1 g/l	Magnesiumchlorid-Hexahydrat
	0,1 g/l	Calciumchlorid
		in Reinstwasser pH = 7,2 Lagerung in 1l-Flaschen bei 4 °C
Pronase	1 mg/ml	Pronase in VE-Wasser Lagerung als 1 ml Aliquots bei -20 °C
Tris-EDTA-Puffer-Gebrauchslösung (1 x)		
Tris-EDTA-Puffer-Stammlösung (10 x)		

Lösung	Zusammensetzung
Waschpuffer (PBS ⁻ -T)	1:10 DPBS–Stammlösung mit VE-Wasser verdünnt
	0,5 % v/v Tween-20
	Lagerung bei Raumtemperatur

2.9 Software

Tabelle 14: Software

Software	Verwendung	Hersteller
BZ-II Viewer BZ-II Analyser	Mikroskopierprogramme	Keyence (Neu-Isenburg, D)
Endnote	Literaturverwaltungsprogramm	Thomson Reuters (Philadelphia, USA)
GraphPad Prism 6	GraphPad Software; La Jolla, Vereinigte Staaten von Amerika	GraphPad Prism 6
Office Excel 2016	Tabellenkalkulationsprogramm	Microsoft (Unterschleißheim, D)
Office Power Point 2016	Präsentationsprogramm	Microsoft (Unterschleißheim, D)
Office Visio 2010	Graphikgestaltungsprogramm	Microsoft (Unterschleißheim, D)
Office Word 2016	Textverarbeitungsprogramm	Microsoft (Unterschleißheim, D)

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Alle Zellen wurden unter Standardbedingungen (37 °C, 5 % CO₂) in Zellkulturflaschen kultiviert, die zellspezifischen Medien (s. Tabelle 15) und Enzyme bei Verwendung stets auf 37 °C vorgewärmt und dreimal die Woche gewechselt.

Tabelle 15: zellspezifische Medien

Zellart	zellspezifisches Medium
Primäre Fibroblasten	EpiLife E1
Primäre Keratinozyten	DMEM + GlutaMAX
FaDu-Zellen	RPMI1640

Das Arbeiten unter der Sterilbank begann 15 min nach Einschalten der selbigen und erforderte eine Desinfektion mit Descosept AF vor und nach den Arbeitsvorgängen, um möglichst keimfreie Arbeitsbedingungen gewährleisten zu können. Ebenso war das Desinfizieren aller benötigten Gegenstände, sowie der aus dem Wasserbad entnommenen Medienbehältnisse mit Descosept AF vor dem Benutzen notwendig.

3.1.1 Ablösen von Zellen

Das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen erfolgte, um beispielsweise SIS/MUC-MSH-Modelle zu generieren oder aber auch einzufrieren, sollten die Zellen keine akute Verwendung finden.

3.1.1.1 *Keratinocyten*

Zuerst erfolgte die Absaugung des verbrauchten Mediums mittels einer sterilen Pasteurpipette und daraufhin eine Waschung mit PBS-/EDTA-Lösung. Zur Ablösung der Keratinocyten mit dem Enzym Accutase wurden 0,07 ml/cm² des Enzyms hinzugefügt und für 20 min im Inkubator bei 37 °C belassen. Nach Ablauf der Reaktionszeit des Enzyms wurde die Suspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt, der Boden der Flasche nochmals mit PBS-/EDTA-Waschpuffer gespült und ebenfalls in das Röhrchen pipettiert. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 300 g für 5 min. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit zellspezifischem Medium resuspendiert, ein Aliquot für die Zellzählung entnommen und die Zellsuspension in gewünschter Zellzahl in die nächstgrößere Zellkulturflasche ausgesät.

3.1.1.2 *Fibroblasten und FaDu-Zelllinie*

Zuerst erfolgte die Absaugung des verbrauchten Mediums mittels einer sterilen Pasteurpipette und eine Waschung mit PBS-/EDTA-Lösung. Danach wurden 0,07 ml/cm² des Ablösepuffers Trypsin/EDTA hinzugegeben und im Inkubator für 3-5 min bei 37 °C inkubiert. Die Inkubationszeit sollte dabei 5 Minuten nicht überschreiten, da sonst eine Zellschädigung nicht mehr ausgeschlossen werden kann. Nach dieser Einwirkzeit wurde die Zellkulturflasche aus dem Inkubator entnommen und im Mikroskop geprüft, ob alle Zellen ordnungsgemäß abgelöst waren. War dies nicht der Fall, erzielten kleine Stöße gegen die Flasche die mechanische Ablösung der restlichen anhaftenden Zellen. Die Zugabe von 10 % FCS stoppte die Enzymreaktion ab und es folgten die Arbeitsschritte gemäß 3.1.1.1. Prinzipiell wurde bei Fibroblasten die komplette Zellsuspension entnommen und diese gleichmäßig von T25-Zellkulturflaschen auf T75-Zellkulturflaschen (bzw. von T75 auf T150-Zellkulturflaschen) verteilt. FaDu-Zellen wurden in einer Dichte von 2600 Zellen/cm² ausgesät und es befand sich bei allen Zellarten stets eine Menge von 0,12 ml/cm² zellspezifischem Medium in der Flasche.

3.1.2 Zellzählung mit Trypanblau

Die Zellzählung erfolgte mittels der Neubauer Zählkammer und Trypanblau, einem anionischen Diazofarbstoff. Dabei nehmen intakte Zellen den Farbstoff nicht auf. Tote Zellen werden durch die blaue Färbung sichtbar, welche durch Eindringen des Farbstoffes in die beschädigten Zellen entsteht. Aufgrund der Zytotoxizität des Farbstoffes ist eine möglichst zeitnahe Zellzählung erforderlich, da ansonsten verfälschte Zellzahlergebnisse entstehen. Nach Resuspension des Pellets mit einem geeigneten Volumen von zellspezifischem Medium wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau 1:1 verdünnt und auf die Neubauer-Zählkammer gegeben.

Die Berechnung der Zellzahl erfolgte mit folgender Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{4} * \text{Verdünnungsfaktor} * V_{(\text{Zellsuspension})} * \text{Kammerfaktor} = \text{Zellzahl}$$

Verdünnungsfaktor: 2, da eine 1:1 Verdünnung mit Trypanblau erfolgte

$V_{(\text{Zellsuspension})}$: Volumen der gesamten Zellsuspension in ml

Kammerfaktor: 10^4

3.1.2.1 Population Doublings (PD) und Population Doubling Time (PDT)

Mit der Berechnung von sogenannten Population Doublings (PD) und der Population Doubling Time (PDT) kann auf die Zeitspanne, die benötigt wird bis sich die Anzahl kultivierter Zellen verdoppelt, rückgeschlossen werden.

Dafür kamen allgemeine Formeln zum Einsatz, wie auch in der Arbeit von z.B. Izumi et al. 1999 [38].

$$PD = \left[\log \left(\frac{N}{N_0} \right) \right] x [\log 2]^{-1}$$

Methoden

$$PDT = \frac{I}{PD}$$

I:	Intervall (Tage) zwischen der Passagierung
N:	Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt des Ablösens
N ₀ :	Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt des Aussäehens
PD:	Population doubling
PDT:	Population doubling time

3.1.3 Medienwechsel

Das zellspezifische Medium befand sich zum Erwärmen bei 37 °C im Wasserbad für ca. 15 min. Nach der Absaugung des verbrauchten Mediums mittels steriler Pasteurpipette wurden jeweils 0,12 ml/cm² frisches Medium hinzugeführt. Der Medienwechsel erfolgte dreimal in der Woche.

3.1.4 Einfrieren von Zellen

Vor dem Einfrieren wurden die Zellen entsprechend der Zellart von dem Boden der Zellkulturflaschen abgelöst (s. 3.1.1) und mittels Neubauer-Zählkammer gezählt. Richtwert der Anzahl an eingefrorenen Zellen in Kryoröhrchen liegt bei 10⁶ Zellen bei einem Gesamtvolumen von 1 ml Flüssigkeit. Ansonsten ist durch den Verlust an Zellen während des Einfrier-, bzw. Auftauvorgangs nicht mehr gewährleistet, genügend vitale Zellen in eine Zellkulturflasche wieder aussäen zu können.

3.1.4.1 Keratinozyten

Nach dem Vorlegen von jeweils 10 % DMSO, das während des Einfrierprozesses die Bildung von Eiskristallen verhindert, wurden 900 µl der Zellsuspension in das zuvor beschriftete Kryoröhrchen aliquotiert. Aufgrund der Zytotoxizität des DMSO bei Raumtemperatur ist zügiges Arbeiten erforderlich. Die Kryoröhrchen sollten

Methoden

möglichst schnell in einen Mr. Frosty verlagert und bei -80 °C für 24 h weggefroren werden. Nach Ablauf dieses Tages können die Kryoröhrchen für weitere 3 Monate im -80 °C Gefrierschrank belassen oder in flüssigen Stickstoff bei -196 °C umgelagert werden.

3.1.4.2 *Fibroblasten und FaDu-Zellen*

Der Vorgang entspricht dem des Einfrierens der Keratinozyten. Allerdings erfolgte vor Aliquotierung der Zellsuspension in das Kryoröhrchen, das bereits mit 10 % DMSO gefüllt ist, noch eine zusätzliche Gabe von 10 % FCS.

3.1.5 Auftauen von Zellen

Nachdem das zellspezifische Medium bei 37 °C im Wasserbad für ca. 15 min vorgewärmt worden war, wurden 9 ml des Mediums in einem Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Der Entnahme des Kryoröhrchens mit den aufzutauenden Zellen aus dem Stickstofftank bzw. der Gefriertruhe (-80 °C) folgte die Bereitstellung in einer mit Eis gefüllten Styroporbox. Zu dem zum Auftauen aus dem Eis entnommenen Kryoröhrchen wurde jeweils eine kleine Menge vorgewärmtes Medium mit einer Eppendorf-Pipette in das Kryoröhrchen pipettiert und dann die allmählich auftauende Zellsuspension in das Zentrifugenröhrchen zurück überführt. Dieser Vorgang wiederholte sich solange, bis die komplette Zellsuspension aufgetaut war und in die 9 ml Medium überführt war. Anschließend wurde die im Medium gelöste Zellsuspension zentrifugiert (300 g, 5 min, Raumtemperatur), mit 2 ml Medium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt.

3.2 Methode zur Isolierung primärer Zellen aus MSH-Biopsaten

3.2.1 Vorbereitung von MSH-Biopsaten zur Isolierung

Zuerst wurde eine 2 U-DispaseLösung im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Das Biopsat lagerte in zellspezifischem E1-Medium im Kühlschrank bei 4 °C. Nach der Entnahme aus dem Zentrifugenröhrchen und der Überführung in eine Kulturschale mit einem Durchmesser von 35 mm erfolgte ein Waschvorgang mit PBS⁺-Lösung. Nach Absaugung der Waschlösung mit einer sterilen Pasteurpipette wiederholte sich dieser Vorgang dreimal. Anschließend folgte eine Waschung mit PBS⁻-Lösung und erneutes Absaugen der Lösung mit einer sterilen Pasteurpipette. Handelt es sich um eine größere Biopsie von mehr als 10 mm Durchmesser, musste das Biopsat in ca. 1-2 mm dicke Streifen geschnitten werden und anschließend mit ca. 4 ml DispaseLösung vollständig bedeckt sein. Die Kulturschale wurde mittels Parafilm abgedichtet und für 14-16 h im Kühlschrank bei (4 °C) belassen.

3.2.2 Isolation primärer Keratinozyten

Das zellspezifische Medium, PBS⁺-Lösung, PBS⁻-Lösung, Trypsin/EDTA und FCS wärmten im Wasserbad bei 37 °C vor. Nach der erforderlichen Inkubationszeit von 14-16 h wurde das Biopsat der DispaseLösung entnommen. Es konnte nun mit zwei feinen, zuvor mit Descosept AF desinfizierten Pinzetten die Epidermis von der Dermis mechanisch abgelöst werden. Es folgte ein Überführen und Waschen sowohl des Epithels, als auch des Bindegewebes in eine frische mit PBS⁺ gefüllte Kulturschale mit einem Durchmesser von 60 mm. Die Lösung wurde anschließend vorsichtig mit einer Einmalpipette abgesaugt und es schloss sich ein erneuter Waschvorgang mit PBS⁻ an. Nach der Zerteilung der Epidermis mit einem sterilen Skalpell in ca. 1 mm große Stücke, wurden die Stücke in ein Zentrifugenröhrchen mit 5 ml Trypsin/EDTA überführt und die Kulturschale mit weiteren 5 ml Trypsin/EDTA gespült und ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt. Bei Bedarf konnte mit ca. 15 ml PBS⁻ nachgespült

Methoden

werden, um den Verlust von kleinen in der Schale zurückgebliebenen Epidermisstückchen zu vermeiden. Nach Inkubation des Inhalts des Röhrchens unter Schwenken im Wasserbad bei 37 °C für 5 min und nach Ablauf der Zeit wurde mit 1 ml FCS der enzymatische Verdauungsvorgang gestoppt. Es folgte eine fünfminütige Phase des schnellen Auf- und Abpipettierens, um weitere Zellen aus dem Zellverband mechanisch herauszulösen. Nach dem Zentrifugieren bei 300 g für 5 min wurden die Epidermisstückchen nun mit 2 ml zellspezifischem Medium resuspendiert und in eine T25 Zellkulturflasche bei insgesamt 4 ml Medium ausgesät. Nach ein bis zwei Tagen waren auf dem Boden der Flasche ansiedelnde Zellinseln zu erkennen. Bei einer Konfluenz von ca. 70-80 % erfolgte ein Splitting in je zwei T75 Zellkulturflaschen. Sobald die Zellen wieder eine Konfluenz von 70 % - 80 % erreicht hatten, konnten diese weggefroren und erst für den Modellaufbau wieder aufgetaut werden. Bei Passage 2 sollten die Zellen weggefroren werden, um ein Differenzieren zu vermeiden. Der Medienwechsel erfolgte alle 2-3 Tage.

3.2.3 Isolation primärer Fibroblasten

Der zuvor mechanisch abgetrennte bindegewebige Lamina propria Teil wurde je einmal mit PBS⁺ und PBS⁻ gewaschen und mit einem sterilen Skalpell in Stücke von 2-3 mm Durchmesser zerteilt. Danach erfolgte die Überführung des Bindegewebes mittels einer feinen Pinzette in T25 Zellkulturflaschen. Das Gewebe sollte dabei möglichst mittig und mit einem Abstand von ca. 3 mm zueinander positioniert sein. Um ein Abheben vom Boden der Flasche zu vermeiden, wurden zunächst 2 ml zellspezifisches Medium in die Flasche zugegeben. Nach dem Anhaften der bindegewebigen Biopsatanteile am Boden der Zellkulturflasche wurden nach ca. 4 h weitere 2 ml Medium nachgelegt. Das Anhaften des Bindegewebes war zum Auswachsen der Fibroblasten, welches nach 3-7 Tagen erfolgte, unbedingt erforderlich.

3.3 Transduktion von Lentiviren auf FaDu-Zellen

Im Fachgebiet der Genetik bedeutet der Begriff Transduktion die Infektion von Zielzellen mit viralen Vektoren, dabei findet ein Gentransfer statt. Durch die Integration des RFPs (red fluorescent protein) in die FaDu Zellen konnte eine Eigenfluoreszenz dieser Zellen erreicht werden, durch die die Detektion der Position von Tumorzellen, die in die OMÄ eingebracht wurden, unter dem Fluoreszenzmikroskop erheblich vereinfacht werden sollte.

Während der Durchführung der Transduktion war eine genaue Einhaltung der Sicherheitsrichtlinien gemäß der Sicherheitsstufe S2 einzuhalten.

3.3.1 Phase der RFP-Transduktion auf FaDu-Zellen

Zuerst erfolgte das Aussäen von 5×10^4 FaDu-Zellen pro Well in je 2 6-well-Platten und die Inkubation über Nacht. Am Tag der Transduktion bestand eine Konfluenz von 20-30 %. Aufgrund unbekannter Titerangaben der einzelnen Eppendorf Reaktionsgefäße mit dem RFP-Virus kamen je drei unterschiedliche Eppendorf Reaktionsgefäße mit den drei unterschiedlichen Daten 22.11.2015, 18.04.2015 und 25.10.2013 zur Anwendung, um einen wahrscheinlicheren Erfolg des Transduktionsvorganges gewährleisten zu können. Die Beurteilung der Wirksamkeit der Viren fand im Zeitverlauf anhand der Bewertung der Intensität der Fluoreszenz und die Anzahl der fluoreszierenden Zellen statt.

Es wurden je 500 µl Virussuspension der Daten 22.11 und 18.04 und 250 µl Virussuspension aus dem Eppendorf Reaktionsgefäß mit dem Datum 25.10. in je 2 Wells der 6-Well-Platte pipettiert. Die Erleichterung des Eindringens des Virus in die Zellen durch die Veränderung deren Oberflächenstruktur konnte durch die Applikation von zusätzlich 0,5 µl Polybrene pro Well erzielt werden. Die Zellen und der Virusüberstand inkubierten über Nacht bei 37 °C. Am Vormittag des darauffolgenden Tages erfolgte die Applikation von zusätzlich 2 ml zell-spezifischem Medium pro Well, wobei der Virusüberstand auf den Zellen weiterhin belassen werden konnte. Erst am dritten Tag nach Virusapplikation wurde der komplette Virusüberstand abgenommen und durch neues

zellspezifisches Medium mit 2 ml pro Well ersetzt. Es erfolgte eine erste mikroskopische Kontrolle am Fluoreszenzmikroskop mit der Wellenlänge von 555 nm.

An Tag 5 nach der Transduktion wurden die Zellen das erste Mal mit PBS⁺ gewaschen und die Medien gewechselt. Der Medienwechsel der transduzierten Zellen fand alle 2-3 Tage in Kombination mit einem Waschvorgang mit PBS⁺ statt, um den Virus auszuwaschen. Bei einer Konfluenz von 80-90 % erfolgte ein Splitting der Zellen und das Aussäen in einer Dichte von 2600 Zellen/cm² in Bakterenschalen mit 10 cm Durchmesser und einer Mediummenge von 0,12 ml/cm².

3.3.2 Phase der Selektion transduzierter von nicht-transduzierten Zellen

Nicht alle Zellen, die mit dem Virus über das Medium in Kontakt kommen, können erfolgreich mit dem RFP-Lentivirus transduziert werden. Dafür muss eine Selektion der transduzierten von nicht-transduzierten FaDu-Zellen mittels des ABs Puromycin durchgeführt werden. Parallel dazu wurden hierfür in 12-Well Platten erneut je 5×10^4 nicht transduzierte FaDu-Zellen in 2 ml Medium ausgesät, um vorab einen Selektions-Test mit Puromycin durchführen zu können. Dadurch konnte festgestellt werden, welche AB-Konzentration für die FaDu-Zellen geeignet und ab welcher AB-Konzentration die Vitalität der Zellen gefährdet war. Somit konnte vermieden werden, die bereits transduzierten Zellen durch eine zu hohe AB-Konzentration abzutöten und zu verlieren. Es wurden in die einzelnen Wells folgende Puromycinkonzentrationen appliziert: 0 µg/ml, 0,03 µg/ml, 0,06 µg/ml, 0,125 µg/ml, 0,25 µg/ml, 0,5 µg/ml, 1,0 µg/ml, 2,0 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5,0 µg/ml, 10,0 µg/ml Puromycin. Nach der Inkubation der Zellen über Nacht erfolgte die Applikation von Puromycin in den oben genannten unterschiedlichen Konzentrationen und eine Kontrolle an Tag 1 und Tag 2 nach AB-Applikation hinsichtlich Konfluenz und Morphologie.

Nachdem über mikroskopische Kontrolle nach Beurteilung von Konfluenz und Morphologie festgestellt worden war, wie die Zellen auf bestimmte AB-

Methoden

Konzentrationen reagierten, wurden ebenfalls mit RFP transduzierte Zellen in einer Dichte von 2600 Zellen/cm² mit je 2 ml zellspezifischem Medium in 12-Well Platten ausgesät und über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag erfolgte nach Auswertung der Selektionsergebnisse bei nicht-transduzierten FaDu-Zellen das Hinzupipettieren von unterschiedlichen geeigneten Puromycin-Konzentrationen zwischen 0,125 µg/ml und 2,0 µg/ml in die jeweiligen Wells. Die zu bewertenden Kriterien waren Konfluenz, Morphologie, Anteil der fluoreszierenden Zellen, sowie der Anteil der abgestorbenen Zellen an Tag 1 und Tag 2. Die Einschätzung der Anzahl fluoreszierender und nicht fluoreszierender Zellen erfolgte über Schätzungen und optische mikroskopische Kontrollen. Vitale Zellen adhärieren am Boden der Bakterialschalen, wohingegen avitale Zellen morphologisch kleiner waren und frei in den Schalen umherschwammen.

Konnte beobachtet werden, ab welcher Konzentration sich die Selektion optimierte, ohne die Vitalität der Zellen zu gefährden, begann die wesentliche Selektion mit den Zellen in den 10 cm Bakterialschalen, um eine größere Zahl an selektierten und rein fluoreszierenden Zellen zu erreichen. Die bei der Testselektion festgestellten Grenzdosen an Puromycin zwischen 0,25 µg/ml und 0,5 µg/ml wurden nun in die Bakterialschalen pipettiert. Der Vorgang begann am Tag 24 nach erstmaliger Zugabe des Lentiviruses. Dabei wurden in Bakterialschalen mit 10 cm Durchmesser bei RFP-transduzierten Zellen jeweils einmal 0,25 µg/ml und 0,5 µg/ml Puromycin pipettiert (s. Tabelle 16). Ein derartig später Zeitpunkt gewährte den Zellen eine Gewöhnungsphase an das transduzierte Virus und vermied zusätzlichen Stress für die Zellen durch einen zu frühen Start mit der Selektionsphase.

Tabelle 16: Puromycinkonzentrationen [µg/ml] in der Selektionsphase

Tag x nach Virusapplikation	24	26	29	31	36
Puromycinkonzentration [µg/ml]	0,25	0,25	0,25	0,5	1,0
	0,5	0,5	0,5	1,0	2,0

Es erfolgte so lange eine Steigerung der Puromycinkonzentrationen (s. Tabelle 16), bis die Anzahl von fluoreszierenden Zellen in den Bakterienchalen stagnierte und ca. 90 % betrug.

3.3.3 Überprüfung des S2-Status

Um gewährleisten zu können, dass die transduzierten FaDu-Zellen keinen S2-Status mehr besaßen und somit für den Aufbau der Modelle verwendbar waren, wurden HeK-Zellen in einer Dichte von 2600 Zellen/cm² und mit einer Mediummenge von 2 ml pro Well in 6-well Platten ausgesät und über Nacht inkubiert. HeK-Zellen besitzen eine hohe Affinität, den Lentivirus aufzunehmen und reagieren sehr sensibel auf kleinste Mengen des Virus. Deswegen kamen diese Zellen zur Anwendung, um einen eventuell noch vorhandenen S2-Status der transduzierten FaDu-Zellen feststellen zu können. Dafür wurde der Virusüberstand der FaDu-Zellen während des Mediumwechsels an Tag 44 nach erfolgter Transduktion mit dem Lentivirus entnommen, steril filtriert, um Rückstände von toten Zellen zu entfernen, und auf die HeK-Zellen aufpipettiert. An Tag 3 und Tag 6 nach dem Hinzufügen des Virusüberstandes erfolgte eine Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop, ob sich unter den HeK-Zellen nun fluoreszierende Zellen befanden. Nach zweimaliger, als negativ befundener Kontrolle waren die Zellen für den Modellversuch freigegeben.

3.4 Aufbau der Tumormodelle auf der Basis von OMÄ auf SIS/MUC Scaffolds

Für die Generierung von Tumormodellen wurden zuerst primäre Fibroblasten und Keratinozyten auf SIS/MUC Scaffolds appliziert und somit initial OMÄ kultiviert. Anschließend erfolgte die Integration von fluoreszierenden Tumorzellen der Zelllinie FaDu in die OMÄ mittels unterschiedlicher Applikationsformen.

3.4.1 Wachstumsphase 1: Fibroblastenapplikation

Der zuvor durch den Vorgang der Azellularisierung dezellularisierte porcine Schweinedarm (SIS/MUC) wurde der Länge nach lateral aufgeschnitten und aufgeklappt (s. Abbildung 3 A-D). Nach dem Zuschneiden der Matrix, entsprechend des Durchmessers der sterilen Zellkronen aus Kunststoff, folgte das Einspannen zwischen die beiden Kunststoffringe mit der Submukosa-Seite nach oben (s. Abbildung 3 E-I). Bei diesem Vorgang war zu beachten, dass die Matrix konsequent mit zellspezifischem DMEM-Medium benetzt war, um ein Austrocknen der SIS/MUC zu verhindern. Nach dem Bespannen der Zellkronen erfolgte ein Umsetzen der Zellkronen in 12-well Platten und eine 30-minütige Inkubation bei 37 °C. Währenddessen konnten Fibroblasten abgelöst und gezählt werden. 5×10^4 Zellen in 250 µl Zellsuspension wurden je Zellkrone auf die Matrix pipettiert und für eine weitere Stunde bei 37 °C inkubiert. Erst dann sollte das Hinzufügen von je 1 ml zellspezifischem Medium innerhalb und außerhalb der Zellkronen folgen, um zu gewährleisten, dass die Zellen nicht wieder abschwimmen konnten. Nun begann die erste Wachstumsphase der Modelle für 7 Tage, Medienwechsel musste alle 2-3 Tage sowohl außerhalb, als auch innerhalb der Zellkronen stattfinden. Der Tag, an dem die Matrix mit Fibroblasten besiedelt wurde, wird als Tag 1 bezeichnet.

Methoden

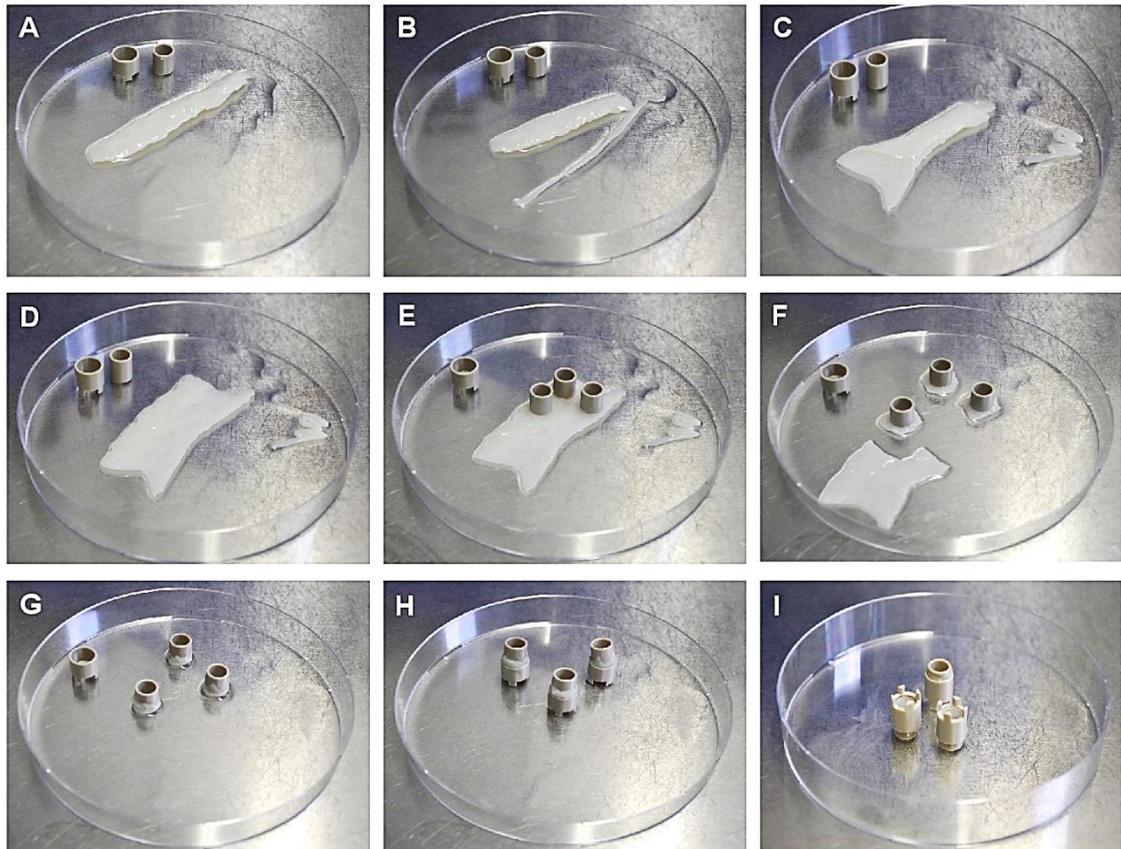


Abbildung 3: Bespannung der Zellkronen mit dezellularisiertem Schweine- darm (SIS/MUC)

Gezeigt wird der Vorgang der Zellkronenbespannung mit SIS/MUC. Wichtig dabei ist, den Darm lateral zu eröffnen und aufzuklappen (Abbildung 3 A-D), sodass die dem Darmlumen zugewandte Seite nach oben zeigt (Abbildung 3 E). Die SIS/MUC wurde dem Durchmesser der Zellkronen entsprechend mit einem Skalpell zurechtgeschnitten (Abbildung 3 F) und um den unteren Rand der Zellkronen gelegt (Abbildung 3 G). Diese wurden nun vorsichtig in den Rahmen der Zellkronen gesteckt, woraufhin die nun eingespannte SIS/MUC mit Zellen besiedelt werden konnte (Abbildung 3 H+I).

3.4.2 Kontrollmodelle

Für die Kontrollmodelle mussten am 8. Tag nach Applikation der Fibroblasten auf die Matrix primäre Keratinozyten desselben Spenders auf die SIS/MUC appliziert werden. Die primären Keratinozyten wurden dazu abgelöst, gezählt und je $2,5 \times 10^5$ Zellen in 250 μ l Zellsuspension auf die Matrix pipettiert. Nun fand ein Wechsel von E1-Medium auf E2-Medium statt, welches durch Zugabe von 4,8 μ l/ml CaCl_2 zu dem herkömmlichen E1-Medium hergestellt werden konnte. Es folgte eine Inkubationszeit von 2 h, danach wurde außerhalb der Zellkronen

je 1 ml E2-Medium hinzugefügt und nach weiteren 24 h Submerskultur für 14 Tage auf eine „Air-Liquid-Interface-Kultur“ (ALI) umgestellt, wozu die vorsichtige Absaugung des Mediums innerhalb der Zellkronen erfolgte. Die Zellkronen wurden von 12-well in eine 6-Well Platte gestellt. In jedem Well befand sich 1,5 ml E3-Medium. Zu beachten war hierbei, dass die Oberfläche des Modells trocken ist. Das Innere der Zellkrone wurde ohne Medium weiterkultiviert. Der Zeitpunkt, an dem die Modelle auf ALI gesetzt werden, ist Tag 0.

3.4.3 Tumormodell mit Spots

Für die Tumormodelle, generiert durch Applikation von Spots, wurden an Tag 5 die transduzierten FaDu-Zellen abgelöst, gezählt und nach dem Absaugen des Mediums außerhalb der Zellkronen je 1×10^4 Zellen in 2 μ l Zellsuspension punktförmig auf die Matrix der Zellkronen vorsichtig aufpipettiert. Die Zellkronen befanden sich nun zum Antrocknen offen für 15 min unter der Sterilbank. Anschließend folgte das Hinzufügen von 1,5 ml E3-Medium in das äußere Kompartiment der Wells. Der Medienwechsel für alle Modellvarianten erfolgte alle 2-3 Tage vollständig.

3.4.4 Tumormodell mit multizellulären Tumorzellsphäroiden

An Tag 2 der ALI-Kultur wurde in einer 96-well Platte 0,5 %-iges Agarosegel je 50 μ l pro Well angesetzt, mit Parafilm verschlossen und über Nacht bei 4 °C verfestigt. Nach dem Ablösen und Zählen der transduzierten FaDu-Zellen konnten je 5000 Zellen in 100 μ l zellspezifischem Medium in die mit Agarose-Gel präparierten Wells pipettiert und für vier Tage bei 37 °C inkubiert werden. Dabei bildeten sich multizelluläre, kugelförmige Tumorzellaggregate, die in Form von gleich großen, kleinen weißlichen Punkten in den Wells erschienen.

An Tag 5 wurden die Sphäroide (s. Abbildung 14) nach Absaugen des Mediums einzeln mittels einer 200 μ l Pipette und sterilen Pipettenspitzen mit erweiterter Öffnung vorsichtig und mit so wenig Agarose-Gel wie möglich aufgenommen und mittig auf die Matrix der Zellkronen positioniert. Dabei war zu beachten, dass die

Sphäroide auch mittig persistierten und durch das mitaufgenommene Agarose-Gel nicht zum Rand der Zellkronen hin abschwammen. Die mit zwei bis drei Sphäroiden pro Modell versetzten Zellkronen wurden nun unter der Sterilbank zum Antrocknen für 15 min offen stehengelassen. Anschließend konnte durch erneutes Zufügen von 1,5 ml E3-Medium außerhalb der Zellkronen die ALI-Phase fortgesetzt werden.

3.4.5 Tumormodell: Keratinozyten und FaDu-Zellen vermischt

Für den Aufbau der Tumormodelle wurden an Tag 8 je nach Versuch eine unterschiedliche Anzahl an mit dem RFP-Lentivirus transduzierten FaDu-Zellen mit $2,5 \times 10^5$ primären Keratinozyten vermischt und das Zellgemisch auf die Matrix überführt. Die Mischungsverhältnisse von FaDu-Zellen und primären Keratinozyten waren, je nach Modellversuch 1/50, 1/33, 1/25 und 1/10. Dann folgte die Umstellung auf E2-Medium, welches durch Zugabe von 4,8 $\mu\text{l/ml}$ CaCl_2 zu dem herkömmlichen E1-Medium hergestellt wurde. Nach einer Inkubationszeit von 2 h konnte außerhalb der Zellkronen je 1 ml E2-Medium hinzugefügt werden. Nach 24 h Submerskultur schloss sich ebenfalls wie bei den Kontrollmodellen für 14 Tage die ALI-Methode an.

3.5 Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER)

Der TEER-Wert ermöglicht die Charakterisierung der Diffusionsbarriere der OMÄ, sowie der Tumormodelle. Eine solche Barriere entsteht u.a. durch Ausbildung von sog. Tight-Junctions (Zell-Zell-Kontakten), die zum einen das Austreten von Körperflüssigkeiten und zum anderen das Eindringen von Molekülen und Ionen parazellulär verhindern sollen. So kann durch die Ermittlung des ohmschen Widerstandes der Barriere bildenden Zellschichten der wachsende Aufbau einer Diffusionsbarriere gemessen werden. Je größer dabei der ohmsche Widerstand, desto ausgeprägter die entstandene Diffusionsbarriere.

Methoden

Die Messungen wurden mit einer 24-well Impedanzmessplatte und dem Impedanzmesssystem HIOKI mit Kabel und Abgreifklemmen durchgeführt. Weiterhin wurde ein PC benötigt, auf dem das Messprogramm LabView mit dem Auswahlmenü „Einzelmessung“ installiert war.

Vor Beginn der manuellen Messungen mussten die Elektroden mit 70 %-igem Ethanol besprüht und für 15 min zum Trocknen unter die Sicherheitswerkbank gestellt werden. Die Zellkronen wurden mit einer sterilen Pinzette von der 6-well- in eine 24-well-Platte mit Einzelkammern überführt und in das äußere Kompartiment jeweils 1200 µl und in das innere Kompartiment jeweils 400 µl vorgewärmtes E3-Medium hinzupipettiert, sodass der Stand des Mediums innen und außen gleich hoch war. Weiterhin musste beachtet werden, dass die Zellkronen mittig positioniert waren und dass sich keine Luftblasen unterhalb der Membran befanden, da ansonsten Fehlermeldungen und fehlerhafte Messergebnisse entstehen würden. Nun konnte die Impedanzmessplatte auf die 24-well Platte aufgesetzt und mit dem Frequenzanalysator (HIOKI) verbunden werden. Dabei war zu beachten, dass die schwarze High Current und High Potential Abgreifklemme an die innere Elektrode und die jeweils rote Low Potential und Low Current Abgreifklemme an den äußeren Elektrodenstift geklemmt war. Für die Messung aller Zellkronen konnte die rote Abgreifklemme belassen werden, sodass lediglich die schwarze Klemme von Zellkrone zu Zellkrone neu umgesteckt werden musste. Pro Messvorgang wurden 40 Messpunkte, der Startwert „1 Hz“ und der Endwert „100 000 Hz“, sowie eine logarithmische Skalierung festgelegt. Nach Ende der Messung konnte die Impedanzmessplatte unter der Sicherheitswerkbank von der 24-well Platte abgenommen werden und die Zellkronen wurden in die 6-well Platten zurückgesetzt. Die Reinigung und Desinfektion der Messplatte erfolgte anschließend zuerst mit VE-Wasser und danach mit 70 %-igem Ethanol. Die Messungen fanden an Tag 2, 5, 8 und 12 nach Umstellung von Submerskultivierung auf ALI-Kultivierung statt. Als Leerwert wurden mit SIS/MUC bespannte Zellkronen ohne Zellen vermessen.

3.6 Histologie

Nach einer Kultivierungsdauer von insgesamt 21 Tagen wurden die Modelle mit PBS⁺ gewaschen und für 3 h mit Rotic®-Histofix fixiert. Anschließend konnten die Tumormodelle histologisch ausgewertet werden.

3.6.1 Paraffineinbettung und Herstellung von Paraffinblöcken

Nach der Fixierung der Modelle mussten zuerst die Matrices vorsichtig mit einem scharfen Skalpell aus den Zellkronen herausgeschnitten, zwischen mit Leitungswasser befeuchtetes Filterpapier fixiert und in Einbettkassetten für den Einbettautomaten überführt werden. Bis zum Starten des Einbettautomaten sollten die Kassetten unbedingt in einem Gefäß mit Leitungswasser vollständig benetzt bleiben, um ein Austrocknen der Modelle zu verhindern. Der Prozess des Einbettens erfolgte über Nacht wie in Tabelle 17 beschrieben.

Am Folgetag konnten nun die Modelle an der Aufblockstation in Paraffinblöcke eingebettet werden. Nach Erwärmen in flüssigem Paraffin wurden die Modelle mit einem scharfen Skalpell auf einem Objektträger auf der Heizplatte halbiert, bzw. gedrittelt. Nachdem flüssiges Paraffin in den ebenfalls vorgewärmten Metallförmchen vorgelegt worden war, konnten die Modelle mit der Schnittkante nach unten möglichst parallel zueinander auf dem Boden der Förmchen auf der Kühlplatte durch langsames Erhärten des Paraffins fixiert werden. Der beschriftete Teil der Einbettkassetten wurde zur Kennzeichnung oben aufgelegt und die Blöckchen bei Raumtemperatur bis zur Aufhärtung des Paraffins belassen. Die Blöcke können bis zum Vorgang des Schneidens bei Zimmertemperatur gelagert werden.

Tabelle 17: Protokoll Paraffineinbettung

Lösungen	Dauer [min]	Ziel
Wasser I	1	Auswaschen des PFA
Wasser II	1	

Lösungen	Dauer [min]	Ziel
Ethanol 70%	1	Entwässerung
Ethanol 90%	1	
Ethanol 96%	1	
Isopropanol I	1	
Isopropanol II	1	
Isopropanol/Xylol (2:1)	1	
Xylol I	1	Auswaschen des Alkohols
Xylol II	1	
Paraffin I	1,5	Durchtränken des Gewebes mit Paraffin
Paraffin II	1,5	

3.6.2 Herstellung der Paraffinschnitte

Vor Beginn des Schneidens war es ratsam, mit einem Messer das Paraffin um die eingebetteten Modelle zu entfernen, um die Schnittfläche mit den Modellen möglichst gering zu halten. Dann verweilten die Blöckchen mit dem Paraffin nach unten für ca. 15 min auf einer -5 °C kalten Kühlplatte, um das Paraffin abzukühlen und somit den Scheidevorgang zu erleichtern. Die Schnittdicke des Schlittenmikrotoms sollte zwischen 3-5 µm betragen.

Zunächst wurden die Schnitte mit einer Pinzette in lauwarmes VE-Wasser gelegt, mit einem für die darauffolgende Färbung geeigneten Objektträger aufgenommen und der Schnitt damit wiederum in ein mit 50 °C warmem VE-Wasser gefülltes Paraffinsteckbad überführt. Darin konnten sich die Schnitte ebenmäßig entfalten und anschließend auf Objektträger aufgebracht werden. Zur besseren Fixierung und zur Verhinderung des Abschwimmens können die Schnitte mit einem mit 70 %-igem Ethanol getränkten Filter aufgedrückt werden. Anschließend wurden die Objektträger in Objektträgerhalter einsortiert und über

Nacht im Trockenschrank bei 37 °C getrocknet. Nach dem Umsortieren der Schnitte in Objektträgerboxen ist eine Lagerung bei Raumtemperatur möglich.

3.6.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Um eine Übersicht über den Aufbau der OMÄ und die konstruierten Tumormodelle zu erlangen, wurde bei allen Modellen die HE-Färbung gemäß Tabelle 18 durchgeführt.

Tabelle 18: HE-Färbung nach Mayer

Lösungen	Dauer [min]	Ziel
Hämatoxylin sauer nach Mayer (Mephisto)	6	Färben der Zellkerne
VE-Wasser	schwach fließend, bis Farbe ausgewaschen	Waschvorgang
Leitungswasser	5	Bläuen unter fließendem, lauwarmem Wasser
Eosin	6	Färben des Zytoplasmas, Extrazellulärmatrix
VE-Wasser	schwach fließend, bis Farbe ausgewaschen	Waschvorgang

Der natürliche Farbstoff Hämalan färbt alle Strukturen, welche sauer (basophil) sind, wie z.B. die DNA, Zellkerne oder das endoplasmatische Retikulum (ER), blau. Der synthetisch hergestellte Farbstoff Eosin dagegen färbt alle Zellstrukturen rot, die einen basischen (azidophilen) Charakter aufweisen, wie z.B. Mitochondrien, Kollagen und Proteine des Zytoplasmas. Für die HE-Färbung sollten die Schnitte zuvor auf SuperFrost®Plus Gläser aufgebracht werden. Vor dem Färbvorgang verweilen die Objektträgerhalter für 60 min bei 60 °C im Trockenschrank, um das Paraffin zu schmelzen. Nach der Entnahme aus dem Trockenschrank folgte die Entparaffinierung der Schnitte, indem zuerst die absteigende Alkoholreihe gemäß Tabelle 19 durchlaufen wurde. Danach wurde

Methoden

die HE-Färbung durchgeführt und die Schnitte wurden entlang der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert (s. Tabelle 20).

Tabelle 19: Protokoll zur HE-Färbung, absteigende Reihe

Lösungen	Dauer [min]	Ziel
Xylol I	10	Entparaffinieren
Xylol II	10	
Ethanol 96 %	3 x auf- und abtauchen	Rehydrieren
Ethanol 96 %	3 x auf- und abtauchen	
Ethanol 70 %	3 x auf- und abtauchen	
Ethanol 50 %	3 x auf- und abtauchen	
VE-Wasser	schwenken, bis keine Turbulenzen mehr	Waschvorgang

Tabelle 20: Protokoll aufsteigende Reihe

Lösungen	Dauer [min]	Ziel
Ethanol 70 %	2 x auf- und abtauchen	Entwässerung
Ethanol 96 %	2	
Isopropanol I	5	
Isopropanol II	5	
Xylol I	5	
Xylol II	5	

Unmittelbar nach Entnahme der Schnitte aus dem Xylol folgte die luftblasenfreie Eindeckung mit dem Eindeckmittel Entellan. Die gefärbten Objektträger wurden über Nacht zum Ausdampfen und Trocknen unter dem Abzug belassen, konnten

am nächsten Tag in Objektträgerboxen umsortiert und dort bei Raumtemperatur gelagert werden.

3.6.4 Immunhistologische Färbung mit HRP-basiertem Nachweissystem

Das Prinzip der immunhistologischen Färbung beruht auf einer Antikörper-Antigen-Komplexbildung. Durch diese Reaktion können durch die Affinität spezifischer Antikörper an bestimmte Zell- und Gewebestrukturen unterschiedliche Kompartimente der OMÄ farblich dargestellt und somit sichtbar gemacht werden. Zur Visualisierung kam in dieser Arbeit die Methode der immunhistologischen Färbung mit HRP-basiertem Nachweissystem zu Anwendung. Sie stellt eine indirekte Färbemethode dar. Dafür wird zunächst ein spezifischer Primärantikörper auf die Schnitte aufgebracht, der eine starke spezifische Bindung zum Epitop der Proteine im Gewebe eingeht, die dargestellt werden sollen. Darauf folgend bildet ein Sekundärantikörper, an dem ein Farbstoff oder Enzym gekoppelt ist, mit der F_c-Region des Primärantikörpers einen Komplex. Es folgt eine immunhistochemische Enzym-Substrat-Reaktion, unter der die Färbung entsteht. Dabei dient die Meerrettichperoxidase (HRP) als Markerenzym und entwickelt in Reaktion mit dem Substrat-Chromogen aus 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) die bräunliche Färbung der gewünschten Zellstrukturbestandteile. Dies geschieht durch die Reaktion von DAB mit HRP zu einem braunen Oxidationsprodukt.

Nach der entsprechenden Beschriftung der Objektträger mit den jeweiligen zu färbenden Antikörpern bzw. Isotypkontrollen, verweilten die Schnitte nach der Entnahme aus dem 37 °C warmen Wärmeschrank für eine Stunde in dem Wärmeschrank mit einer Temperatur von 60 °C. Anschließend folgte ein direktes Übersetzen der Objektträgerhalter in Xylol I. Zur Entparaffinierung wurde die komplette absteigende Reihe durchlaufen und mit dem Waschvorgang im VE-Wasser beendet (s. Tabelle 19). Ab diesem Zeitpunkt musste ein komplettes Austrocknen der Schnitte unbedingt vermieden werden. Nachdem eine hitzeinduzierte Demaskierung der Epitope in entsprechendem 1 x Puffer in einem

Methoden

Dampfgarer bei 90-100 °C für 20 min durchgeführt worden war, wurden die Schnitte in VE-Wasser überführt, mit einem Fettstift umrandet und in den PBS-Waschpuffer mit 0,5 % Tween-20 gegeben. Parallel dazu konnte die AK-Verdünnung mit der AK-Verdünnungslösung entsprechend des zum jeweiligen AK angegebenen Mischverhältnisses angesetzt werden. Die Isotypkontrollen erfolgten jeweils mit alleiniger AK-Verdünnungslösung.

Das Aufbringen der AK und die Inkubation fanden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer statt, die einzelnen Waschschriffe auf dem Wippschüttler. Die hergestellten und verwendeten Lösungen verweilten aufgrund von hoher Licht- und Temperaturempfindlichkeit bei Nichtgebrauch bei Dunkelheit auf Eis.

Nun folgten die Schritte gemäß Tabelle 21, welche den Ablauf der immunhistologischen Färbung mit den spezifischen AK angibt.

Tabelle 21: Protokoll immunhistologische Färbung mit HRP-basiertem Nachweissystem

Lösung	Dauer [min]	Ziel
3 % H ₂ O ₂	10	Blockieren der zelleigenen Peroxidase
PBS-Tween	5	Waschen
Primärantikörper/Isotyp	60	Färben der Epitope
PBS-Tween	3 x 5	Waschen
DCS Polymer-Enhancer (Link)	10	deutliche Darstellung schwach exprimierter Zielstrukturen
PBS-Tween	3 x 5	Waschen
DCS HRP-Polymer-Reagenz(Label)	20	deutliche Darstellung schwach exprimierter Zielstrukturen
PBS-Tween	3 x 5	Waschen
DAB-Chromogen	1-7	Nachweis
PBS-Tween	schwenken	Waschen

Lösung	Dauer [min]	Ziel
Hämalaun	30 - 45 s	Färbung der Zellkerne
Leitungswasser	60 - 90 s	Bläuen
VE-Wasser	schwenken	Waschen

Die Schnitte wurden nun in der aufsteigenden Reihe rehydratisiert und mit dem organischen Eindeckmittel Entellan unter dem Abzug eingedeckt, über Nacht zum Ausdampfen dort belassen und am nächsten Tag in die Objektträgerboxen zur Lagerung eingeordnet.

3.7 Mikroskopie

Es wurden sowohl Aufnahmen von Zellkulturen und der generierten Tumorzellsphäroide, als auch mikroskopische Aufnahmen der fixierten und gefärbten Modelle angefertigt.

3.7.1 Lichtmikroskopie

Für alle histologischen Aufnahmen kam das Mikroskop Biorevo BZ-9000 der Firma Keyence zur Anwendung. Es wurden Bilder in 10-, 20- und 40-facher Vergrößerungen angefertigt und die resultierenden Bilder mit den Programmen BZ-II Analyzer und BZ-II Viewer verarbeitet und ausgewertet.

3.7.2 Fluoreszenzmikroskopie

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden mit demselben Gerät wie die Lichtmikroskopaufnahmen angefertigt.

4 Ergebnisse

Zuerst erfolgte die Modulierung der für die Tumormodelle verwendeten Zellen der Tumorzelllinie FaDu mittels Transduktion des Lentivirus RFP. Anschließend fand die Generierung von humanen oralen Mukosaäquivalenten (OMÄ) auf einer Matrix aus dezellularisiertem Schweinedünndarm (SIS/MUC) und die Untersuchung von unterschiedliche Methoden zur Integration der mit RFP transduzierten FaDu-Zellen in die OMÄ statt (s. Abbildung 4).

In insgesamt vier nacheinander angelegten Modellversuchsreihen konnten Tumormodelle generiert werden, die nach der Fixierung histologisch und immunhistochemisch analysiert und ausgewertet wurden. Eine Modellversuchsreihe bestand aus jeweils 2-3 mit SIS/MUC bespannten Zellkronen mit Kontrollmodellen, aus jeweils 2-3 mit SIS/MUC bespannten Zellkronen mit Modellen, generiert durch Applikation von Spots oder Sphäroiden und aus jeweils 2-4 mit SIS/MUC bespannten Zellkronen mit Tumormodellen, generiert durch Applikation von Tumorzell-/Keratinocytingemischen in den unterschiedlichen Mischungsverhältnissen 1:50, 1:33, 1:25 und 1:10 (s. Tabelle 22).

Tabelle 22: Anzahl der angesetzten Modellarten in den unterschiedlichen Versuchsreihen

Modellart	Anzahl der Zellkronen im Modellversuch Nr.			
	1	2	3	4
Kontrollmodell	2	3	3	3
Spot	2	3	3	3
Sphäroid	3	3	3	3
Gemisch 1/50	0	4	4	4
Gemisch 1/33	3	0	0	0
Gemisch 1/25	0	4	4	4
Gemisch 1/10	0	0	3	3
Leerwert	0	0	1	1

Ergebnisse

Die Tumorentstehung wurde mittels histologischer und immunhistologischer Methoden verifiziert, sowie mit aus Impedanzmessungen hervorgegangenen Ergebnissen korreliert.

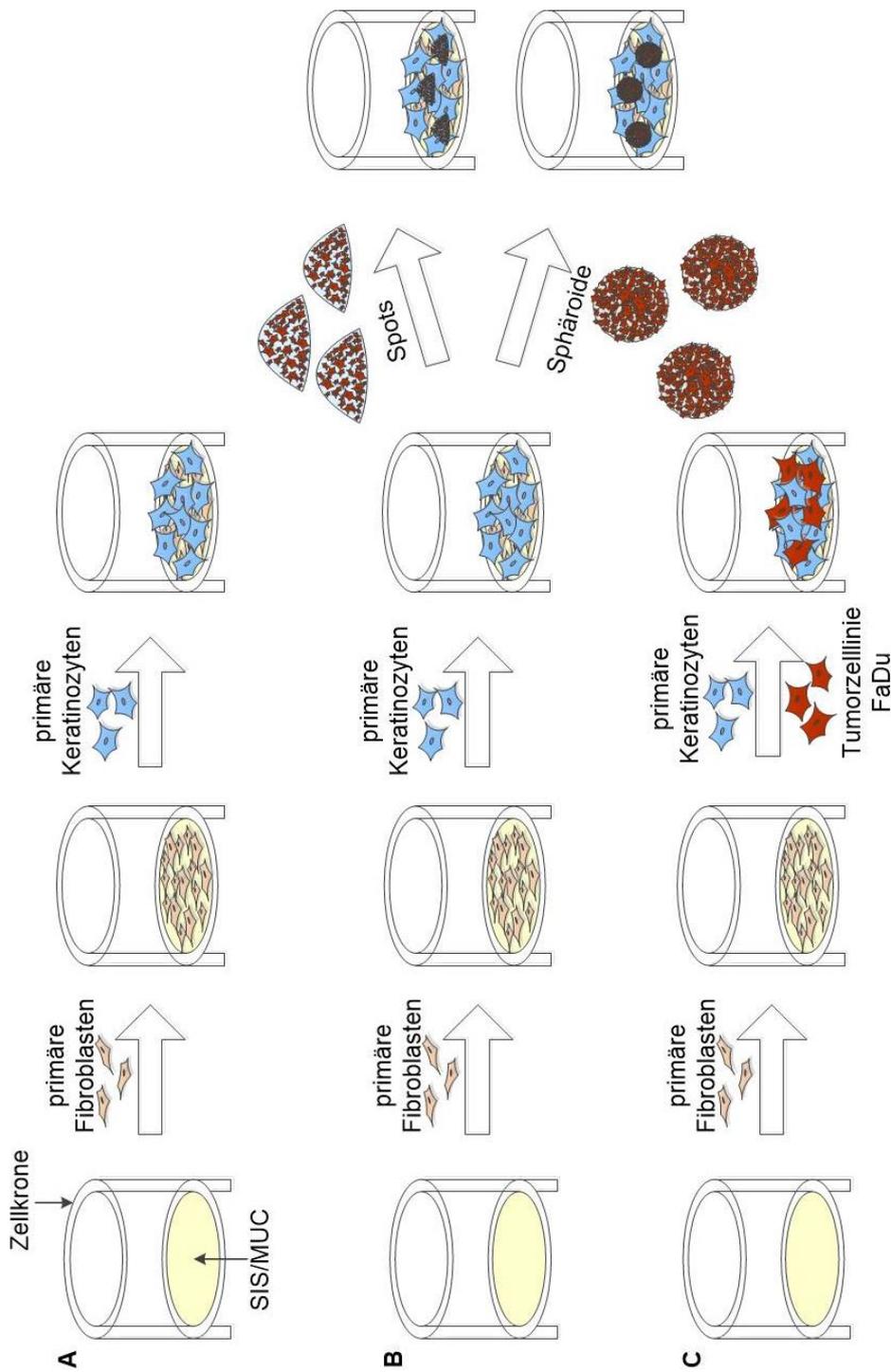


Abbildung 4: Schema zum Modellaufbau der einzelnen Tumormodelle

Abbildung 4 zeigt die unterschiedlichen Schemata der einzelnen Tumormodelle. (A) zeigt den Aufbau von Kontrollmodellen ohne Applikation von Tumorzellen, (B) zeigt die Generierung von Tumormodellen mittels Spots oder Tumorzellsphäroiden. (C) zeigt den Aufbau von Tumormodellen, generiert durch Applikation von Zellgemischen aus Tumorzellen und primären Keratinozyten in unterschiedlichen Verhältnissen.

Ergebnisse

Der Aufbau der unterschiedlichen Modellarten war dabei in jeder Modellversuchsreihe jeweils gleich, wobei allerdings nicht in jeder Modellversuchsreihe Tumormodelle mit allen Mischungsverhältnissen der Tumorzellgemische angesetzt wurden. Einziger Unterschied bestand in der Herkunft der primären Zellen. In den Modellversuchen 1, 3 und 4 wurden primäre Zellen des Spenders Nr. 22 verwendet, Modellversuch 2 wurde mit Zellen des Spenders Nr. 23 angesetzt.

4.1 Population Doublings (PD)

Zur besseren Beurteilung der Qualität der primären Keratinozyten, die aus Biopsien unterschiedlicher Spender isoliert worden waren, wurde die Zellteilungsrate, sowie die Anzahl der Tage berechnet, bis sich die Anzahl der Zellen verdoppelt hat. Exemplarisch in Tabelle 23 aufgeführt nun für 6 Spender die jeweiligen Ergebnisse der Verdopplungsraten (PD) der primären Keratinozyten. Dabei werden PDT-Werte bei Passage 2 (p2) zwischen 2,59 und 4,17 errechnet. Einziger abweichender Wert bei Spender #22, bei dem der Wert auf 35,29 Tage angestiegen ist, was für eine sehr langsame Zellteilungsrate spricht.

Tabelle 23: Population Doublings

	Spender	p1	p2	p3
PD	#20		3,85	
PDT(Tage)			4,16	
PD	#22	1,29	0,17	
PDT(Tage)		6,2	35,29	
PD	#23	1,43	1,20	2,58
PDT(Tage)		6,29	4,17	1,94
PD	#24	1,51	2,14	
PDT(Tage)		4,64	2,80	

Ergebnisse

	Spender	p1	p2	p3
PD	#25	-0,24	2,70	
PDT(Tage)		-20,83	2,59	
PD	#26	1,67	1,42	
PDT(Tage)		4,19	3,52	

Es wurden in den Modellversuchen 1, 3 und 4 Zellen des Spenders Nr. 22 und Zellen des Spenders Nr. 23 in Modellversuch 2 verwendet. Wie allerdings Abbildung 6 zeigt, sind hinsichtlich Aufbau, Dicke und Qualität der OMÄ keine gravierenden Unterschiede festzustellen, obwohl die Keratinozyten des Spenderbiopsats Nr. 22 eine erheblich verlängerte PDT von Passage 1 auf Passage 2 besitzen (vgl. Tabelle 23).

4.2 Transduktion des Lentivirus RFP auf Tumorzelllinie FaDu

Durch Transduktion des Lentivirus RFP auf die Zellen der Tumorzelllinie FaDu konnte eine Eigenfluoreszenz der Zellen erreicht werden, die die Detektion der Zellen innerhalb der Tumormodelle erleichtern sollte. Wegen fehlender Titerangaben der Eppendorf Reaktionsgefäße, in denen das RFP-Virus gelagert wurde, wurden je drei unterschiedliche Eppendorf Reaktionsgefäße mit unterschiedlichen Daten verwendet, um einen sichereren Erfolg gewährleisten zu können. Im Verlauf des Transduktionsvorganges zeigten die transduzierten Zellen am dritten Tag nach Virusapplikation mit dem Virus des Datums 22.11.15 die stärkste Fluoreszenz, das Virus des Datums 25.10.13 zeigte zwar wenig, aber vorhandene Fluoreszenz und bei dem Virus des Datums 18.04.15 war nahezu keine Fluoreszenz unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 555 nm feststellbar, weswegen diese Zellen frühzeitig noch vor der Selektion mit Puromycin an Tag 15 aussortiert wurden. Nachdem am fünften Tag nach Applikation des Virus die Zellen das erste Mal mit PBS⁺ gewaschen und die Medien gewechselt waren, konnte eine verstärkte Fluoreszenz im Vergleich zu

Ergebnisse

Tag drei festgestellt werden. Die Zellen schienen vital und die Konfluenz erhöhte sich.

Um einen möglichst hohen Reinheitsgrad von fluoreszierenden Zellen zu erreichen, wurden Selektionen mittels Puromycin durchgeführt, da mit dem RFP-Virus transduzierte Zellen resistent gegen das Antibiotikum Puromycin waren, wodurch ein Aussortieren nicht transduzierter und somit nicht fluoreszierender Zellen möglich war. Wie unter 3.3 bereits aufgeführt wurden unterschiedliche Puromycinkonzentrationen zuerst bei nicht transduzierten FaDu-Zellen durchgeführt, um einen unnötigen Verlust erfolgreich transduzierter FaDu-Zellen durch zu hohe Puromycinkonzentrationen zu vermeiden (s. Tabelle 24). Bewertet wurden dabei Konfluenz und Morphologie der Zellen. Nicht adhärenente Zellen galten als avital. Die Tabelle mit den Ergebnissen des Versuches ohne transduzierte Zellen zeigt eine Toleranz von Puromycin bis zu einer Konzentration von maximal 0,5 µg/ml.

Tabelle 24: Übersicht der getesteten Puromycinkonzentrationen an nicht transduzierten FaDu-Zellen

Konzentration [µg/ml]	Konfluenz	Morphologie	Konfluenz	Morphologie
	Tag 1 [%]	Tag 1	Tag2 [%]	Tag 1
0	90	adhärenente Zellen, vital	90	adhärenente Zellen, vital
0,03	90	adhärenente Zellen, vital	90	adhärenente Zellen, vital
0,06	85	adhärenente Zellen, vital	85	adhärenente Zellen, vital
0,125	80	adhärenente Zellen, vital	80	Ca. 20 % avital
0,25	70	adhärenente Zellen, vital	70	Eng zentral sitzend vital, restliche Zellen avital
0,5	60	>50% avital	60	>90% avital
1,0	<10	>90% avital	<10	>90% avital
2,0	<10	>90% avital	<10	>90% avital

Ergebnisse

Konzentration [µg/ml]	Konfluenz	Morphologie	Konfluenz	Morphologie
	Tag 1 [%]	Tag 1	Tag2 [%]	Tag 1
2,5	<10	>90% avital	<10	>90% avital
5,0	<10	>90% avital	<10	>90% avital
10,0	<10	>90% avital	<10	>90% avital

Im Gegensatz zu den nicht-transduzierten FaDu-Zellen wurden die transduzierten FaDu-Zellen mit einer Maximalkonzentration von 2,0 µg/ml getestet, da nach der Applikation von geringeren Puromycinkonzentrationen keine ausreichende Selektion erreicht werden konnte. Die Zellen waren resistenter gegen höhere AB-Konzentrationen. Sie erscheinen noch bei einer Konzentration von 2,0 µg/ml vital und konfluent (s. Tabelle 25) und es konnte einen Anteil von 80 % an fluoreszierenden Zellen erreicht werden.

Tabelle 25: Übersicht der getesteten Puromycinkonzentrationen an transduzierten FaDu-Zellen

Konzentration [µg/ml]	Konfluenz	Morphologie	Konfluenz	Morphologie
	Tag 1 [%]	Tag 1	Tag2 [%]	Tag 1
0	80	adhärente Zellen, vital	90	adhärente Zellen, vital
0,125	<10	>90% avital	<10	>90% avital
0,25	<10	>90% avital	<10	>90% avital
0,5	80	ca. 10% avitale Zellen, darunter auch fluoreszierende	80	<5% avitale Zellen, allerdings auch nicht fluoreszierende Zellen vital

Ergebnisse

Konzentration [µg/ml]	Konfluenz	Morphologie	Konfluenz	Morphologie
	Tag 1 [%]	Tag 1	Tag2 [%]	Tag 1
1,0	80	ca. 20% avitale Zellen, darunter auch fluoreszierende	90	<5% avitale Zellen, allerdings auch nicht fluoreszierende Zellen vital
2,0	80	ca. 20% avitale Zellen, darunter auch fluoreszierende	90	<5% avitale Zellen, allerdings auch nicht fluoreszierende Zellen vital

Nach den Testdurchläufen zur Ermittlung der optimalen AB-Konzentration bei minimalem Verlust von fluoreszierenden Zellen wurden die RFP-transduzierten FaDu-Zellen in Zellkulturschalen mit dem Durchmesser von 10 cm ausgesät und Puromycin hinzupipettiert (s. 3.3). Dabei musste aufgrund zu vieler persistierender, nicht-fluoreszierender Zellen die AB-Konzentration erhöht werden, um eine akzeptable Anzahl von fluoreszierenden Zellen zu erreichen. Im Verlauf der Selektionsphase stagnierte der Anteil von rein fluoreszierenden Zellen bei ca. 80 % und wurde deswegen nach Tag 36 beendet. Es persistierten nun vitale, morphologisch unauffällige Zellen in den Zellkulturschalen, die nun für die Modellversuche verwendet werden konnten (s. Abbildung 5A+B).

Da die mit dem Virus des Datums 25.10.13 transduzierten FaDu-Zellen im Vergleich zu den mit dem RFP-Virus vom 22.11.15 transduzierten Zellen sowohl eine geringere Fluoreszenzkraft, als auch eine qualitativ geringere Selektivität gegenüber dem AB und eine geringere Konfluenz und Vitalität aufwiesen, wurden diese Zellen an Tag 31 entsorgt.

Ergebnisse

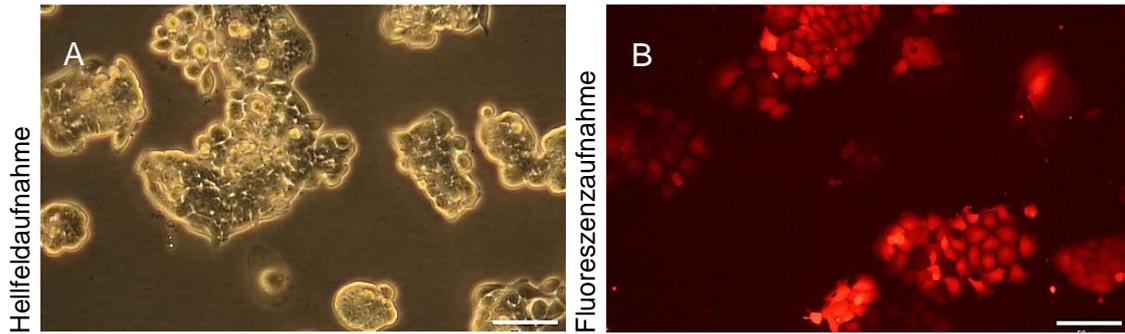


Abbildung 5: RFP-transduzierte FaDu-Zellen

Gezeigt werden RFP-transduzierte Zellen einmal Hellfeldaufnahmen (A) und einmal mit dem Fluoreszenzmikroskop (B). (B) zeigt deutlich rot fluoreszierende, morphologisch unauffällige vitale Zellen. Die Größenbalken entsprechen einer Länge von 50 μm .

4.3 Kontrollmodell – OMÄ ohne Integration von Tumorzellen

Um gewährleisten zu können, dass die primären Spenderzellen in der Lage sind, suffiziente, der humanen oralen Mundschleimhaut möglichst ähnliche OMÄ auf Basis der SIS/MUC zu bilden, wurden bei jedem Modellversuchsdurchgang Kontrollmodelle angelegt. Anhand dieser Modelle konnten Aussagen über die grundlegende Wachstumstendenz, die Ausgangsdicke des Epithels und die Qualität der primären Fibroblasten und Keratinozyten im Allgemeinen getroffen werden. Die auf der Matrix aus dezellularisiertem Schweinedünndarm (SIS/MUC) aufgebauten OMÄ und Tumormodelle wurden histologisch und immunhistochemisch untersucht, sowie anhand der Impedanzmessspektroskopie charakterisiert.

4.3.1 Histologische Charakterisierung

Die histologische Charakterisierung aller Modelle fand nach einer Kultivierungsdauer von 21 Tagen statt. Der Schwerpunkt bei den Kontrollmodellen lag auf der Ausbildung eines gleichmäßig gebildeten, mehrschichtigen verhornten Plattenepithels ohne irreguläre histologische Besonderheiten. Dafür wurden HE-Färbungen der OMÄ durchgeführt, um die Morphologie der Modelle zu untersuchen.

Ergebnisse

Abbildung 6 zeigt zwei Beispiele von Kontrollmodellen mit Keratinozyten und Fibroblasten des jeweils selben Spenders. Beide OMÄ zeigen eine vergleichbare Dicke hinsichtlich der Ausprägung des Epithels und der Lamina propria. Im Vergleich zu H.E.-Färbungen einer humanen oralen Mukosa allerdings eine geringere Schichtstärke. Die H.E.-Färbung der OMÄ auf SIS/MUC-Basis zeigen ein durchgehend konstant gewachsenes, verhorntes, mehrschichtiges Plattenepithel. Das Epithel besteht aus 10-15 Zellschichten und ist ca. 100-120 µm dick. Befinden sich in der obersten Epithelschicht, dem Stratum corneum, Zellkerne, die deutlich auf Abbildung 6A (s. schwarze Pfeile) zu erkennen sind, wird dies als Parakeratose bezeichnet. Die OMÄ sind apathologisch geschichtet und dysplasiefrei. Die Zellen der Basalzellschicht liegen geordnet der Basalmembran auf und bewegen sich ausreifend von basal zur Oberfläche hin. Die Kerne sind platt konturiert und halten zueinander geordneten Abstand.

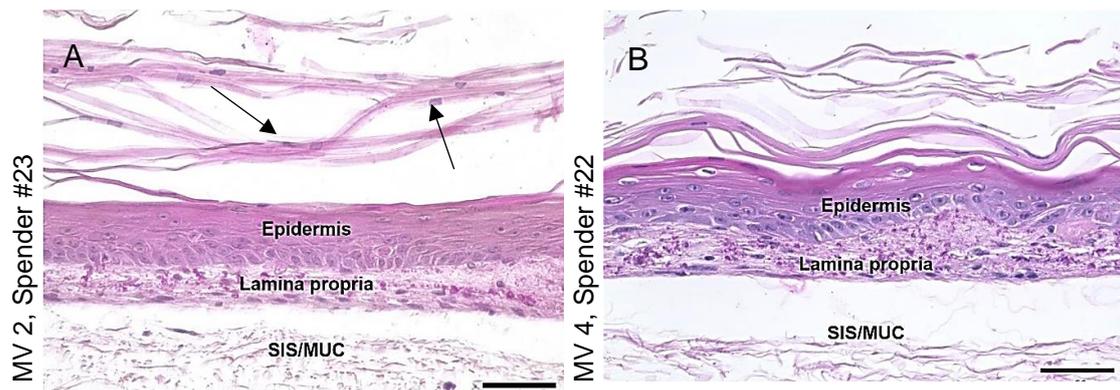


Abbildung 6: Kontrollmodell - Histologische Charakterisierung eines OMÄ ohne Tumorzellen (H.E.-Färbung)

OMÄ auf Basis von SIS/MUC aus jeweils unterschiedlichen Spenderzellen. Schwarze Pfeile in Abbildung A kennzeichnen irregulär vorherrschende Zellkerne im Bereich des Stratum corneums. Beide Kontrollmodelle sind mit primären isolierten Fibroblasten und Keratinozyten aufgebaut. MV steht für Modellversuch. Die Größenbalken entsprechen einer Länge von 50 µm.

Die histologische Bewertung der Modelle mittels des Fluoreszenzmikroskops bringt lediglich die Hervorhebung des Stratum corneums hervor, welches ohnehin eine Eigenfluoreszenz aufweist. (vgl. Abbildung 7). Da in Kontrollmodellen keine RFP-transduzierten Tumorzellen verwendet wurden, sind auch in den tieferliegenden Schichten keine fluoreszierenden Zellen zu erwarten. Allerdings befinden sich auch in den darunterliegenden Schichten unspezifisch fluoreszierende Zellen (s. Abbildung 7B).

Ergebnisse

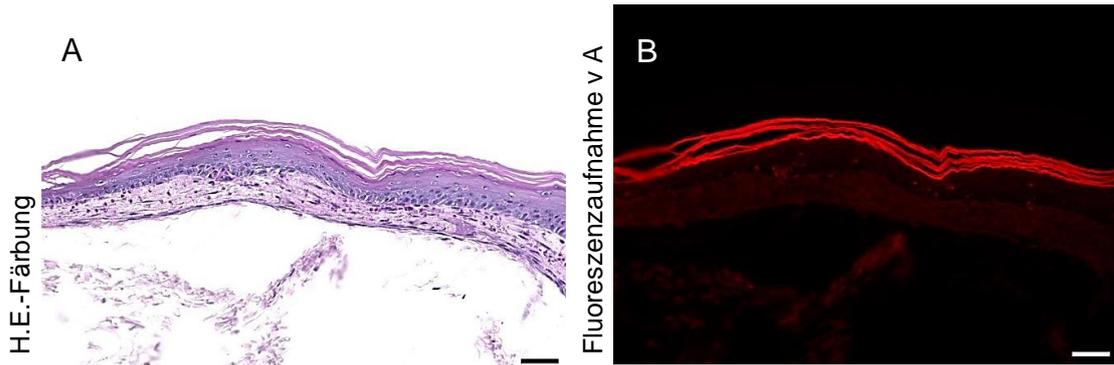


Abbildung 7: H.E.-Übersichtsfärbung eines Kontrollmodells und Darstellung mit einem Fluoreszenzmikroskop

Gezeigt wird die HE-Färbung eines Kontrollmodells (A). Abbildung B ist eine Aufnahme desselben Schnitts, welche unter Anwendung des TRITC-Filters im Keyence Mikroskop aufgenommen wurde. Auffällig dabei ist, dass im Kontrollmodell (B), in dem sich keine mit RFP-transduzierten Zellen befinden, die Schicht des Stratum corneum eine Eigenfluoreszenz aufweist. Zudem sind unspezifisch fluoreszierende Keratinozyten in den tiefergelegenen Schichten zu erkennen. Die Größenbalken entsprechen einer Länge von 50 μm .

4.3.2 Immunhistologische Charakterisierung

Sowohl von den OMÄ (Abbildung 8), als auch von den Tumormodellen fand eine immunhistologische Charakterisierung statt. Dabei wurden Färbungen von Epithelbestandteilen mittels der Differenzierungsmarker CK10, Marker für suprabasale Zellen in verhornten Epithelschichten, Stratum corneum, und CK14, Marker für basale Keratinozyten, sowie des Proliferationsmarkers Ki67 durchgeführt. Die Basalmembran wurde mittels Färbung des Basalmembranbestandteiles Kollagen IV versucht darzustellen. Fibroblasten als Grundbestandteil der Lamina propria wurden durch den mesenchymalen Marker Vimentin angefärbt. Zum Nachweis des Vorherrschens des Tumorsuppressorproteins p53, wurde dieses Protein ebenfalls angefärbt. Alle während der immunhistochemischen Untersuchung angefärbten Bestandteile der OMÄ stellten sich braun in unterschiedlichen Intensitäten dar. Durch eine darauffolgende Gegenfärbung mit Hämalaun wurde eine Anfärbung der Zellkerne erzielt, welche sich daraufhin blau darstellten. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte daraufhin die Morphologie der OMÄ und der Tumormodelle in ihren einzelnen Bestandteilen gründlich untersucht und charakterisiert werden, sowie Abweichungen während des Tumorwachstums, wie beispielsweise die Infiltration

Ergebnisse

in tiefere Schichten, sowie die Durchbrechung der Basallamina sicher festgestellt werden.

Auf Abbildung 8A-D sind im Bereich des Epithels Anfärbungen zu sehen. Der Nachweis von CK10 zeigt eine Färbung der superfiziellen Zellen des Stratum corneum, während die Expression von CK14 im basaleren Anteil des Epithels nachgewiesen werden konnte. Ki67 zeigt sich in nukleärer Positivität und färbt hier die Zellkerne proliferativer Zellen in der Basalzellschicht, wohingegen die Färbung zur Oberfläche hin ausbleibt. P53, ebenfalls ein nukleärer Marker, färbt sowohl Zellen des Stratum basale, als auch oberflächlichere Zellkerne an.

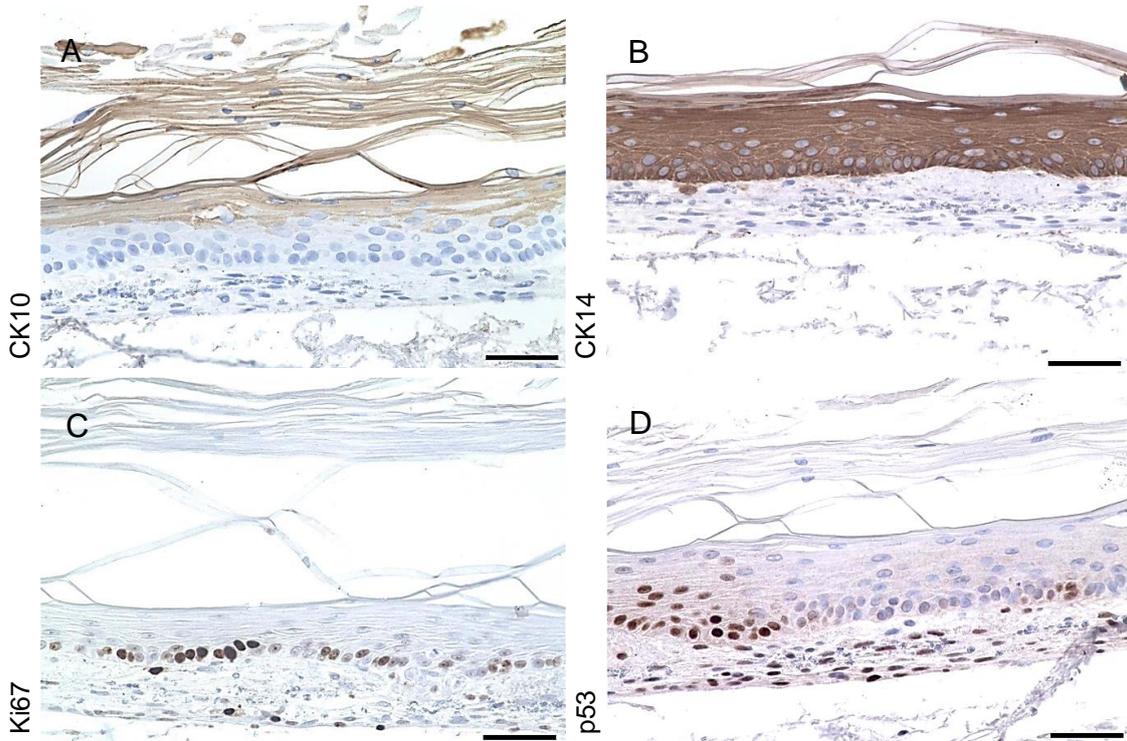


Abbildung 8: Kontrollmodell - Immunhistochemische Charakterisierung epidermaler Anteile

Gezeigt werden immunhistochemische Färbungen der in der Epidermis lokalisierten Anteile von Kontrollmodellen – OMÄ ohne Integration von Tumorzellen. CK10 (A)-, CK14 (B)-, Ki67 (C)-, p53 (D)-Anfärbung. Die Größenbalken entsprechen einer Länge von 50 μm .

Bei der Färbung von Kollagen IV würde lediglich die Färbung der Basallamina zu erwarten sein, was sich in dieser Färbung jedoch nicht bestätigt. Es erfolgte hierbei eine Braunfärbung der gesamten Lamina propria, allerdings mit deutlicher Erkennbarkeit der kontinuierlich verlaufenden Basallamina durch verstärkte Färbung derselbigen (schwarzer Pfeil in Abbildung 9A). Zur Anfärbung der Lamina propria wurde der mesenchymale Marker Vimentin verwendet. Dabei

Ergebnisse

zeichnet sich, wie Abbildung 9B zeigt, eine Braunfärbung der Fibroblasten ab. Die Zellen sind gleichmäßig in der mesenchymalen Schicht verteilt und es schließt sich dem dicht mit Fibroblasten besiedelten Anteil der SIS/MUC ein größtenteils zellfreier Abschnitt der SIS/MUC an.

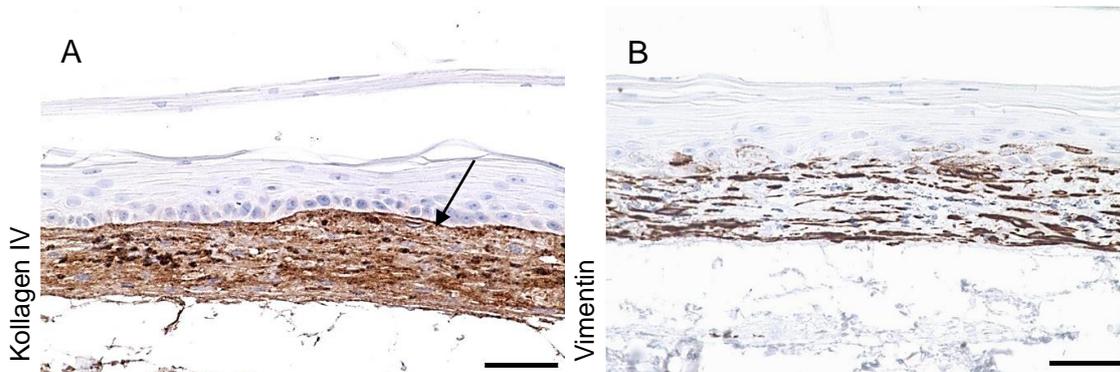


Abbildung 9: Kontrollmodell - Immunhistochemische Charakterisierung dermalen Anteile

Gezeigt werden immunhistochemische Färbungen der in der Lamina propria lokalisierten Anteile von Kontrollmodellen – OMÄ ohne Integration von Tumorzellen. (A): Kollagen IV-, (B): Vimentin-Anfärbung. Der schwarze Pfeil in Abbildung A kennzeichnet die klar definierbare Basalmembran. Die Länge der Größenbalken beträgt 50 µm.

4.3.3 TEER-Wert Messung

Die Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) bietet die Möglichkeit, den Aufbau einer Diffusionsbarriere im zeitlichen Verlauf der Modellentwicklung festzustellen. Durch Ausbildung von interzellulären tight-junctions sinkt die Ionenpermeabilität, welche durch die TEER-Wert Messung bestimmt werden kann, wodurch auf die Ausprägung der Diffusionsbarriere geschlossen wird. Je größer eine solche Barriere, desto höher der ohmsche Widerstand durch barrierebildende Zellschichten. Die Einheit der TEER-Werte ist $\Omega \cdot \text{cm}^2$. Die erhobenen Daten sind innerhalb der einzelnen Modellversuchsreihen gemittelt und entsprechend des Kultivierungstages 2, 5, 8, und 12, an dem die Messungen durchgeführt wurden, auf der x-Achse eingeteilt. Die Ergebnisse der Messung werden in Abbildung 10 dargestellt. Um eine Gesamtübersicht der ermittelten TEER-Werte aus allen Modellversuchsreihen zu gewinnen und diese miteinander zu vergleichen, wurden in einer Graphik die Ergebnisse der einzelnen Modellversuchsreihen für die jeweilige Modellart dargestellt. Die für die

Ergebnisse

jeweiligen Versuchsreihen an dem entsprechenden Messtag ermittelten Leerwerte wurden von den gemessenen Werte vor Einbezug in die Graphiken abgezogen. Da für Modellversuchsreihe 1 und 2 kein Leerwert ermittelt wurde, wurden die bei Modellversuchsreihe 3 und 4 ermittelten Leerwerte gemittelt und diese Werte dann von den gemessenen Werten in Modellversuchsreihe 1 und 2 abgezogen. Sich ergebende Negativwerte wurden dann als Wert 0 in die Graphik mit einbezogen.

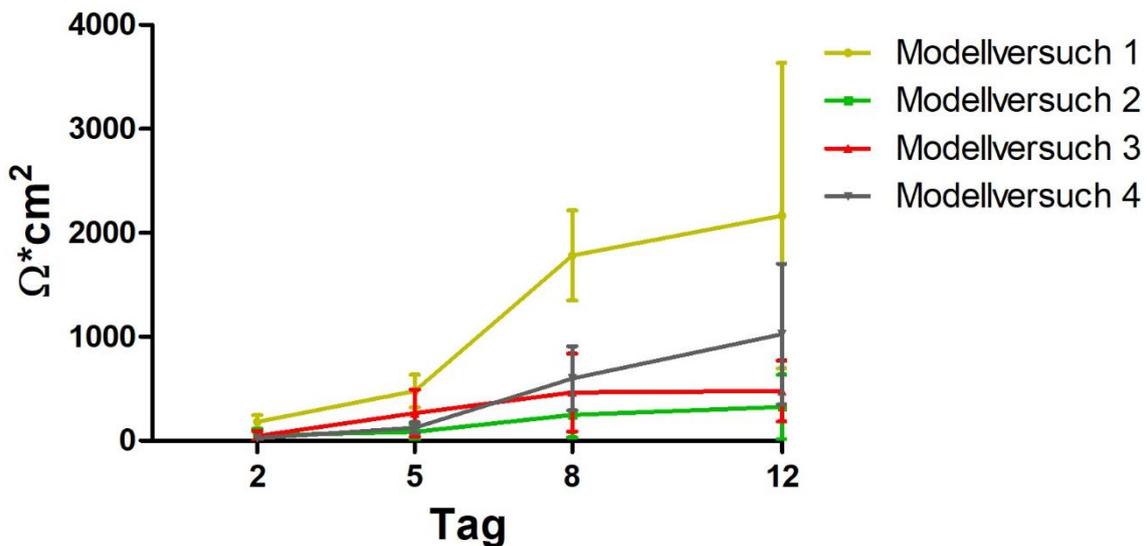


Abbildung 10: Kontrollmodell - graphische Darstellung der Entwicklung des TEER-Wertes der einzelnen Modellversuche ab dem Zeitpunkt der ALI-Kultivierung

Gezeigt wird die Entwicklung der TEER-Werte der Kontrollmodelle aus allen durchgeführten Modellversuchsreihen eins bis vier. Aus den Einzelmesswerten der 2-3 Kontrollmodelle pro Versuchsreihe wurden jeweils Mittelwerte errechnet und für die Graphik samt Standardabweichung verwendet. Die erhobenen, gemittelten Daten sind entsprechend des Kultivierungstages 2, 5, 8, und 12, an dem die Messungen durchgeführt wurden, auf der x-Achse eingeteilt. Der gelbe Graph verbindet dabei die Mittelwerte aus Modellversuch 1, der grüne Graph die Mittelwerte aus Modellversuch 2, der rote Graph die Mittelwerte aus Modellversuch 3 und der graue Graph die Mittelwerte aus Modellversuch 4. Die Standardabweichung wird durch die vertikalen Balken am jeweiligen Messtag dargestellt.

Der Graph der TEER-Werte der Kontrollmodelle zeigt einen deutlichen Anstieg des TEER-Wertes im zeitlichen Verlauf des Modellversuchs. Dabei ist zu beobachten, dass sich der Wert in allen Modellversuchsreihen vom Zeitpunkt der ersten Messung bis hin zum Zeitpunkt der Modellfixierung kontinuierlich vergrößert, was für die Ausbildung einer Diffusionsbarriere spricht.

4.4 Tumormodell - basierend auf OMÄ

Zur Generierung von Tumormodellen wurden unterschiedliche Methoden zur Integration von Tumorzellen in OMÄ angewandt. Zum einen brachte man an Tag 8 nach Applikation der Fibroblasten und deren Submerskultivierung ein Gemisch unterschiedlicher Konzentrationen aus Keratinozyten und RFP-transduzierten FaDu-Tumorzellen auf die Matrix auf und wechselte die Zellkronen nach 24 bis max. 26 h von der Submerskultivierung auf die ALI-Methode. Dieser Tag galt als Tag 0. Zum anderen wurden an Tag 5 nach ALI entweder Spots oder Sphäroide auf die mit Fibroblasten und reinen Keratinozyten besiedelte SIS/MUC-Matrix aufgebracht.

4.4.1 Tumormodelle durch Applikation der Tumorzellen mittels Spots

An Kultivierungstag 5 unter ALI-Kultivierung wurden Spots aus 2 µl RPMI-Medium, in dem 10 000 RFP-transduzierten FaDu-Tumorzellen gelöst waren auf die mit Fibroblasten besiedelte SIS/MUC appliziert. Nach einer gesamten Kultivierungsdauer von 21 Tagen wurden die Modelle fixiert und histologisch und immunhistochemisch genauer untersucht.

4.4.1.1 Histologische Charakterisierung

Die Tumormodelle (Abbildung 11) weisen ein gleichmäßig geschichtetes, verhornendes Plattenepithel auf, wie die Kontrollmodelle aus Abbildung 8. Es sind keine entarteten Zellen oder Schichten zu sehen, und es findet eine gleichmäßige Zellproliferation von basal an die Oberfläche statt. Wolkig erscheinende Gebilde an der Grenze der Lamina propria zum Epithel (s. Abbildung 11B, schwarzer Pfeil) sind in den Modellen, die durch Spots generiert wurden vermehrt sichtbar.

Ergebnisse

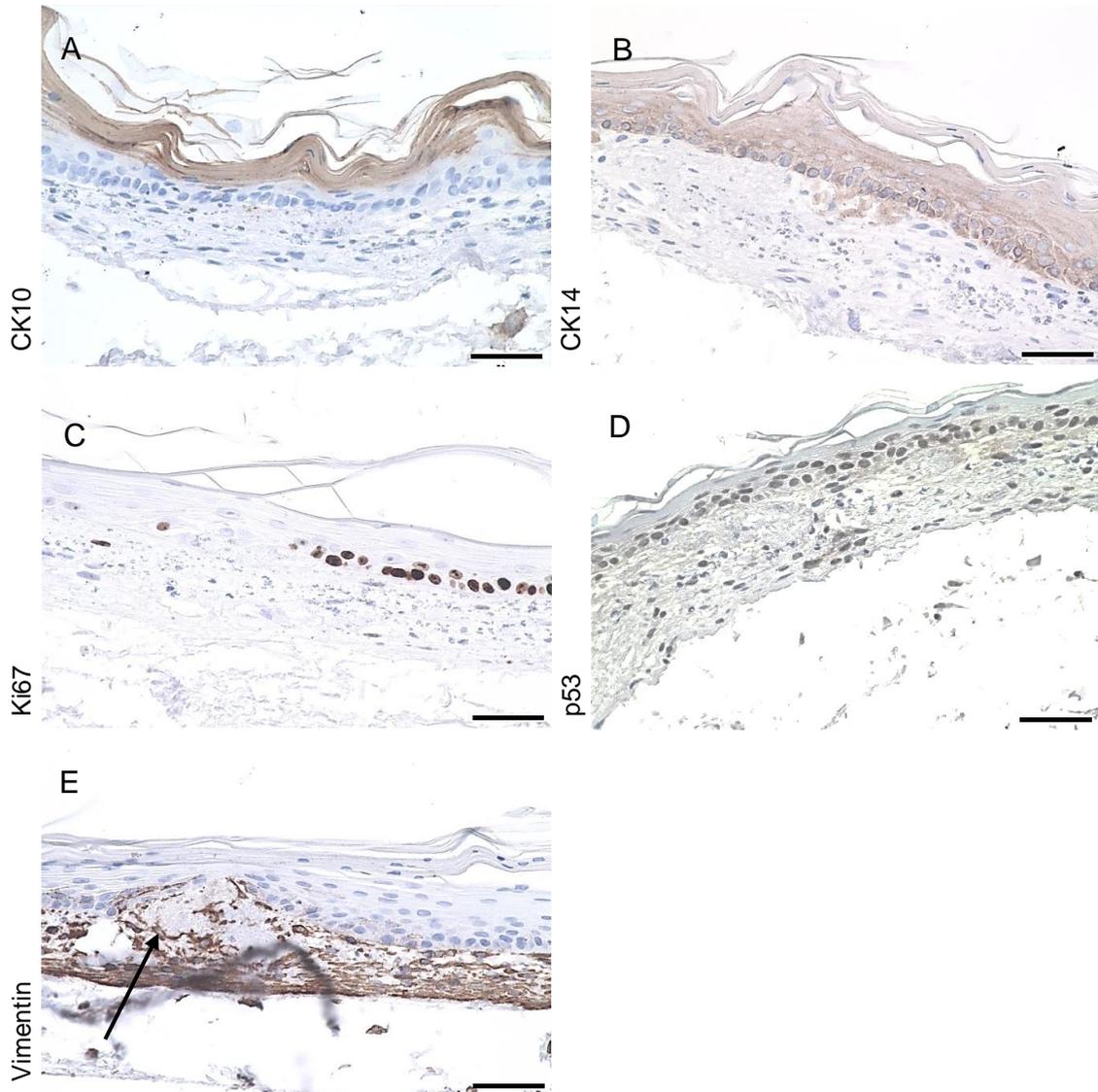


Abbildung 12: Immunhistochemische Charakterisierung von Tumormodellen, generiert durch Applikation von Spots auf OMÄ

Abbildung 12 zeigt immunhistochemische Färbungen mit den Markern CK10 (A), CK14 (B), Ki67 (C), p53 (D) und Vimentin (E) der Tumormodelle, generiert durch Applikation von Spots aus RFP-transduzierten FaDu-Zellen basierend auf SIS/MUC. Der schwarze Pfeil in Abbildung E kennzeichnet ein amorphes, fibroblastenfreies Gebilde. Die Größenbalken entsprechen einer Länge von jeweils 50 μm .

4.4.1.3 TEER-Wert Messung

Bei den Tumormodellen, generiert durch Applikation von Spots, zeigt der TEER-Wert ebenfalls eine kontinuierlich ansteigende Tendenz (s. Abbildung 13). Auch hier fand eine deutliche Entwicklung einer Diffusionsbarriere statt. Einziger

Ergebnisse

Ausreißer ist dabei die Entwicklung der TEER-Werte aus Modellversuch 3, die nach Tag 8 wieder abfallen.

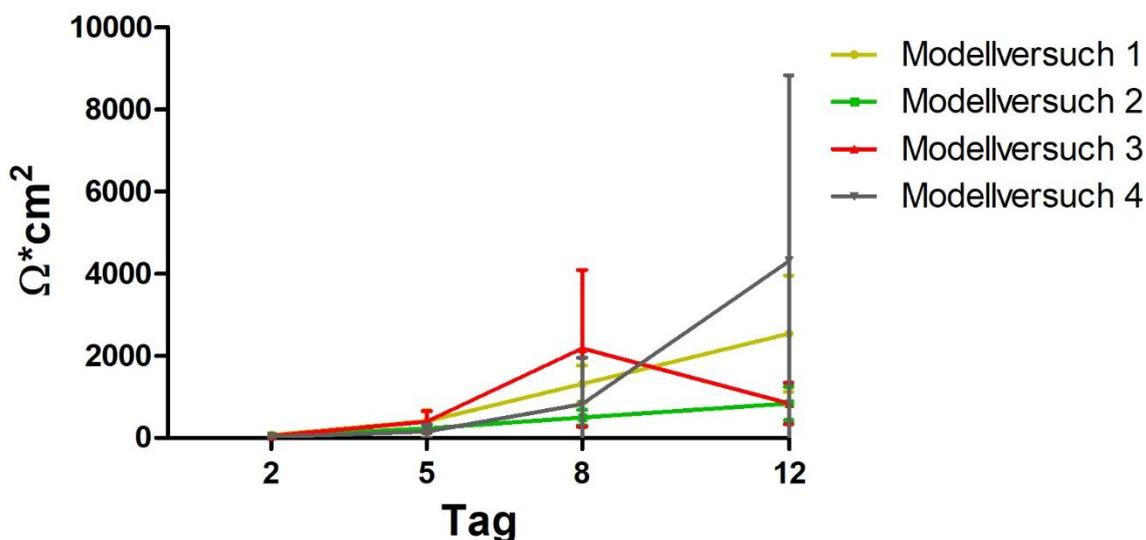


Abbildung 13: Tumormodell, generiert durch Applikation von Spots - graphische Darstellung der Entwicklung des TEER-Wertes der einzelnen Modellversuche ab dem Zeitpunkt der ALI-Kultivierung

Gezeigt wird die Entwicklung der TEER-Werte der Tumormodelle, generiert durch Applikation von Spots, aus allen durchgeführten Modellversuchsreihen eins bis vier. Aus den Einzelmesswerten der 2-3 Spotmodelle pro Versuchsreihe wurden Mittelwerte errechnet und für die Graphik samt Standardabweichung verwendet. Die erhobenen, gemittelten Daten sind entsprechend des Kultivierungstages 2, 5, 8, und 12, an dem die Messungen durchgeführt wurden, auf der x-Achse eingeteilt. Der gelbe Graph verbindet dabei die Mittelwerte aus Modellversuch 1, der grüne Graph die Mittelwerte aus Modellversuch 2, der rote Graph die Mittelwerte aus Modellversuch 3 und der graue Graph die Mittelwerte aus Modellversuch 4. Die Standardabweichung wird durch die vertikalen Balken am jeweiligen Messtag dargestellt.

4.4.2 Tumormodelle durch Applikation von Tumorzellsphäroiden

Die Applikation der Tumorzellsphäroide fand, wie die Applikation der Spots, an Kultivierungstag 5 der ALI-Kultivierung statt. Die 3 Tage zuvor auf Agarose-Gel generierten Sphäroide (s. Abbildung 14) wurden mittels einer sterilen Pipette auf das OMÄ überführt und die Modelle nach einer Kultivierungsdauer von insgesamt 21 Tagen fixiert und histologisch und immunhistochemisch analysiert.

Ergebnisse

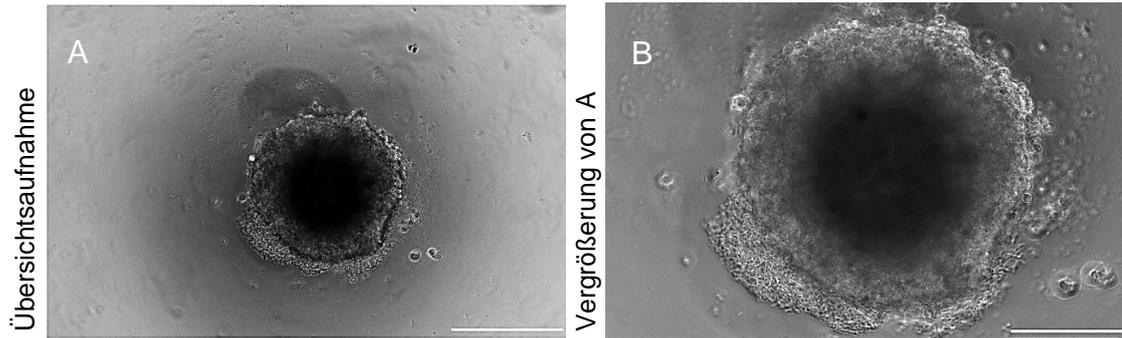


Abbildung 14: Multizelluläre Tumorsphäroide aus RFP-transduzierten FaDu-Zellen

Abbildung 14 zeigt multizelluläre Tumorsphäroide aus RFP-transduzierten FaDu-Zellen in unterschiedlicher Vergrößerung. Der Größenbalken in Abbildung A entspricht 400 µm und in Abbildung B 200 µm

4.4.2.1 Histologische Charakterisierung

Die H.E.-Übersichtsfärbungen in Abbildung 15 eines Tumormodells, welches mittels Applikation von Sphäroiden generiert wurde, zeigt deutlich den Anschnitt eines Sphäroids, der auf dem OMÄ aufsitzt (s. Abbildung 15A, schwarzer Rahmen).

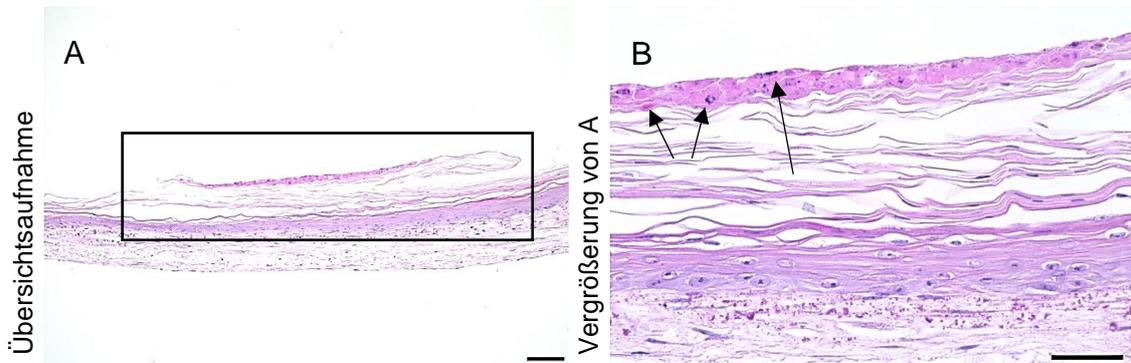


Abbildung 15: H.E.-Übersichtsfärbung eines Tumormodells, generiert durch Applikation von Tumorzellsphäroiden auf OMÄ

Der schwarze Rahmen in Abbildung A zeigt einen auf dem OMÄ aufsitzenden Sphäroid, die drei schwarzen Pfeile in Abbildung B markieren apoptotische Zellen innerhalb des Sphäroids, die Kernschotter beinhalten. Der Größenbalken in Abbildung A entspricht einer Länge von 100 µm und in Abbildung B einer Länge von 50 µm.

Das direkt angrenzende, darunterliegende Stratum corneum ist intakt und auch die tieferliegenden Zellschichten und die sich darin befindlichen Zellen zeigen keinerlei Anzeichen von Dysplasie oder stärkerem malignen Entartungspotenzial. Die Tumorzellen innerhalb des Sphäroids sind nekrotisch, die apoptotischen

Ergebnisse

Zellen stellen sich eosinophil dar und beinhalten Kernschotter (s Abbildung 15B, schwarze Pfeile).

4.4.2.2 Immunhistologische Charakterisierung

Die durchgeführten immunhistologischen Färbungen färbten auch in diesem Tumormodell die entsprechenden Areale braun an. Die CK10 Färbung (s. Abbildung 16A) zeigt ein kontinuierlich verlaufendes Stratum corneum, auch im Bereich des aufsitzenden Sphäroids. Der Differenzierungsmarker CK14 (s. Abbildung 16B) zeigt geordnet positionierte basale Keratinozyten und die Vimentin-Färbung färbt eine durchgehend formierte, mit gleichmäßig verteilten Fibroblasten besiedelte Lamina propria an (s Abbildung 16C).

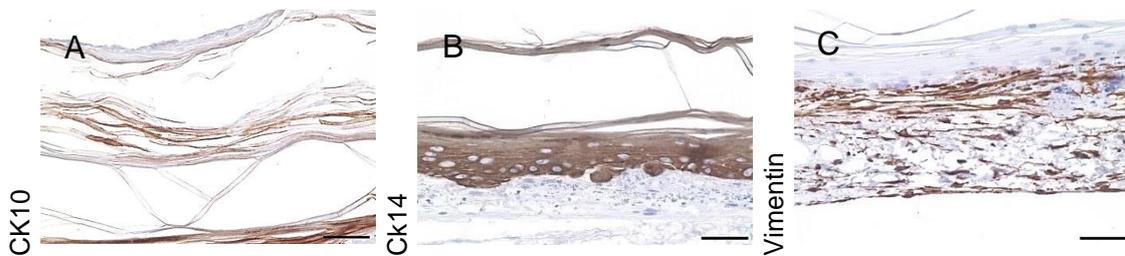


Abbildung 16: Immunhistochemische Charakterisierung von Tumormodellen, generiert durch Applikation von Tumorzellsphäroiden auf OMÄ

Gezeigt werden immunhistochemische Färbungen mit den Markern CK10 (A), CK14 (B) und Vimentin (C) der Tumormodelle, generiert durch Applikation von Sphäroiden aus RFP-transduzierten FaDu-Zellen. Die Größenbalken entsprechen einer Länge von jeweils 50 µm.

4.4.2.3 TEER-Wert Messung

Die Ergebnisse der TEER-Wert Messungen bei einem Tumormodell, das mittels Applikation von Sphäroiden generiert wurde, sind in Abbildung 17 dargestellt. Im Allgemeinen ist bis zu Tag 8 nach Beginn der ALI-Methode ein kontinuierlicher Anstieg der TEER-Werte aller Modellversuchsreihen zu vermerken, danach fällt der TEER-Wert im Mittel bei allen Modellversuchsreihen, außer in Modellversuch 4 wieder ab.

Ergebnisse

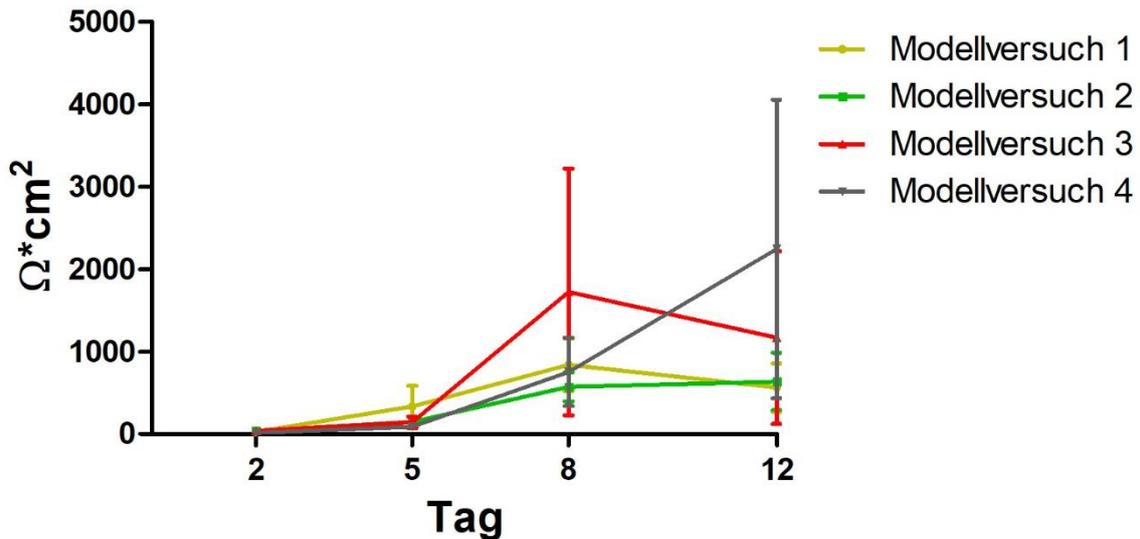


Abbildung 17: Tumormodell, generiert durch Applikation von Sphäroiden - graphische Darstellung der Entwicklung des TEER-Wertes der einzelnen Modellversuche

Gezeigt wird die Entwicklung der TEER-Werte der Tumormodelle, generiert durch Applikation von Sphäroiden, aus allen durchgeführten Modellversuchsreihen eins bis vier. Aus den Einzelmesswerten der 2-3 Sphäroidmodelle pro Versuchsreihe wurden jeweils Mittelwerte errechnet und für die Graphik samt Standardabweichung verwendet. Die erhobenen, gemittelten Daten sind entsprechend des Kultivierungstages 2, 5, 8, und 12, an dem die Messungen durchgeführt wurden, auf der x-Achse eingeteilt. Der gelbe Graph verbindet dabei die Mittelwerte aus Modellversuch 1, der grüne Graph die Mittelwerte aus Modellversuch 2, der rote Graph die Mittelwerte aus Modellversuch 3 und der graue Graph die Mittelwerte aus Modellversuch 4. Die Standardabweichung wird durch die vertikalen Balken am jeweiligen Messtag dargestellt.

4.4.3 Tumormodelle durch Applikation eines Gemisches aus RFP-transduzierten FaDu-Zellen und primären Keratinozyten in unterschiedlichen Konzentrationen

Eine weitere Methode, um ein Tumormodell auf Basis eines OMÄ mit SIS/MUC als Matrix zu generieren, war die Applikation eines Gemisches aus primär isolierten Keratinozyten und RFP-transduzierten FaDu-Zellen. Dabei wurden unterschiedliche Konzentrationsverhältnisse 1:50, 1:33, 1:25 und 1:10 aus Tumorzellen und primären Keratinozyten getestet. Die Applikation des Gemisches auf die zuvor mit primären Fibroblasten besiedelte SIS/MUC-Matrix fand an Tag 8 statt. Es folgte ein weiterer Tag unter Submerskultivierung, bevor nach 24 h bis max. 26 h auf die ALI-Methode umgestellt wurde. Nach einer Kultivierungsdauer von insgesamt 21 Tagen, wurden die Modelle fixiert und histologisch, sowie immunhistochemisch untersucht.

4.4.3.1 Histologische Charakterisierung

Die histologischen Übersichtsfärbungen der Modelle, die mit verschiedenen Konzentrationsverhältnissen zwischen Tumorzellen und primären Keratinozyten angesetzt wurden, unterscheiden sich in ihrer Morphologie erheblich (vgl. Abbildung 18, Abbildung 19, Abbildung 20, Abbildung 22).

So zeichnet sich in dem Aufbau des Tumormodelles im Konzentrationsverhältnis von **1:50** eine eher verringerte Schichtdicke des gesamten Modelles, auch im Vergleich zum apathologischen OMÄ basierend auf SIS/MUC ab (vgl. Abbildung 6). Das Stratum corneum ist durchgängig geschichtet, es finden sich ebenfalls apathologische Parakeratosen wieder. Die basaleren Zellschichten sind deutlich unausgeprägt, die Zellen im Stratum basale eng aneinandergereiht, von starker Größenvarianz und auch die reguläre Ausreifung der Zellen bleibt aus, ein Merkmal für hochpathologische Entwicklungsvorgänge. In der Lamina propria sind keine Invasionen von Tumorzellen zu beobachten, allerdings finden sich hier vermehrt amorphes, feingranulöses Material, ein Relikt von Fibroblasten (s. Abbildung 18B, schwarzer Rahmen).

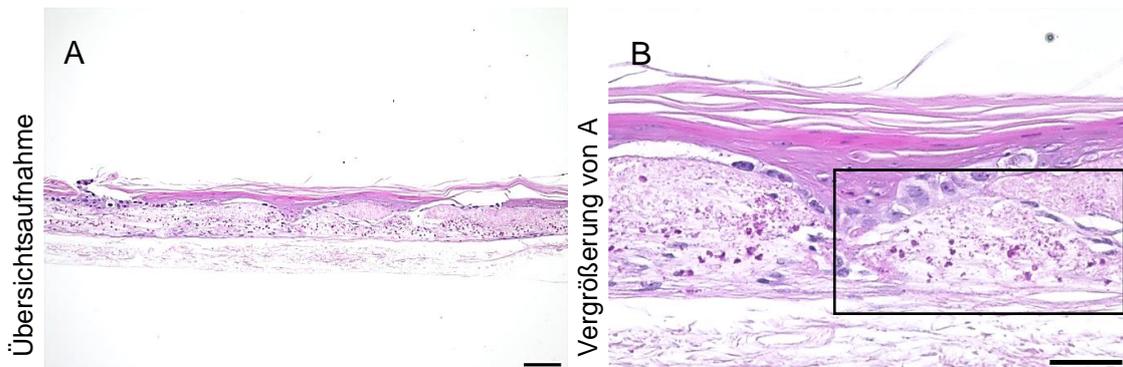


Abbildung 18: H.E.-Übersichtsfärbung von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis von 1:50 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)

Gezeigt wird ein Tumormodell, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Verhältnis 1:50. Der schwarze Rahmen in Abbildung B zeigt ein amorphes, fibroblastenfreies Gebilde. Der Größenbalken in Abbildung A entspricht einer Länge von 100 µm, in Abbildung B einer Länge von 50 µm.

Das Tumormodell, angelegt mit einem Mischungsverhältnis von **1:33**, zeigt einen regelhaften Aufbau, sowohl des Epithels, als auch der Lamina propria (s. Abbildung 19). Die Keratinozyten jedoch sind partiell sehr dicht und

Ergebnisse

unregelmäßig in der Region des Stratum basale aneinandergereiht. Es finden sich stellenweise dysplastische Areale wieder, welche sich anhand von Kern- und Zellpleomorphien (s. Abbildung 19B, schwarzer Kasten) zeigen. Die 10-fach Vergrößerung in Abbildung 19A zeigt vor allem im linken Bereich, in dem die Lamina propria klar ausgeprägt und erkennbar ist, keine Invasion von Tumorzellen in die Lamina propria.

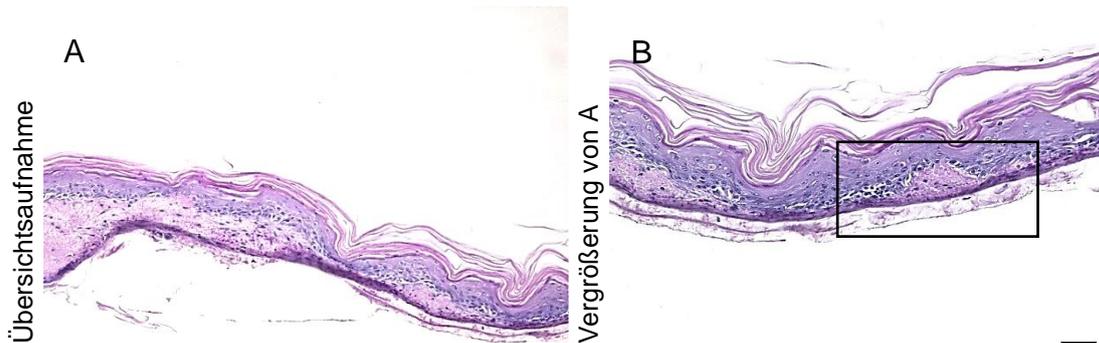


Abbildung 19: H.E.-Übersichtsfärbung von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis von 1:33 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)

Gezeigt wird ein Tumormodell, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Verhältnis 1:33. Der schwarze Rahmen in Abbildung B markiert ein dysplastisches Areal mit Zell- und Kernpleomorphismen. Der Größenbalken in Abbildung A entspricht einer Länge von 100 µm, in Abbildung B einer Länge von 50 µm.

Die Modelle mit einem geringeren Anteil an Tumorzellen im Verhältnis **1:50** sind eher vermindert entwickelt und weisen zwar regulär geschichtetes Epithel auf mit scheinbar wenig malignen Anzeichen. Dennoch sind überwiegend zumindest in den basaleren Zellschichten hochpathologische Merkmale zu finden. Die Modelle mit einem Mischungsverhältnis von **1:25** zeigen schon weitaus deutlichere Anzeichen fortgeschrittener Dysplasie oder sogar invasiven Wachstums. Wie in der H.E.-Übersichtsfärbung in Abbildung 20 zu sehen ist, verläuft das Stratum corneum nach wie vor kontinuierlich und besitzt einen regelhaften Aufbau. Allerdings ist die Architektur des Epithelaufbaus unterhalb des Stratum corneum deutlich gestört. So findet eine klare Plattenepitheldifferenzierung mit Entartungstendenz statt. Zytologische Atypien in Form von Zell- und Kernpleomorphismen sind zu sehen (s. Abbildung 20B, schwarzer Rahmen). Eindeutig erkennbar ist hier die Invasivität und Durchbrechung der Basallamina,

Ergebnisse

sowie die Infiltration von Tumorzellen in die Lamina propria (s. Abbildung 20B, schwarzer Pfeil).

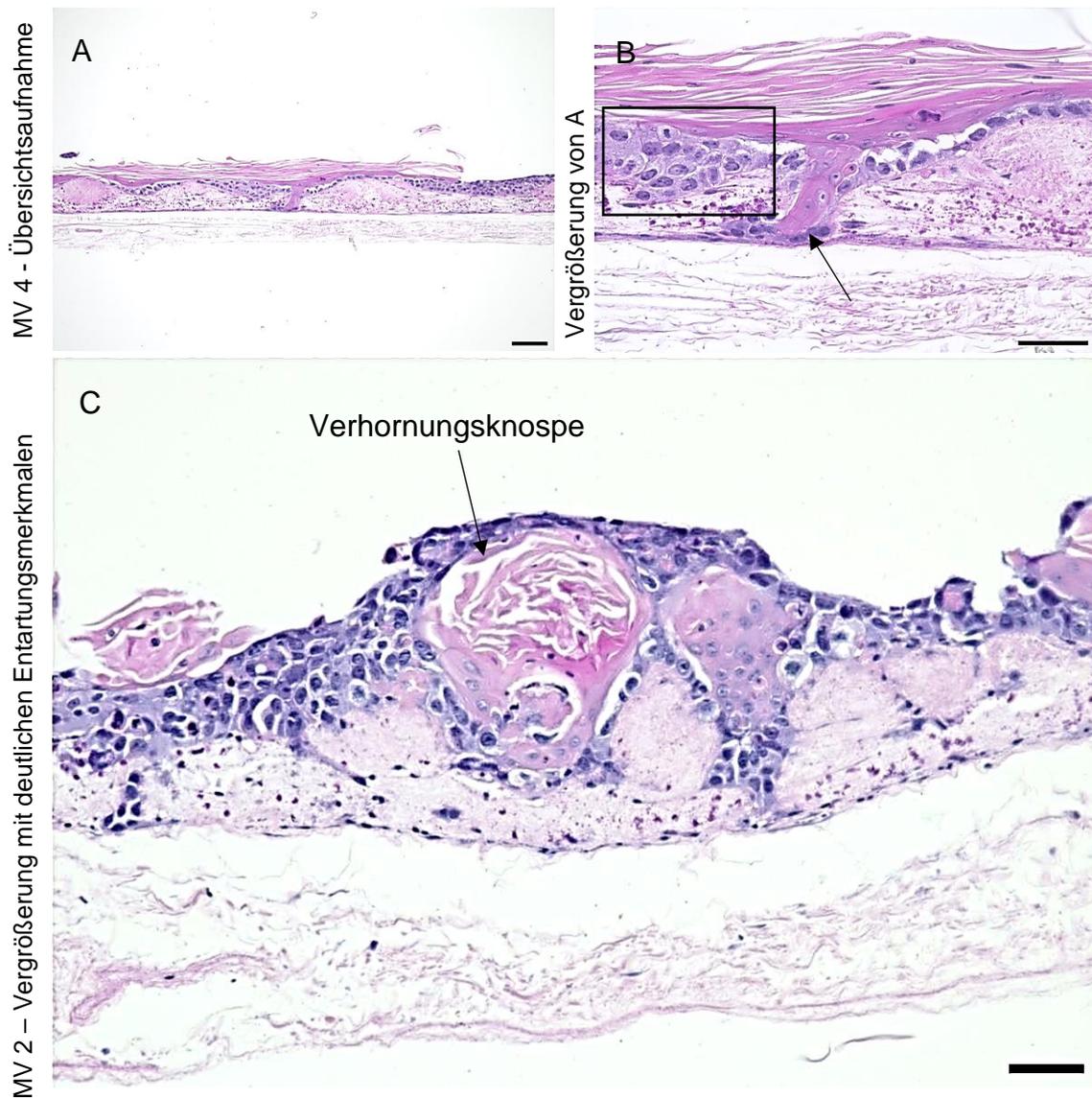


Abbildung 20: H.E.-Übersichtsfärbung von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis von 1:25 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)

Gezeigt wird ein Tumormodell, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Verhältnis 1:25. Abbildungen A und B entstammen von Modellen aus Modellversuch 4. Der schwarze Rahmen in (B) markiert zytologische Atypien in Form von Zell- und Kernpleomorphismen, der schwarze Pfeil in (B) zeigt die Durchbrechung der Basallamina, sowie die Infiltration von Tumorzellen in die Lamina propria. Abbildung C zeigt einen Ausschnitt eines Tumormodells aus Modellversuch 2, ebenfalls generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Verhältnis 1:25, ebenfalls mit deutlich sichtbaren Entartungsanzeichen. Der schwarze Pfeil markiert eine klar erkennbare Verhornungsknospe. MV ist die Abkürzung für Modellversuch. Der Größenbalken in (A) entspricht einer Länge von 100 μm , in (B) und (C) einer Länge von 50 μm .

Ergebnisse

Abbildung 21 zeigt den direkten Vergleich zwischen HE-Färbung (Abbildung 21A) und Darstellung der fluoreszierenden Anteile (Abbildung 21B) desselben Schnittes mittels des TRITC-Filters. Auch in dieser Abbildung sind lediglich eigenfluoreszente verhornte Kompartimente, wie die Verhornungsknospe selbst zu sehen. Einzelne fluoreszierende Zellen in den restlichen epithelialen Anteilen sind nicht eindeutig identifizierbar

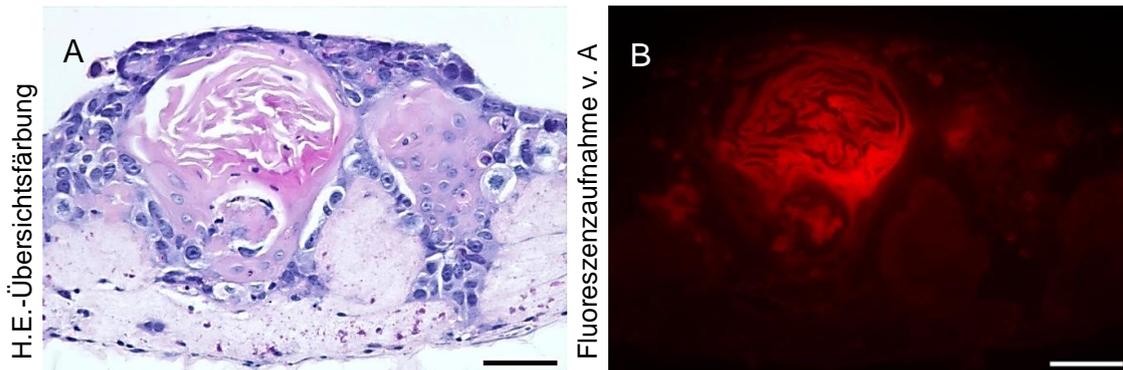


Abbildung 21: H.E.-Übersichtsfärbung von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis von 1:25 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten) und Darstellung mit dem Fluoreszenzmikroskop

Gezeigt wird eine H.E.-Färbung des Tumormodells (A), generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und FaDu-Tumorzellen im Mischungsverhältnis von 1:25 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten). Abbildung B ist eine Aufnahme, welche unter Anwendung des TRITC-Filters im Keyence Mikroskop angefertigt wurde. In Abbildung B zeigt sich die Hornstruktur innerhalb der Verhornungsknospe mit einer hohen Eigenfluoreszenz. Die Größenbalken entsprechen einer Länge von jeweils 50 μm .

Tumormodelle mit dem Mischungsverhältnis **1:10** (s. Abbildung 22) zeigen durchgehend eine deutliche Entartungstendenz mit ausgeprägter Architekturstörung. Es finden sich klare Anzeichen von Malignität wieder. So weist das Stratum corneum keine Kontinuität auf und zeigt sich mit einer kompletten Architekturstörung. Keratinozyten befinden sich ungeordnet mit großer Zell- und Kerngrößenvarianz in den tieferliegenden suprabasalen Zellschichten. Suprabasale Mitosen, sowie Einzelzelldyskeratosen und Verhornungsknospen, wie sie deutlich in Abbildung 20C dargestellt sind, sind erkennbar. Ein invasives Wachstum in das darunterliegende Bindegewebe ist ebenfalls zu verzeichnen.

Ergebnisse

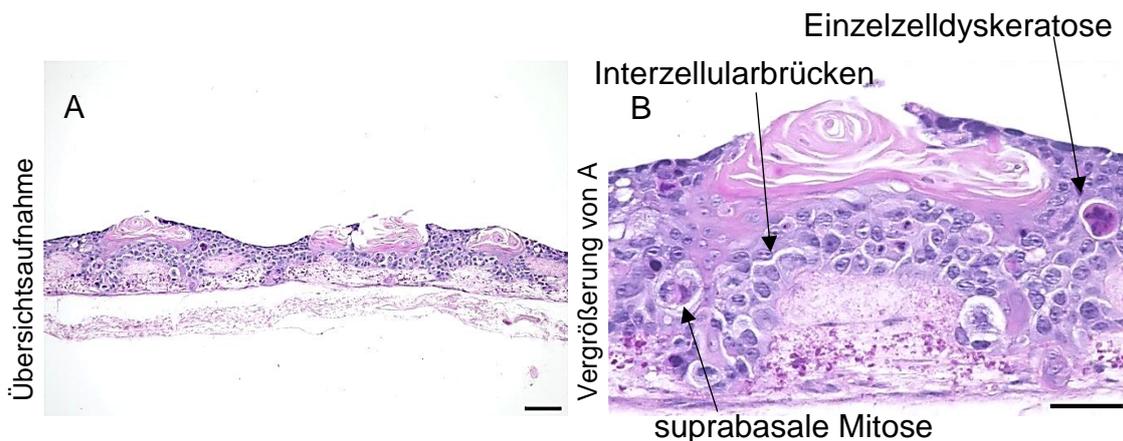


Abbildung 22: H.E.-Übersichtsfärbung von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis von 1:10 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)

Gezeigt wird ein Tumormodell generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Verhältnis 1:10. Die schwarzen Pfeile in Abbildung B zeigen Entartungsanzeichen wie Interzellularbrücken, eine Einzelzelldyskeratose und suprabasale Mitosen. Der Größenbalken in Abbildung A entspricht einer Länge von 100 µm, in Abbildung B einer Länge von 50 µm.

4.4.3.2 Immunhistologische Charakterisierung

Die immunhistochemischen Färbungen der Tumormodelle, welche mit einem Tumorzellen-Keratinozyten-Gemisch mit dem Mischungsverhältnis **1:50** angesetzt wurden, zeigen im Bereich des Epithels bei der Färbung mit dem nukleären Marker Ki67 (Abbildung 23A) eine deutliche und intensive Braunfärbung. Die Zellen sind in allen Epithelschichten durchgehend braun gefärbt, von basal bis hin zur Oberfläche, was eine irreguläre Färbung im Vergleich zu gesunder Mundschleimhaut darstellt und zumindest dysplastische Anzeichen innerhalb des Modells bestätigt. Eine erhöhte Expression von p53 in der Abbildung 23B ist in diesem Tumormodell ebenfalls im Vergleich zur p53-Färbung im Kontrollmodell (s. Abbildung 8D) nachzuweisen. Der Bereich der Lamina propria wird mittels des mesenchymalen Markers Vimentin durchgehend und regelmäßig braun angefärbt (s. Abbildung 23C) und weist keine apathologischen Merkmale auf, die für ein invasives Wachstum von tumorösen Erscheinungen sprechen würden.

Ergebnisse

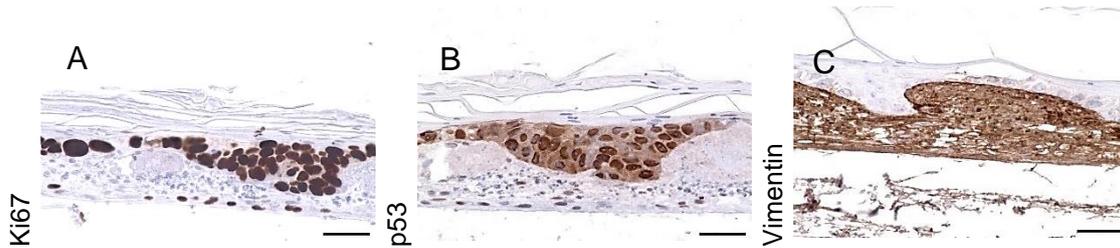


Abbildung 23: Immunhistochemische Färbung von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis 1:50 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)

Gezeigt werden Tumormodelle, basierend auf OMÄ mit SIS/MUC als Matrix, generiert durch Applikation eines Zellgemisches von primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis 1:50 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten). Abgebildet sind immunhistochemische Färbungen der primären Antikörper des Proliferationsmarkers Ki67 (A), des Markers des p53 (B) und des mesenchymalen Markers Vimentin (C). Die Größenbalken in den Abbildungen A-C entsprechen einer Länge von jeweils 50 µm.

Die IHC-Färbungen der Tumormodelle mit dem Mischungsverhältnis **1:33** zeigen sich in den Färbungen der epithelialen Marker gänzlich so wie erwartet (s. Abbildung 24). So wird durch die Differenzierungsmarker CK10 das kontinuierlich verlaufende, regelhaft gebildete Stratum corneum braun angefärbt (s. Abbildung 24A), sowie die perinukleären Strukturen der basalen Keratinozyten der darunterliegenden Epithelschichten durch den Differenzierungsmarker CK14 eingefärbt (s. Abbildung 24B). Der Ki67-Marker färbt in Abbildung 24C die basalen Keratinozyten an, die sich oberhalb befindlichen Zellen werden nicht angefärbt. Der Marker der Basallamina, das Kollagen IV, zeigt in den Abbildung 24D zwar eine durchgängige Braunfärbung der Lamina propria, allerdings sind keratinozytäre Zellinseln innerhalb dieser Schicht nicht von der Färbung betroffen (s. Abbildung 24D, schwarzer Pfeil) und die Basallamina erscheint in manchen Bereichen nicht in völliger Kontinuität (s. Abbildung 24D, schwarzer Kasten).

Ergebnisse

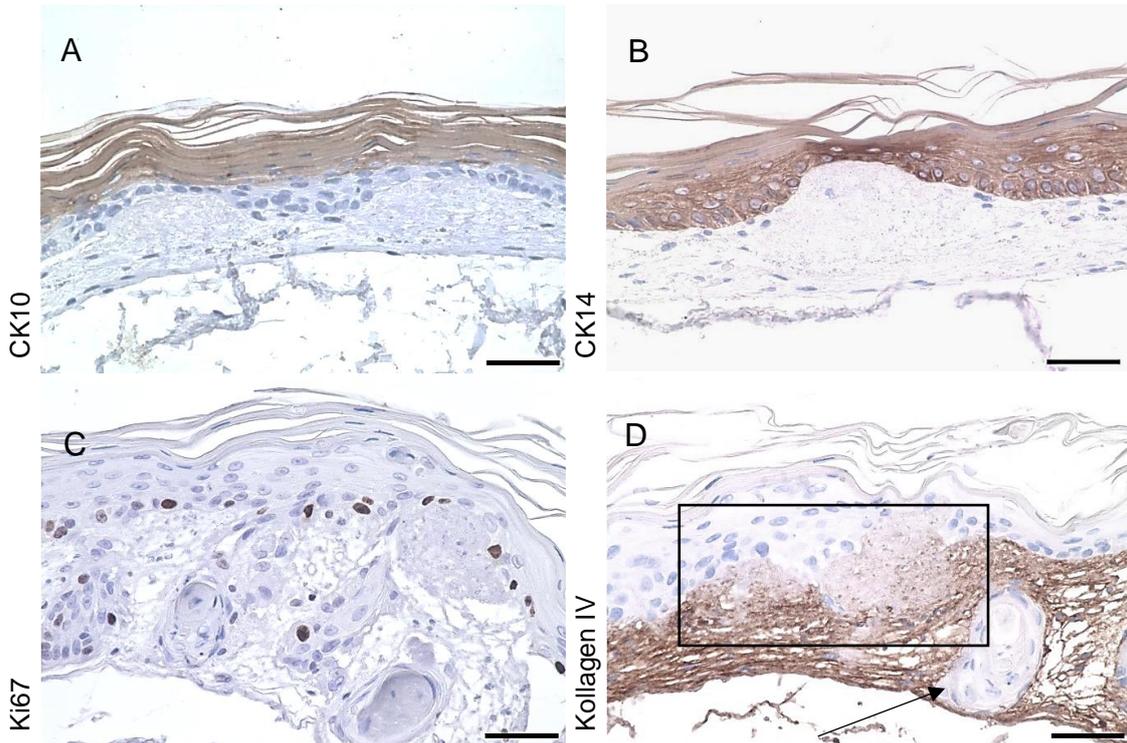


Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis 1:33 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)

Gezeigt werden Tumormodelle, basierend auf OMÄ mit SIS/MUC als Matrix, generiert durch Applikation eines Zellgemisches von primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis 1:33 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten). Abgebildet sind immunhistochemische Färbungen der primären Antikörper CK10 (A), CK14 (B), Ki67 (C) und des mesenchymalen Markers Kollagen IV (D). Der schwarze Rahmen in (D) markiert einen Abschnitt, in dem die Kontinuität der Basalmembran unterbrochen ist, der schwarze Pfeil in (D) markiert atypisch lokalisierte, keratinozytäre Zellinseln. Die Größenbalken in den Abbildungen A-D entsprechen einer Länge von jeweils 50 µm.

Die Tumormodelle mit dem Mischungsverhältnis von **1:25** weisen im Vergleich zu den Modellen mit einem größeren Mischungsverhältnis sowohl im epithelialen, als auch im bindegewebigen Anteil deutlich mehr und eindeutiger Anzeichen von Malignität auf. Die Differenzierungsmarker CK10 und CK14 in Abbildung 25A und B zeigen deutliche architektonische Störungen in den suprabasalen Schichten. So zeigt sich keine kontinuierliche Verhornung des Stratum corneum mehr und auch die tieferliegenden Schichten der Lamina propria zeigen einen ungeordneten Aufbau der suprabasalen Zellschichten und invasive Anteile (Abbildung 25B, schwarzer Pfeil). Die Färbung des Proliferationsmarkers Ki67 weist sich differenzierende Zellen in allen Epithelschichten auf. Die Zellen erscheinen in ungeordneter Anordnung mit ausgeprägtem Zell- und

Ergebnisse

Kernpleomorphismus. Zellinseln liegen sogar dem Stratum corneum auf, was für eine stark ausgeprägte Architekturstörung spricht (s. Abbildung 25C). Ebenso ist eine verstärkte nukleäre Anfärbung des p53-Proteins in den suprabasalen Zellen in Abbildung 25D zu sehen.

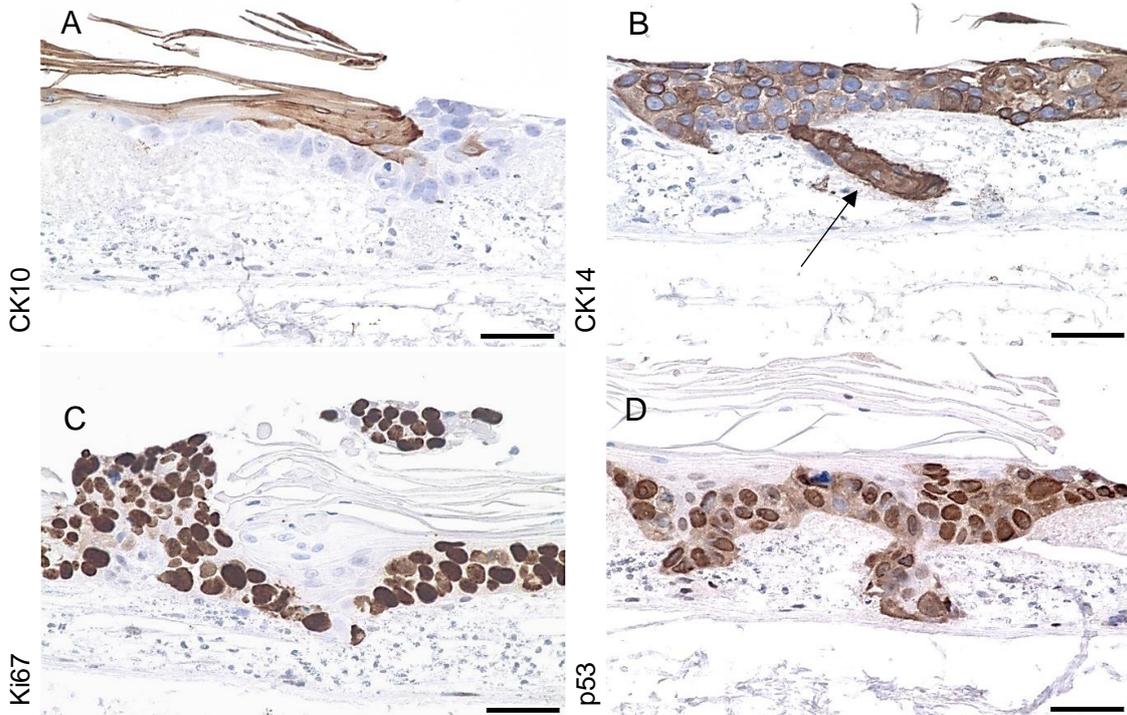


Abbildung 25: Immunhistochemische Färbung epidermaler Anteile von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis 1:25 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)

Gezeigt werden Tumormodelle, basierend auf OMÄ mit SIS/MUC als Matrix, generiert durch Applikation eines Zellgemisches von primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis 1:25 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten). Abgebildet sind immunhistochemische Färbungen der primären Antikörper CK10 (A), CK14 (B), Ki67 (C) und p53 (D). Der schwarze Pfeil in Abbildung B markiert einen invasiven zellulären, epidermalen Anteil in tiefere Schichten der Lamina propria. Die Größenbalken in den Abbildungen A-D entsprechen einer Länge von jeweils 50 μm .

Anfärbungen mittels der mesenchymalen Marker Kollagen IV und Vimentin zeigen die Invasion des Plattenepithelkarzinoms in die Lamina propria (s. Abbildung 26A und B).

Ergebnisse

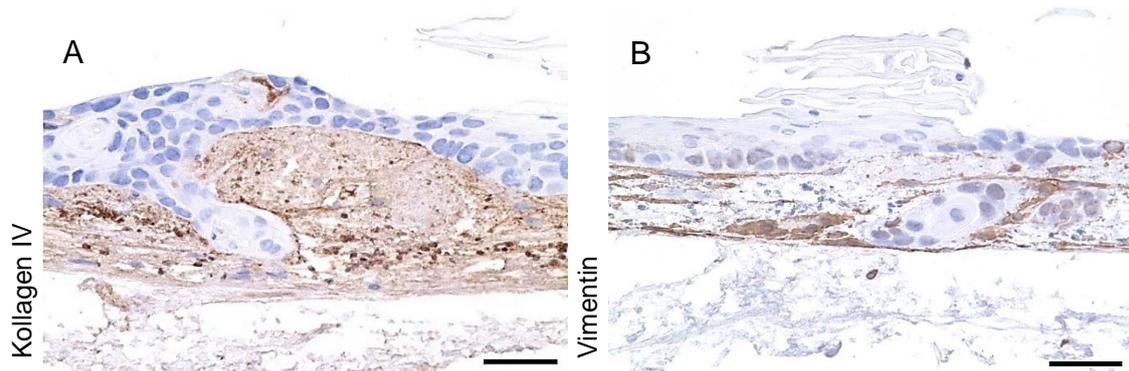


Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung dermalen Anteile von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis 1:25 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)

Gezeigt werden immunhistochemische Färbungen von Tumormodellen, basierend auf OMÄ mit SIS/MUC als Matrix, generiert durch Applikation eines Gemisches aus Tumorzellen und primären Keratinozyten im Verhältnis 1:25. Abgebildet sind immunhistochemische Färbungen der primären Antikörper des Basalmembranmarkers Kollagen IV (A) und des mesenchymalen Markers Vimentin (B). Die Größenbalken in den Abbildungen A+B entsprechen einer Länge von jeweils 50 µm.

Tumormodelle mit dem Mischungsverhältnis von **1:10** zeigen anhand der immunhistochemischen Färbungen die gleichen Phänomene wie die Anfärbungen der Modelle mit dem Mischungsverhältnis von 1:25, allerdings in viel ausgeprägterer Form. Die Verhornungsstörungen des Stratum corneum sind noch deutlicher ausgeprägt, die Invasivität in die Lamina propria frequenter und an mehr Stellen vorhanden, als bei den Modellen des Mischungsverhältnisses von 1:25 (vgl. Abbildung 26 mit Abbildung 27E und F).

Ergebnisse

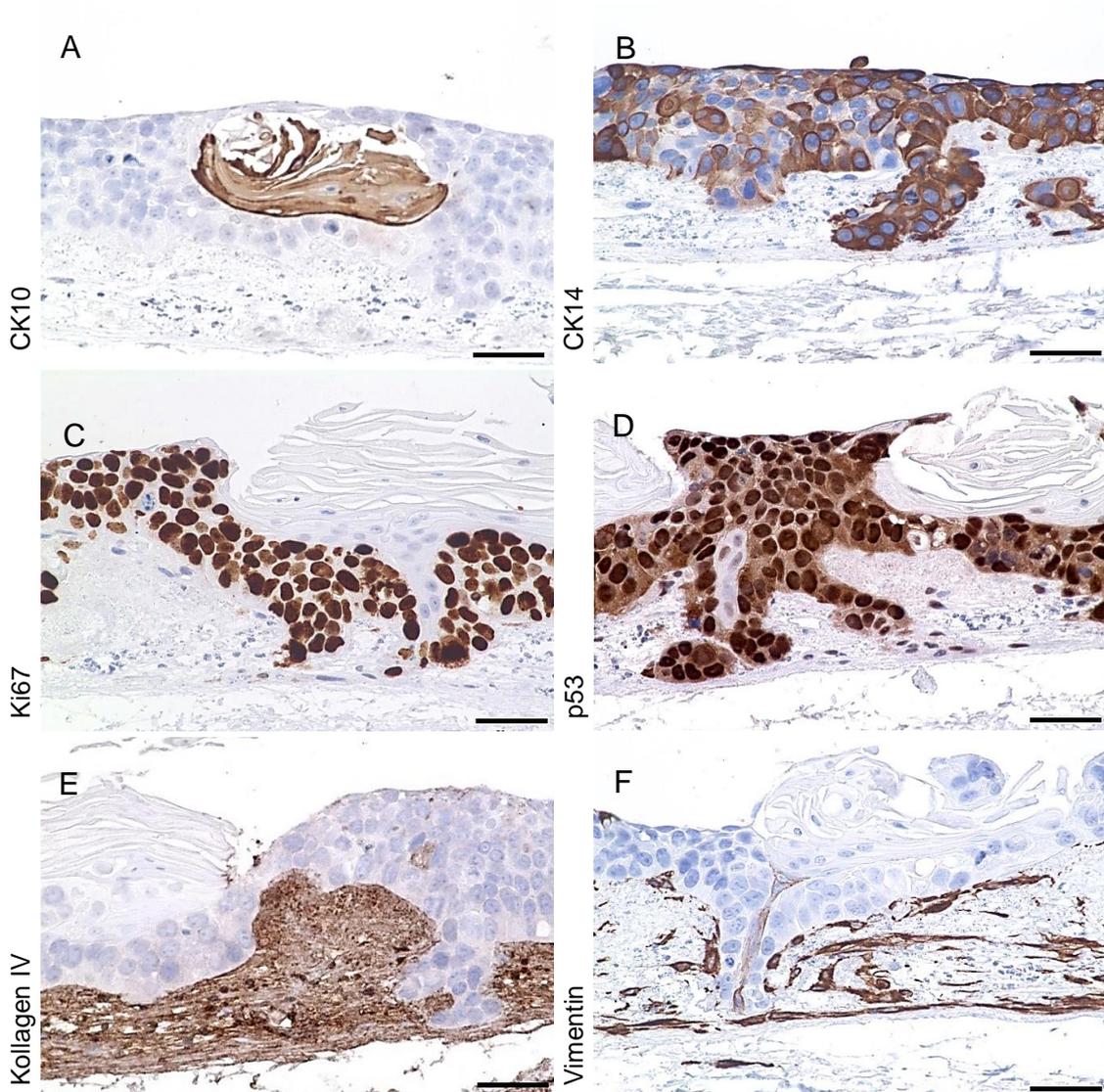


Abbildung 27: Immunhistochemische Färbung von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis 1:10 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)

Gezeigt werden Tumormodelle, basierend auf OMÄ mit SIS/MUC als Matrix, generiert durch Applikation eines Zellgemisches von primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis 1:10 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten). Abgebildet sind immunhistochemische Färbungen der primären Antikörper CK10 (A), CK14 (B), Ki67 (C), p53 (D), Kollagen IV (E) und Vimentin (F). Die Größenbalken in den Abbildungen A-F entsprechen einer Länge von jeweils 50 μm .

4.4.3.3 TEER-Wert Messung

Die Ergebnisse der TEER-Wert Messung der Tumormodelle, die durch Applikation eines Zellgemisches aus Tumorzellen und primären Keratinozyten in unterschiedlichen Verhältnissen generiert wurden, bewegen sich an allen

Ergebnisse

Messtagen im selben niedrigen Spektrum der Werte im Mittel zwischen $3,8 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und $130,1 \Omega \cdot \text{cm}^2$ (s. Abbildung 28).

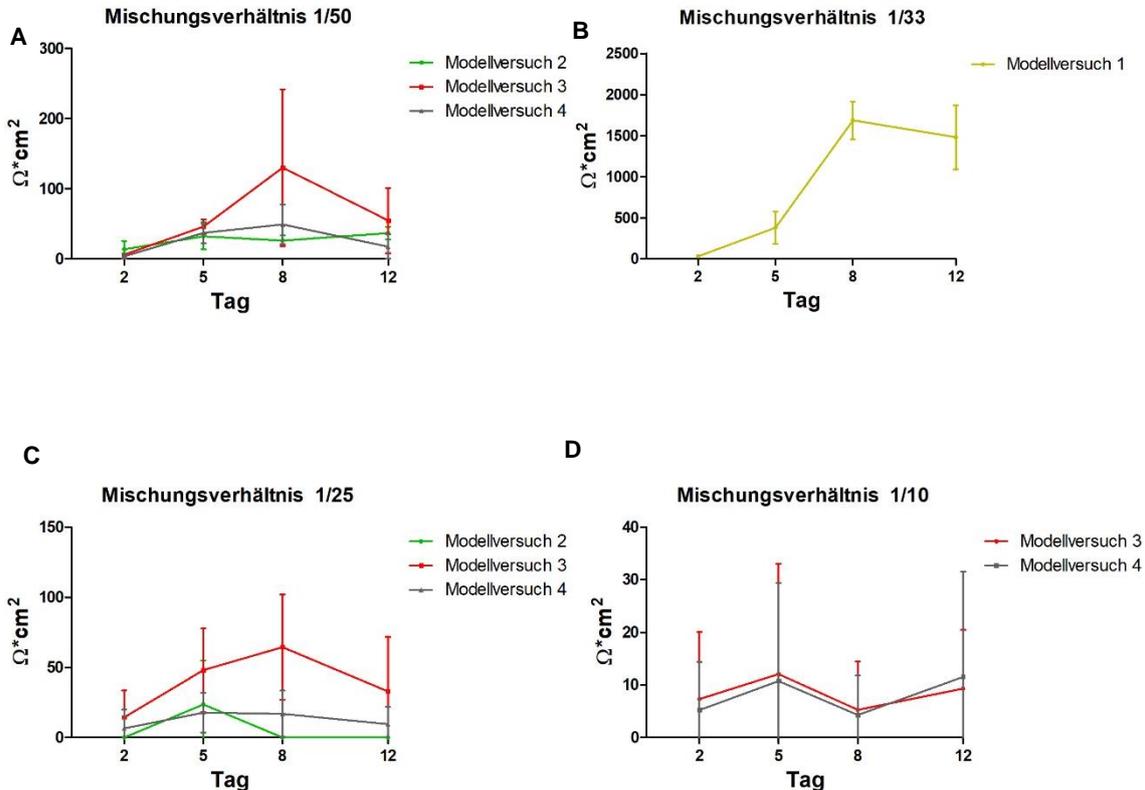


Abbildung 28: Graphische Darstellung des TEER-Werts der einzelnen Modellversuche eines Tumormodells, generiert durch Applikation eines Zellgemisches aus Tumorzellen und primären Keratinozyten im Verhältnis 1:50, 1:33, 1:25, 1:10 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)

Gezeigt wird die Entwicklung der TEER-Werte der Tumormodelle, generiert durch Applikation eines Zellgemisches aus Tumorzellen und primären Keratinozyten im Verhältnis 1:50 (A), 1:33 (B), 1:25 (C) und 1:10 (D), aus allen durchgeführten Modellversuchsreihen eins bis vier. Aus den Einzelmesswerten der 2-3 Tumormodelle pro Versuchsreihe wurden Mittelwerte errechnet und für die Graphik samt Standardabweichung verwendet. Die erhobenen, gemittelten Daten sind entsprechend des Kultivierungstages 2, 5, 8, und 12, an dem die Messungen durchgeführt wurden, auf der x-Achse eingeteilt. Der gelbe Graph verbindet dabei die Mittelwerte aus Modellversuch 1, der grüne Graph die Mittelwerte aus Modellversuch 2, der rote Graph die Mittelwerte aus Modellversuch 3 und der graue Graph die Mittelwerte aus Modellversuch 4. Die Standardabweichung wird durch die vertikalen Balken am jeweiligen Messtag dargestellt.

Allerdings werden die TEER-Werte immer niedriger, je höher die Konzentration der Tumorzellen in den Zellgemischen sind. Einzige Abweichungen sind hier bei Modellen mit dem Mischungsverhältnis von 1:33 festzustellen, die mittels anderen primären Zellen eines anderen Spenders in einem separaten Modellversuch aufgebaut wurden. Wie in Abbildung 28 zu sehen, steigen in diesem Modell, trotz nachgewiesener initialer Tumorbildung die Messwerte im

Ergebnisse

Mittel von $33,3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf $1688,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ um den Faktor 50,6 bis zu Tag 8 kontinuierlich an und fallen an Messtag 12 wieder auf den Mittelwert von $1481,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ab. Zu vermerken sei hierbei, dass Modelle mit dem Mischungsverhältnis 1:33 nur in der 2. Versuchsreihe angesetzt wurden.

5 Diskussion

5.1 Humanes orales Mukosaäquivalent basierend auf SIS/MUC als Grundlage zur Generierung eines Tumormodells

Da viele Studien bereits belegt haben, dass im Vergleich zu zweidimensionalen Modellen in dreidimensionalen Modellen Situationen realitätsnäher imitiert werden können, liegt das Hauptaugenmerk im Tissue Engineering auf der Entwicklung von 3D-Modellen [85, 94]. So können in 3D-Modellen mehr Informationen über beispielsweise die hierarchische Regulation von Zellen *in vitro* gewonnen werden als in Monolayerkulturen und es konnte bereits stärkeres Tumorstadium in 3D- als in 2D-Modellen festgestellt werden [85, 94]. Zellen können sich in dreidimensionaler Umgebung über Zell-Zell-Interaktionen organisieren, Gewebe formieren und sich differenzieren, was Studien ermöglicht, ebendiese Vorgänge genau zu analysieren [101].

Aus zuvor genannten Gründen wurde in dieser Arbeit versucht, auf Basis von der Matrix SIS/MUC, auf dem zuvor apathologische, OMÄ generiert wurden, ein dreidimensionales Tumormodell zu entwickeln, das die *in vivo* Situation eines Plattenepithelkarzinoms der Mundschleimhaut so realitätsnah wie möglich *in vitro* darstellt. Die SIS/MUC ist eine azelluläre, porcine Trägerstruktur, die aus dem Dünndarm von Schweinen gewonnen wird. Nach dem Prozess der Dezellularisierung des porcinen Dünndarms verbleibt eine Matrix, bestehend aus einer dicken Schicht aus quervernetzten Kollagen-, hauptsächlich Typ III und Typ I, und Elastinfasern, die sich in die einzelnen Schichten Stratum compactum, small intestinal submucosa (SIS), Tunica serosa und der Tunica muscularis externa mit dem arteriellen und venösen Gefäßnetz unterteilt [102, 103]. Im Gegensatz zur BioVasc® wurde bei der SIS/MUC das Gefäßsystem entfernt.

Die in dieser Arbeit entwickelten, nicht pathologischen OMÄ auf SIS/MUC weisen histologisch eine große Ähnlichkeit mit nativer Mundschleimhaut auf. Die OMÄ zeigen gleichmäßig gewachsenes Epithel, in dem charakteristisch alle Schichten – Stratum basale, spinosum, granulosum und corneum von basal nach superfizial- erkennbar sind. Die OMÄ sind mehrschichtig verhornt und weisen

allerdings im Vergleich zu nativer Mundschleimhaut eine geringere Schichtdicke des Epithels und der Lamina propria auf. Die in der Schicht des Stratum corneum befindlichen Zellkerne sind eher atypisch. Dies wird als sog. Parakeratose bezeichnet. Dieses Phänomen ist zwar bei normaler, gesunder Mundschleimhaut nicht anzutreffen, jedoch an mechanisch höher beanspruchten Stellen zeitweise durchaus zu beobachten. In den OMÄ ist dieses Phänomen zu vernachlässigen, da es für keinen überaus anormalen pathologischen Prozess oder Abweichungen in der Entwicklung des Epithels spricht. Die Lamina propria wird von Fibroblasten, die in das obere Drittel der SIS/MUC eingewandert sind gebildet. Der untere Anteil der SIS/MUC, welche histologisch die Tunica muscularis externa der Darmschleimhaut darstellt, ist weitestgehend frei von Zellen. Ursache hierfür könnte die derbe und damit schlecht von Fibroblasten infiltrierbare Beschaffenheit dieser Gewebsschicht sein.

Die immunhistologische Charakterisierung der OMÄ weist ebenfalls große Ähnlichkeiten zur nativen Mundschleimhaut auf. Die Färbung von Epithelbestandteilen mittels der Differenzierungsmarker CK10, ein Marker für supra-basale Zellen in verhornten Epithelschichten (Stratum corneum), CK14, ein Marker für basalere Epithelzellschichten, und auch der Proliferationsmarker Ki67 färbt, wie bei nativer Mundschleimhaut, zu erwartende Areale der OMÄ an. Diese Marker sind somit geeignet, um die einzelnen Epithelbestandteile immunhistologisch zu charakterisieren. Aktiv proliferierende Zellen befinden sich in der Mundschleimhaut lediglich im Stratum basale. Die reine nukleäre Positivität der basalen, sich aktiv proliferierender Zellen auf den Marker Ki67, wohingegen die Färbung zur Oberfläche hin ausbleibt, spricht für eine geordnete Entwicklung der Epithelschicht. Somit ist Ki67 ein geeigneter Marker zum Nachweis sich aktiv proliferierender Zellen. Bei dem Versuch, mit dem Marker Kollagen IV lediglich die Basalmembran anzufärben, färbte sich die gesamte Schicht der Lamina propria, sowie der Zellträger SIS/MUC braun, allerdings mit deutlicher Erkennbarkeit der Basalmembran. Dies könnte auf das natürliche Vorkommen von Kollagen IV in der SIS/MUC zurückzuführen sein, das Studien bereits nachgewiesen haben [104]. Zytokeratine sind Intermediärfilamente der Zellen der Epithelschichten, im Vergleich dazu ist Vimentin ein Intermediärfilament des

Bindegewebes. Vimentin färbte die Lamina propria der OMÄ durchgehend braun an, was für eine ebenfalls gleichmäßige Verteilung der Fibroblasten, in denen Vimentin exprimiert wird, spricht.

Zusammenfassend zeigten sowohl die histologischen, also auch die immunhistochemischen Untersuchungen der OMÄ, dass die verwendeten Marker geeignet zur Charakterisierung der generierten Modelle waren. Die OMÄ weisen, bezogen auf die architektonische Struktur der einzelnen Zellschichten, große Ähnlichkeit zur nativen humanen Mundschleimhaut *in vivo* auf. Sie bilden ein mehrschichtig verhorntes Plattenepithel, das der Lamina propria kontinuierlich aufliegt und durch die Basalmembran voneinander abgegrenzt wird. Die OMÄ stellen somit eine geeignete Grundlage dar, um eine Versuchsreihe zu starten, deren Ziel es ist, in dreidimensionaler Umgebung gesunder Mundschleimhautareale Plattenepithelkarzinommodelle zu generieren.

5.2 Eignung der RFP-Transduktion auf FaDu-Zellen zur Erleichterung der Identifikation von Tumorzellen innerhalb der Tumormodelle

Grundgedanke der Transduktion von FaDu-Tumorzellen mittels des RFP-Lentivirus war die damit zu erreichende Eigenfluoreszenz der Zellen. Der Begriff Transduktion im Fachgebiet der Genetik bedeutet die Infektion von Zielzellen mit viralen Vektoren, dabei findet ein Gentransfer statt. Durch die Integration des RFPs (red fluorescent protein) in die FaDu Zellen gelang es, eine Eigenfluoreszenz dieser Zellen zu erzielen. Die eingebrachte Fluoreszenz der unfixierten, lebenden Zellen, die sich noch in der Bakterienhülle befanden und noch nicht in OMÄ integriert waren, konnte unter dem Fluoreszenzmikroskop bei einer Wellenlänge von 555 nm eindeutig nachgewiesen werden. Die Fluoreszenz blieb sogar nach dem Einfrieren und Auftauen der Zellen, sowie nach oftmaligem Passagieren der Zellen bei gleicher Ausprägung erhalten. Für den weiteren Aufbau von Tumormodellen, basierend auf OMÄ, wurden, unabhängig von der Applikationsmethode ausschließlich RFP-transduzierte FaDu-Zellen verwendet. Ziel der Transduktion war, die in die Modelle integrierten, fluoreszierenden

Diskussion

Tumorzellen auch nach der Fixierung im Gewebe zu erkennen und somit deren Position in den einzelnen Gewebsschichten zu detektieren und deren Verhalten in einem tumorösen, wachsenden Gewebeverbund, auch im Kontext mit primären Keratinozyten und gesundem Gewebe zu analysieren.

Dabei war es essenziell, das natürliche proliferative Verhaltensmuster und die Morphologie der Zellen durch die Transduktion nicht negativ zu beeinflussen. Es haben schon mehrere Studien bewiesen, dass sich die Transduktion von RFP-Lentiviren auf Zellen, wie z.B. Tumorzelllinien, welche zur Bildung eines Plattenepithelkarzinoms der Zunge führen, sich nicht negativ auf deren Proliferationsraten auswirken und auch Auswirkungen auf das natürliche Verhalten der jeweiligen Zelllinien konnte nicht beobachtet werden [105]. In Bezug auf die Ergebnisse dieser Versuchsreihe, bei denen eindeutige tumoröse Gebilde kultiviert werden konnten, kann so ebenfalls darauf geschlossen werden, dass auch hier keine Veränderung der FaDu-Zellen in Bezug auf Proliferation und Verhaltensweise stattgefunden haben.

Es konnte zwar eine Eigenfluoreszenz von unfixierten, sich in den Bakterialschalen befindlichen Zellen analysiert werden, allerdings waren die einzelnen transduzierten Zellen und deren exakte Lokalisation im Tumorverbund in den voll entwickelten Tumormodellen nicht mehr eindeutig erkennbar. Unter Anwendung des TRITC Filters des Keyence-Mikroskops bei einer Wellenlänge von 555 nm fluoreszierten lediglich Kompartimente der generierten Modelle, die ohnehin eine Eigenfluoreszenz auch ohne Einbringung von fluoreszierenden Zellen aufwiesen (s. Abbildung 7). So waren sehr deutlich verhornte Epithelschichten im Stratum corneum erkennbar, die sowohl in Kontrollmodellen ohne RFP-transduzierte Zellen, als auch in Tumormodellen mit fluoreszierenden Zellen sichtbar waren. Einzelne Zellen an sich, welche eindeutig von nicht transduzierten, primären Keratinozyten unterschieden werden konnten, waren nicht sichtbar. Dies könnte mehrere Gründe haben, die zum Verlust der Fluoreszenz der Zellen geführt haben:

Abhängig vom Typ des RFP-Lentivirus könnte die Fluoreszenz schon bei dem Vorgang der Fixierung zerstört worden sein. Es könnte aber auch an der Sensitivität des Virus gegenüber Dehydrierung oder an der Durchführung von

histologischen und immunhistochemischen Färbungen und damit Inaktivierung der Fluoreszenz liegen, genaue Gründe für den Verlust der Fluoreszenz der Zellen können hier allerdings nicht genannt werden. Zudem sind transduzierte Zellen, abhängig vom Virus-Typus, auch nur eine bestimmte Anzahl von Tagen fluoreszent. Da in dieser Versuchsreihe die mikroskopischen Untersuchungen nach Fixierung und Färbung der Modelle, sowohl histologischer als auch immunhistochemischer Art, sehr zeitnah am nächsten Tag stattgefunden haben, ist der Verlust der Fluoreszenz durch zu lange Zeiten zwischen Fixierung und Mikroskopie eher zu vernachlässigen.

Zusammenfassend wird der Gebrauch solcher sog. fluoreszierender Proteine (FP) eher bei *in vivo* Studien, unter Durchführung von Tierversuchen, verwendet [106, 107]. So ermöglicht die Bilderfassung von FPs vor allem in *in vivo* Versuchsreihen eine genaue Beobachtung von Zellmigration, Morphologie und phänotypischen Veränderungen in einer dynamischen Umgebung [108]. Dabei werden allerdings z.B. in lebenden, nackten Mäusen mit RFP transduzierte Pankreas-Tumorzellen eingebracht und deren Tumorentwicklung und Metastasierung genau beobachtet [109]. In einer der wenigen *in vitro* durchgeführten Studien mit GFP (Green Fluorescent Protein)-transduzierten Zellen werden auch hier ausschließlich lebende, unfixierte Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop beobachtet [110]. Die Tendenz, fluoreszierende Zellen in Versuchsreihen zu verwenden, bezieht sich grundlegend eher auf *in vivo* Studien, oder *in vitro* Studien, in denen die zu untersuchenden Zellen lebend und unfixiert beobachtet werden. Für die Beobachtung von transduzierten Zellen in fixierten Modellen scheinen die mit dem in diesem Versuch verwendeten Zellen oder die Art des transduzierten Virus eher ungeeignet gewesen zu sein. Mackenzie et al. gelang es allerdings bereits in seiner Studie, Tumorzellen unterschiedlicher Zelllinien mit Genen für plazentäre alkalische Phosphatase zu transduzieren, welche dann mittels der Färbung für alkalische Phosphatase sichtbar gemacht wurden [96]. Ein derartiger Versuchsansatz könnte auch in dieser Versuchsreihe unternommen werden. Der Grundgedanke der Transduktion zur besseren Möglichkeit der Analyse der Zellen

und deren Verhalten innerhalb der generierten Gewebe ist allerdings ein guter Ansatz, der in Zukunft intensiver verfolgt werden sollte.

5.3 Eignung unterschiedlicher Applikationsformen zur Generierung von Tumormodellen

Im Verlauf dieser Versuchsreihe sollte die geeignetste Methode zur Applikation von FaDu-Tumorzellen in gesunde generierte OMÄ evaluiert werden. Dabei war das Ergebnis wichtig, Tumormodelle zu entwickeln, die deutliche pathologische Merkmale, sowohl histologisch, als auch immunhistochemisch nachweisbar, eines Plattenepithelkarzinoms zeigen, aber auch gesunde Bereiche der Mundschleimhaut. Ein Großteil der Studien, die sich mit der Generierung von Tumormodellen befasst, legte Tumormodelle an, die mittels Applikation von Zellgemischen oder reinen Tumorzellkulturen auf unterschiedliche Matrices generiert wurden [96, 111]. Dabei waren vor allem die Ergebnisse der Modelle am überzeugendsten, bei denen in dreidimensionalen Gewebeverbänden, also vollwertigen OMÄ, Tumorzellen integriert wurden, im Vergleich zu reinen epidermalen Modellen, bei denen auf die vorherige Applikation von Fibroblasten verzichtet wurde [88, 95, 111]. Das Ziel dieser Studie war allerdings, nicht nur ein reines Tumormodell anzulegen, sondern bestenfalls ein Modell zu etablieren, das beides enthält: Tumorgewebe, angrenzend an gesundes Gewebe, um auch dort die Schnittstelle zwischen erkranktem und gesundem Gewebe genauer zu analysieren und beispielsweise weiterführend den Einfluss von Chemotherapeutika auf den Tumor, aber auch auf das gesunde Gewebe untersuchen zu können. Dafür wurden zwei weitere Applikationsmethoden etabliert – das Applizieren von Spots und Sphäroiden.

5.3.1 Eignung der Applikation von Spots

Die Tumormodelle wurden durch Applikation mehrerer einzelner 2 µl Spots aus 10 000 FaDu-Tumorzellen und RPMI-Medium auf zuvor kultivierte OMÄ generiert. Histologisch weisen sie ein gleichmäßig geschichtetes, verhorntes

Plattenepithel auf. Einziger Unterschied zu OMÄ ohne Tumorzellen waren wolkig erscheinende Gebilde in der Lamina propria (s. Abbildung 11 C, schwarzer Pfeil), welche als zellfreies, fibröses, amorphes, eosinophiles, feingranulöses Material zu interpretieren ist. Solche Gebilde könnten sich unter anderem durch erhöhte mechanische Beanspruchung des Gewebes bilden, stellen allerdings eine eher apathologische Erscheinung dar. Auch die immunhistologischen Färbungen der Epithelmarker CK10, CK14, Ki67 und p53, sowie der mesenchymalen Marker der Lamina propria Vimentin färbten die zu erwartenden Gewebekompartimente wie in 4.3.2 ausführlich beschrieben an und entsprechen dem natürlichen Expressionsmuster. Es gibt keine Anzeichen von Dysplasien oder malignen Entartungstendenzen, im Vergleich zum OMÄ ist die Schichtstärke des Epithels und der Lamina propria allerdings geringfügig dünner. Nun könnte es mehrere Gründe für das apathologische und dem OMÄ stark ähnelnde Erscheinungsbild der Spot-Modelle geben. Zum einen sind durch das punktuelle Aufsetzen der Spots keine flächendeckenden Tumorzellen auf die OMÄ aufgebracht worden. Im Rahmen der Herstellung der histologischen Präparate könnte es nun sein, dass keine Areale mit Spots und gleichzeitig gesundem Gewebe angeschnitten wurden, und somit nur gesunde Anteile entsprechend dem OMÄ sichtbar sind. Zum anderen könnte das nachträgliche Applizieren der Spots an Tag 5 unter ALI-Kultivierung dazu geführt haben, dass sich eine bereits zu dicke Epithelschicht ausgebildet hat, die es den Tumorzellen nicht möglich macht, in überhaupt überlebensfähige Areale unter das Stratum corneum zu wandern. Deswegen sollte eine verkürzte vorausgehende ALI-Phase getestet werden, um eine geringere Verhornung des Epithels und somit eine geringere Schichtdicke des Stratum corneum zu erzielen, die es den applizierten Spots erleichtert, in die darunterliegenden Schichten des Gewebes einzuwandern. Durch die ALI-Kultivierung und in der Konsequenz das Versorgen der Modelle mit Medium von apikal konnten die für die Zellen notwendigen Nährstoffe nicht bis zu den Zellen in den Spots gelangen, sie wurden apoptotisch und waren bis zum Fixieren der Modelle durch apoptotische Vorgänge nicht mehr sichtbar.

5.3.2 Eignung der Applikation von Sphäroiden

Multizelluläre Tumorzellsphäroide - auch Sphäroide genannt - sind kugelförmige Aggregate, die aus mehreren tausend Zellen entstehen, welche dazu in der Lage sind, derartige Aggregate zu bilden. Sphäroide wurden in mehreren Studien zur Generierung von 3D-Tumormodellen verwendet. So wurden Sphäroide ebenfalls aus FaDu-Zellen auf gesunde OMÄ gesetzt und es konnten dadurch bereits Modelle, die ein *Carcinoma in situ* darstellten, entwickelt werden [92]. Tumorzellsphäroide besitzen sehr große Ähnlichkeit zum initialen malignen avaskulären Stadium von malignen Neubildungen, zu Mikrometastasen und zu interkapillären Tumormikroregionen und finden deshalb vor allem als Modelle bei *in vitro* Studien zur Erforschung von Tumorerkrankungen und Entwicklung neuartiger therapeutischer Ansätze Verwendung [112, 113]. Die in dieser Versuchsreihe generierten Tumormodelle, basierend auf Applikation von Tumorsphäroiden an Tag 5 nach ALI-Kultivierung, zeigen aber keine Modelle, welche einem *Carcinoma in situ* gleichen, wie in der Studie von Colley et al. [92]. Histologisch zeigen die Modelle gesunde OMÄ, auf denen teils vollständig erhaltene, nicht infiltrierende Sphäroide sitzen. Das darunterliegende Stratum corneum weist dabei keine Veränderungen auf, ist in der Kontinuität noch vollständig erhalten und die darunterliegenden Zellschichten sind der Norm entsprechend gebildet und gänzlich frei von eindeutig pathologischen, malignen Merkmalen. Innerhalb des Sphäroids finden sich nekrotische, apoptotische Zellen, die sich eosinophil darstellen und Kernschotter beinhalten. All das sind typische Merkmale eines Sphäroids, die auch schon in einigen Studien zuvor beschrieben wurden [112, 114]. Auch die immunhistochemische Charakterisierung zeigt keine malignen Entartungspotenziale, die von dem aufsitzenden Sphäroid ausgehen könnten. CK10 färbt das darunterliegende Stratum corneum kontinuierlich braun an und verdeutlicht die Kontinuität der Hornschicht. Der Differenzierungsmarker CK14 zeigt geordnet positionierte basale Keratinozyten und Vimentin färbt eine durchgehend formierte, gleichmäßig von Fibroblasten besiedelte Lamina propria an. Die Zellen sowohl im Epithel, als auch im Bindegewebe sind von dem aufsitzenden Sphäroid

gänzlich unbeeinflusst und weisen keinerlei Anzeichen von Malignität auf. Grund dafür könnte ebenfalls, wie bei den Modellen, generiert durch Applikation von Tumorzell-Spots, die Kultivierungsdauer von gesunden OMÄ von 5 Tagen unter ALI-Kultivierung sein. Die Ausbildung des verhornten, mehrschichtigen Plattenepithels scheint schon so stark ausgeprägt, dass es den Sphäroiden nicht mehr gelingt, das Stratum corneum zu durchdringen und das maligne Entartungspotenzial der Sphäroid-bildenden Zellen entfalten zu können. Deswegen sollte auch bei den Tumormodellen, generiert durch Applikation von Sphäroiden eine Verkürzung der vorausgehenden ALI-Phase erprobt werden, um das Heranwachsen eines zu dicken Stratum corneum zu vermeiden und die Integration der Tumorzellsphäroide in die OMÄ zu ermöglichen. Außerdem könnten allgemein gezielt nicht verhornende Keratinozyten zum Einsatz kommen, um die Ausbildung einer Hornschicht gänzlich zu vermeiden. Allerdings konnte in dieser Arbeit kein Rückschluss auf das Entnahmegebiet der Biopsien gezogen werden, sodass nicht zwischen verhorntem und unverhorntem Epithel und in der Konsequenz zwischen verhornenden und nicht verhornenden primären Keratinozyten unterschieden werden konnte. Einfacher als bei den Spot-Modellen, ist allerdings das Anschneiden der Modelle bei Herstellung der Schnitte. Durch die kompakte Struktur der Sphäroide sind sie nach einer Kultivierungsdauer von insgesamt 21 Tagen immer noch sehr gut als nachträglich aufgebrachteter Tumorzellverbund auf die OMÄ erkennbar.

5.3.3 Eignung der Applikation von Zellgemischen aus Tumorzellen und Keratinozyten unterschiedlicher Mischungsverhältnisse

Wie in einigen Studien zuvor ebenfalls durchgeführt, wurden in dieser Versuchsreihe Tumormodelle generiert, bei denen Zellgemische aus primären Keratinozyten und Tumorzellen in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen auf mit Fibroblasten besiedelte Matrixstrukturen appliziert wurden [96, 111]. Auch hier korrespondieren und beeinflussen Tumorzellen die gesunden umgebenden Keratinozyten. So konnten auch Mackenzie et al. in deren Studie ein unterschiedliches Verhaltensmuster zwischen Modellen mit reinen Tumorzellen

und Modellen, auf denen Tumorzellgemische aufgetragen wurden, erkennen [96]. Damit konnte bewiesen werden, dass phänotypische Muster *in vivo* von Tumorzellen und ihren umgebenden normalen Keratinozyten Voraussetzung für wichtige Zell-Zell-Interaktionen sind, die einen großen Einfluss auf das Überleben und das Wachstumsverhalten der malignen Komponenten haben [96]. Auch die Studie von Javaherian et. al. beweist, dass die Co-Kultur von normalen Schleimhautzellen und Tumorzellen Voraussetzung für die Reproduktion von *in vivo* Zell-Zell-Interaktionen und *in vivo* Mikroumgebung ist, die das Zellverhalten maßgeblich beeinflusst [111, 115].

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Mischungsverhältnisse (1:50, 1:33, 1:25, 1:10) von Tumorzellen und primären Keratinozyten untersucht. Dabei konnten im Unterschied zur Studie von Mackenzie et. al. sehr wohl Unterschiede zwischen den Mischungsverhältnissen und den generierten Tumormodellen festgestellt werden [96]. Die Tumormodelle mit dem Mischungsverhältnis von 1:50 zeigen aus histologischer Sicht sehr wohl eine dysplastische Entwicklung, allerdings begrenzt auf die Schicht des Stratum basale. Dort finden sich deutlich unausgeprägte basale Zellschichten, die Zellen im Stratum basale sind eng aneinandergereiht, von starker Zell- und Kerngrößenvarianz und eine reguläre Ausreifung der Zellen von basal nach apikal ist, vielleicht auch aufgrund der geringen Dicke der Modelle, nicht festzustellen. In den Modellaufbauten mit den Mischungsverhältnissen 1:50 und 1:33 ist keine Invasion der Zellen in die darunterliegende Lamina propria zu beobachten. Sind in den höheren Mischungsverhältnissen zwar hochpathologische Anzeichen von Malignität v.a. in den basaleren Zellschichten feststellbar, so sind im Vergleich bei Modellen mit dem Mischungsverhältnis 1:25 schon deutlichere Anzeichen eines malignen Wachstums erkennbar. Fortgeschrittene dysplastische Anteile, sowie invasives Wachstum sind unter dem nach wie vor kontinuierlich gewachsenen Stratum corneum zu erkennen. Der Epithelaufbau ist deutlich gestört, die Plattenepitheldifferenzierung weist eine starke Entartungstendenz auf und auch klar erkennbare Zell- und Kernpleomorphismen sind zu sehen und sprechen eindeutig für malignes Wachstum innerhalb des Modells. Die Durchbrechung der Basallamina, sowie die daraus resultierende Infiltration von Tumorzellen in die

darunterliegende Lamina propria sind definierte Kriterien für fortgeschrittenes malignes Tumorwachstum eines Plattenepithelkarzinoms. Konnten erst ab dem Mischungsverhältnis von 1:25 klare und eindeutige Merkmale eines malignen, infiltrierenden Tumorwachstums festgestellt werden, so werden all diese Merkmale bei Modellen mit dem Mischungsverhältnis von 1:10 noch einmal verstärkt und die Vorkommnisse bezüglich der Verteilung dieser Merkmale auf die ganze Fläche des Modells in der Frequenz erhöht. Es findet keine gleichmäßige mehrschichtige Verhornung des Plattenepithels statt, intra-epitheliale Verhornungsknospen, Einzelzelldyskeratosen, Interzellularbrücken und suprabasale Mitosen und schließlich die Durchbrechung der Basallamina und die Infiltration der Tumorzellen in die Lamina propria – alles Anzeichen von Malignität - sind erkennbar [116]. Die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung und des Auffindens von malignen, tumorösen Anzeichen auf den Schnitten ist also umso höher, je geringer das Mischungsverhältnis und somit je größer die Anzahl der in die Modelle integrierten Tumorzellen. Immunhistochemische Untersuchungen der Modelle zeigen im Vergleich zu den gesunden OMÄ Abweichungen der Färbungen vom natürlichen Expressionsmuster. Dazu sei allerdings anzumerken, dass es aufgrund des sehr ähnlichen Expressionsmusters von primären Zellen und Tumorzelllinien aufgrund ihrer gleichen Zellart – dem Keratinozyt – sehr schwierig war, zellspezifische Marker zu finden. Deswegen wurde sich hauptsächlich auf morphologische Unterschiede konzentriert [117]. Im Bereich des Epithels bei der Färbung des nukleären Markers Ki67 zeigen die Zellen sowohl basal als auch suprabasal in allen Modellen eine kontinuierliche Färbung im Vergleich zu OMÄ, bei denen lediglich Zellen des Stratum basale regulär angefärbt wurden. Zellinseln, welche dem Stratum corneum aufliegen, werden ebenfalls klar eingefärbt (Modell 1:25 und 1:10). Dies deutet auf ein verstärktes, irreguläres Proliferationsmuster der Zellen hin, was in anderen Studien mit ähnlichem Modellaufbau ebenfalls nachgewiesen werden konnte [89, 92]. Durch die Färbung mit dem Tumorsuppressorprotein p53 konnte eine erhöhte Expression dieses Proteins festgestellt werden, auch im Vergleich zum Kontrollmodell. Dies war in allen Mischungsverhältnissen, am meisten jedoch bei dem Mischungsverhältnis von 1:10 sichtbar. P53 ist ein

Diskussion

negativer Regulator des Zellzyklus und der Auslöser des programmierten Zelltods (Apoptose) als eine Antwort auf DNA-Schädigung, die eine Weitergabe beschädigter DNA in Tochterzellen verhindert [118]. Eine erhöhte p53-Immunoreaktivität in diesen Tumormodellen und eine Veränderung der p53-Expression könnte für einen Zusammenhang mit pathologischen Prozessen sprechen. Zu diesem Ergebnis kommt auch die Studie von Piffko et al., in der die Überexpression des p53-Proteins vor allem in den Vorstufen p53-positiver Karzinome auf ein frühes Ereignis in der Tumorentstehung hinweist [119]. CK10, ein Differenzierungsmarker, der die Kontinuität des Stratum corneum bei den Modellen mit dem Mischungsverhältnis 1:33 anfärbt, weist in den geringeren Mischungsverhältnissen 1:25 und 1:10 deutliche architektonische Störungen in den suprabasalen Schichten auf. Dort ist keine kontinuierliche Verhornung des Stratum corneum mehr sichtbar und auch tieferliegende Schichten bis zur Lamina propria zeigen einen ungeordneten Aufbau. Die intraepithelialen Verhornungsknospen werden durch den Marker für CK10 bei den Modellen mit dem Mischungsverhältnis 1:10 besonders deutlich dargestellt. Auch der Differenzierungsmarker CK14 macht die malignen Anzeichen deutlich und färbt markante architektonische Störungen in den suprabasalen Zellschichten an. Der mesenchymale Marker Vimentin färbt die Lamina propria im Modell 1:50 an und zeigt dessen Kontinuität und keine Invasion maligner Zellen, wohingegen in den Modellen 1:25 und 1:10 die Invasion maligner Zellen sichtbar wird. In diesen Arealen werden die Zellen nicht eingefärbt, was das maligne Entartungspotenzial der Zellen mit Invasion in tiefere Schichten unterstreicht. Kollagen IV, ein mesenchymaler Marker, der vor allem die Basallamina einfärben sollte, färbt die vollständige Lamina propria an. In Bereichen, in denen das Tumorstadium invasiv in die Bindegewebsschicht vordringt, ist dennoch die Unterbrechung der Kontinuität der Basalmembran (Modell 1:33, 1:25, 1:10) erkennbar. Das Merkmal der Unterbrechung der Basalmembran und das invasive Wachstum der Tumorzellen, nicht nur in den Epithelschichten, sondern auch in die darunterliegende Bindegewebsschicht, spricht eindeutig für ein malignes Wachstumsverhalten eines Plattenepithelkarzinoms [116]. In den Modellen mit dem Mischungsverhältnis 1:50 ist zwar keine Durchbrechung der Basalmembran

oder eine Invasion von Tumorzellen in die Lamina propria vorzufinden, allerdings sind deutliche architektonische Störungen der epithelialen Zellschichten, sowie übermäßig viele Mitosen und eine vermehrte Anzahl von Zell- und Kernpleomorphismen im Stratum basale erkennbar. Dieses Phänomen wird als *Carcinoma in situ* bezeichnet [92, 116].

Zusammenfassend ist es gelungen, konsequent Tumormodelle, basierend auf OMÄ auf SIS/MUC zu generieren, die abhängig von unterschiedlichen Mischungsverhältnissen zwischen Tumorzellen und primären Keratinozyten, unterschiedliche Schweregrade von *Carcinoma in situ* bis hin zum invasiven PECA zeigen. Im Unterschied zu anderen Studien [87, 111] konnten wir eine spontane Einwanderung der malignen Zellen in tieferliegende Schichten nachweisen. Mit der Methode der Applikation von Zellgemischen auf SIS/MUC konnten, unabhängig von der Konzentration der Zellgemische, sehr aussagekräftige, zuverlässige Tumormodelle entwickelt werden, welche sehr nahe an die *in vivo* Situation eines Plattenepithelkarzinoms der Mundschleimhaut herankommen. Sie bieten sehr gute Möglichkeiten in der weiterführenden Forschung von z.B. genaueren Wachstums- und Ausbreitungsmechanismen, Zell-Zell-Interaktionen, sowie Testung von Medikamenten und anderen Heilungsmethoden.

5.4 Rückschluss der PDs und der PDT auf die Qualität der Modelle

Die Berechnung der PDT der primären Keratinozyten ermöglicht eine Aussage über die Zeit, die benötigt wird, bis sich die Anzahl der Zellen verdoppelt hat. Dadurch können Rückschlüsse auf die Qualität der kultivierten primären Zellen gezogen werden. In dieser Arbeit wurden lediglich Zellen von nur zwei unterschiedlichen Spendern verwendet und obwohl sich die PDT der beiden Spender erheblich unterscheidet, konnten keine wesentlichen Unterschiede hinsichtlich Morphologie, Architektur und Qualität der generierten OMÄ und Tumormodelle festgestellt werden. Um weitere Zusammenhänge zwischen PDT und Verhalten und Qualität der primären Keratinozyten, die zur Generierung von

Modellen verwendet werden, herstellen zu können, sollten hierfür gezielt Versuchsreihen mit mehreren unterschiedlichen Spenderzellen durchgeführt werden.

5.5 Rückschluss des TEER-Wertes auf das Tumorwachstum

TEER-Wert Messungen dienen dem Monitoring der parazellulären Permeabilität und reflektieren die Entwicklung der Modelle im zeitlichen Verlauf des Kultivierungszyklus bezüglich der Ausbildung einer suffizienten Diffusionsbarriere. Viele Studien im Fachgebiet des TE, die sich mit der Entwicklung von 3D-Modellen befassen, ziehen anhand des TEER-Wertes Rückschlüsse auf die Qualität ihrer generierten Modelle [120, 121]. Die Ergebnisse der TEER-Wert Messungen stehen dabei mit den histologischen Ergebnissen der einzelnen Modelle in Korrelation. So steigt der TEER-Wert der OMÄ ohne Tumormodelle kontinuierlich vom Zeitpunkt der ersten Messung bis hin zum Tag der Fixierung an, was für eine deutliche Ausbildung einer Diffusionsbarriere und dadurch für einen physiologischen Aufbau des OMÄ spricht. Auch bei den Tumormodellen, welche durch Applikation von Spots oder Sphäroiden generiert wurden, ist durch eine Vervielfachung des TEER-Wertes von der Ausbildung einer suffizienten Diffusionsbarriere durch Entwicklung von tight-junctions auszugehen. Die TEER-Werte bei den Tumormodellen, die aus Zellgemischen mit verschiedenen Mischungsverhältnissen angelegt wurden, bewegen sich alle im sehr niedrigen Mittel zwischen $3,8 \Omega \cdot \text{cm}^2$ und $130,1 \Omega \cdot \text{cm}^2$. Einzige Abweichungen sind hier bei Modellen mit dem Mischungsverhältnis von 1:33 festzustellen, die mittels Zellen, gewonnen aus dem Biopsat eines anderen Spenders in einem separaten Modellversuch aufgebaut wurden. Bei diesem Modell steigen die Werte im Vergleich zu den Modellen mit den anderen Mischungsverhältnissen um ein Vielfaches von im Mittel $33,3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ auf $1688,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ um den Faktor 50,6 bis zu Tag 8 kontinuierlich an und fallen an Messtag 12 wieder auf den Mittelwert von $1481,4 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ab. Für die Tumorzellbildung könnte dies wiederum bedeuten, dass die Kontinuität des Modelles allmählich durchbrochen wird, die Integrität des Gewebes aber noch nicht vollständig verletzt wurde. Dies korreliert mit dem

histologischen Erscheinungsbild des Modells, bei dem unter anderem das Tumorstadium *Carcinoma in situ* vorliegt und somit die Kontinuität der Basalmembran bewahrt wurde, woraufhin die höheren TEER-Werte der Modelle mit dem Mischungsverhältnis von 1:33 erklärt werden können. Anders bei den Modellen mit den Mischungsverhältnissen 1:50, 1:25 und 1:10, in denen jeweils dieselben Spenderzellen eines einzigen Spenders verwendet wurden. Dabei ist zu beobachten, dass ein Zusammenhang zwischen der Anzahl der in die Modelle eingebrachten Tumorzellen und die Höhe des TEER-Wertes in Relation zueinanderstehen. Je niedriger das Verhältnis zwischen primären Keratinozyten und FaDu-Tumorzellen, desto niedriger der TEER-Wert, was ebenfalls zu den histologischen Bildern der Tumormodelle stimmig ist. Je mehr Tumorzellen in den Modellen, desto weniger Permeabilitätsbarriere wird ausgebildet, desto ausgeprägter sind die tumorösen Merkmale der Tumormodelle. Hier scheint über den gesamten Kultivierungszeitraum hinweg kaum eine Permeabilitätsbarriere aufgebaut worden zu sein. Auch hier die Tendenz eines weiteren Abfalls des ohmschen Widerstandes ab Tag 8 nach ALI-Kultivierung zu konstatieren. Im Allgemeinen sind die Ergebnisse der TEER-Wert Bestimmung mit den morphologischen Darstellungen der histologischen und immunhistochemischen Färbungen in Korrelation zu setzen. Die Kontinuität der Modelle ist nicht mehr feststellbar. Der architektonische Aufbau, sowie die gestörte interzelluläre Konstellation der entarteten Zellen, die Ausbildung der Interzellularbrücken, sowie die Durchbrechung der Basalmembran und die Invasion der Tumorzellen in die Lamina propria in den Modellen 1:25 und 1:10 tragen hierbei maßgeblich zu den niedrigen Messwterergebnissen der Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstandes bei.

Es kann ein eindeutiger Zusammenhang zwischen TEER-Wert und Entwicklung der Modelle festgestellt werden, allerdings sollten die gewonnenen Erkenntnisse mittels Durchführung weiterer Modellversuche verifiziert und abgeglichen werden. Innerhalb der Arbeit waren einige erhebliche Abweichungen der TEER-Werte, sowohl nach oben als auch nach unten feststellbar, obwohl sich die Morphologie der Modelle von denen anderer Modelle mit plausiblen Messwerten kaum unterschied. Ursache hierfür könnten einerseits Messfehler und die hohe

Diskussion

Sensitivität seitens des Gerätes (zu hohe und zu tiefe Messwerte) sein, andererseits könnten Mikroperforationen der SIS/MUC, die während des Präparierens oder Modifizierens (Applikation von Spots/ Sphäroiden) der Modelle verursacht wurden, die Ursache für eine erhöhte Durchlässigkeit und niedrige TEER-Werte sein.

6 Fazit und Ausblick

Das OMÄ auf SIS/MUC-Matrix mit einem dreidimensionalen Aufbau aus Epithel und Lamina propria ist ein geeignetes *in vitro* Modell, anhand dessen Zell-Zell-Interaktionen, sowie Zelldifferenzierung und Gewebeformierung optimal untersucht werden können [94, 101]. Im Vergleich zu Studien mit Monolayerkulturen war es dadurch möglich, die Invasion von Tumorzellen in die tieferliegende Schicht der Lamina propria zu beobachten [85, 89].

Die Verwendung der Tumorzelllinie FaDu, welche schon in der Studie von Colley et. al. zur erfolgreichen Entwicklung von Tumormodellen verwendet wurde, hat auch bei dieser Arbeit zur Entwicklung sowohl eines *Carcinoma in situ*, als auch eines invasiven PECA geführt [92]. Die im Vorfeld durchgeführte Transduktion des Lentivirus RFP auf die FaDu-Zellen sollte es ermöglichen, die Zellen innerhalb der generierten Modelle zu detektieren und deren Zellverhalten, wie Zellwanderung oder Interaktionen mit nicht-transduzierten, gesunden primären Keratinozyten und Fibroblasten zu untersuchen. Der Vorgang der Transduktion war gelungen und es konnte eine Fluoreszenz der noch in Zellkulturschalen kultivierten Zellen erzielt werden. Allerdings konnten die fluoreszierenden Zellen in den fixierten Schnitten nicht mehr nachgewiesen werden. Zusammenfassend ist über den Prozess der Transduktion von FPs auf FaDu-Zellen wenig bekannt und zur weiteren Verwendung sollten geeignetere Methoden evaluiert werden, welche es ermöglichen, die Zellen auch nach der Fixierung im Gewebe detektieren zu können. Denn die Lokalisierbarkeit der in gesundes Gewebe eingebrachten Tumorzellen ist ein wichtiger Aspekt zur Erforschung des Verhaltens dieser Zellen, der subzellulären Co-Lokalisierung der Zellen und der morphologischen Veränderungen innerhalb des Gewebes [108]. So gelang es in mehreren Studien auf unterschiedliche Weise, abhängig von den verwendeten Zellarten, z.B. durch Transduktion epithelialer Zellen mittels plazentärer, alkalischer Phosphatase [96], durch die Durchführung von Raman-Spektroskopie [111] oder mittels des Fluoreszenzmarkers ALDEFUOR® [94], Zellen innerhalb eines Gewebes nach Fixierung der Modelle zu unterscheiden. Denn allein durch

histologische und immunhistochemische Färbungen ist durch das sich stark ähnelnde Proteinexpressionsmuster der primären Keratinozyten und der keratinozytären Tumorzellen eine spezifische Markierung der Zellen nicht möglich [117]. Zur Generierung eines Tumormodelles wurden auf Basis eines OMÄ drei unterschiedliche Applikationsformen zur Integration von Tumorzellen getestet. Die Integration von Tumorzellen fand in Form von Spots, Sphäroiden oder Tumorzellgemischen (prim. Keratinozyten/FaDu-Zellen) in zuvor kultivierte gesunde OMÄ statt. Dabei sollte das Applizieren von Spots oder Sphäroiden das Tumorzellwachstum auch in der Umgebung von gesundem Gewebe initiieren. Dies würde die Möglichkeit schaffen, auch *in vitro*, gesundes neben pathologischem Gewebe und den Übergang dazu genau analysieren zu können.

Die Generierung eines Tumormodells durch die Applikation von Sphäroiden auf zuvor mit Fibroblasten besiedelte Modelle ist bereits in der Studie von Colley et. al. durch Applikation von Tumorzellsphäroiden gelungen [92]. Jedoch konnte in dieser Arbeit mit der Applikation von Spots oder Sphäroiden kein suffizientes Tumorzellwachstum in Umgebung von gesunder MSH erzielt werden. Die Zellen lagen ohne Reaktion des angrenzenden Stratum corneums auf der zu stark ausgeprägten Hornschicht der OMÄ auf und es war keine Einwanderung in das darunterliegende Gewebe möglich. Hauptaugenmerk sollte in Zukunft nicht auf die Tumorzellspots, sondern auf die multizellulären Tumorzellsphäroide gelegt werden, da, wie in mehreren Studien bereits bewiesen wurde, die Organisation der Tumorzellen in solchen Sphäroiden sehr große Ähnlichkeit zum initialen malignen avaskulären Stadium von malignen Neubildungen, zu Mikrometastasen und zu interkapillären Tumormikroregionen besitzen [112, 122]. In dieser Arbeit ist es gelungen, durch Applikation eines Zellgemisches variierender Mischungsverhältnisse von primären Keratinozyten und Tumorzellen der Zelllinie FaDu ein 3D-Tumorzellwachstum unterschiedlicher Malignitätsstufen zu initiieren. Je kleiner das Mischungsverhältnis und je höher in der Konsequenz die Anzahl der FaDu-Tumorzellen, desto zuverlässiger und ausgeprägter waren die morphologischen Anzeichen einer Tumorbildung. Abhängig vom Mischungsverhältnis war dabei die Ausprägung des Tumors. Ein *Carcinoma in situ* konnte mit dem Mischungsverhältnis von 1:50, in die

darunterliegenden Schichten infiltrierende, die Basalmembran durchbrechende Tumorgebilde mit den Mischungsverhältnissen 1:33, 1:25 und 1:10 entwickelt werden. Auch wenn dadurch keine Kombination von gesundem und pathologischem Gewebe in einem Modell mehr imitiert werden konnte, so konnten zumindest nach histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen eindeutige pathologische, maligne Tumormodelle generiert werden. Die Tumormodelle zeigten durchgehend Zell- und Kernpleomorphismen, atypische und vermehrte suprabasale Mitosen, eine Störung der normalen Gewebearchitektur, die Ausbildung von Interzellularbrücken, Einzelzell-dyskeratosen und Verhornungsknospen, sowie Stellen der Durchbrechung der Basalmembran und Invasion von Tumorzellen in die darunterliegende Lamina propria. All das sind eindeutige Kennzeichen malignen Wachstums [116]. In weiteren Versuchen könnten allerdings durch Veränderungen des Mischungsverhältnisses von primären Keratinozyten und Tumorzellen noch zuverlässiger zwischen der Bildung eines *Carcinoma in situ* und der Entwicklung eines invasiven Plattenepithelkarzinoms unterschieden und exakter reproduziert werden. Dabei sind Mischungsverhältnisse zwischen 1:50 und 1:33 genauer zu untersuchen, um zuverlässig die Entwicklung eines *Carcinoma in situ* zu erlangen.

Auch die Ergebnisse der TEER-Wert Messung stimmten mit den morphologischen Entwicklungen der Modelle überein. So stiegen die TEER-Werte der Kontrollmodelle konsequent an, was für eine deutliche Entwicklung von kontinuierlichem Gewebe spricht und im Gegensatz dazu fielen die TEER-Werte im zeitlichen Verlauf der Tumormodelle, bei denen die Basalmembran und somit die Kontinuität des Gewebes durchbrochen wurde rapide ab, bzw. lagen im konstant niedrigen Bereich. Da in bereits veröffentlichten Studien entweder keine Messungen des transepithelialen elektrischen Widerstandes durchgeführt wurden oder sich die Modelle im Aufbau zu stark voneinander unterschieden, existieren keinerlei vergleichbare Messergebnisse. Deswegen sollten die in dieser Arbeit erfassten Messergebnisse durch weitere Versuchsdurchläufe verifiziert und mit den bisher erlangten Ergebnissen abgeglichen werden.

Der Erfolg der Etablierung dieses zuverlässig rekonstruierbaren 3D, *in vitro* generierten Tumormodells, das der *in vivo* Situation eines Plattenepithelkarzinoms sehr nahekommt, bietet der Wissenschaft eine sehr gute Möglichkeit, weitere Studien zum Tumorwachstum durchzuführen. Außerdem kann die Weiterentwicklung und Verbesserung vielversprechender, neuartiger chemotherapeutischer und radiologischer Therapieverfahren erheblich vorangetrieben und dadurch die Heilungschancen mit geringeren Nebenwirkungen für den Patienten verbessert und eine erhöhte Lebensqualität erzielt werden. So könnte als prätherapeutisches Testsystem ein Tumormodell aus primären Zellen der Mundschleimhaut eines erkrankten Patienten und isolierten Zellen aus dem Originaltumor des Patienten generiert werden und die Reaktion des Tumors auf unterschiedliche Therapieansätze getestet werden. Dies bietet die Möglichkeit einer gezielten Therapie und kann therapeutische Misserfolge reduzieren, bzw. schon vorab ausschließen. Außerdem gibt ein solches Testverfahren dem Patienten die Chance, sich gegebenenfalls zwischen mehreren bereits zuvor evaluierten Therapieansätzen entscheiden zu können. Ein zudem bedeutsamer Punkt wäre für die Weiterentwicklung der Tumormodelle eine Entwicklung vaskularisierter Tumormodelle auf der Basis von porciner dezellularisierter Matrix. Durch das Erzielen von Vaskularisierung und Integration dieses Modells in ein Bioreaktorsystem können dynamische, physiologische Vorgänge, wie z.B. Metastasierung von Tumorzellen, *in vitro* viel exakter dargestellt und untersucht werden [101, 103].

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit mittels Methoden des TE zuverlässige, aussagekräftige und realitätsgetreue Tumormodelle auf Basis des porcinen Zellträgers SIS/MUC entwickelt werden, die der *in vivo* Situation eines PECA der Mundhöhle sehr nahekommen. Da der Versuchsaufbau mit den einzelnen Matrix- und Zellkomponenten in dieser Form mit keinen bestehenden Studien in Beziehung zu setzen ist, sollten allerdings für gesicherte, reproduzierbare Ergebnisse weitere Versuchsdurchläufe durchgeführt, Prozesse optimiert und abgeändert werden. Die Optimierung dieses Tumormodells hinsichtlich der Rekonstruktion von Tumorgewebe, umgeben von gesunder Mundschleimhaut schafft einen erheblichen Fortschritt im Bereich der

Fazit und Ausblick

Tumorforschung. Auch die Entwicklung dieses Tumormodells zu einem individuell auf den erkrankten Patienten abgestimmten prätherapeutischen Testsystem, kann in nachfolgenden *in vitro* Studien weiter ermöglicht werden.

Literaturverzeichnis

1. Schröder, H.E., *Orale Strukturbiologie. Entwicklungsgeschichte, Struktur und Funktion normaler Hart-und Weichgewebe der Mundhöhle und des Kiefergelenks*. 2000, Stuttgart: Thieme. p. p. 215, 349-390.
2. Bork, K., W. Burgdorf, and N. Hoede, *Mundschleimhaut-und Lippenkrankheiten: Klinik, Diagnostik und Therapie; Atlas und Handbuch; mit 37 Tabellen*. 2008: Schattauer Verlag.
3. Gühring, W. and J. Barth, *Anatomie: spezielle Biologie des Kausystems*. Vol. 3. 1992: Verlag Neuer Merkur GmbH.
4. Schwenzer, N. and M. Ehrenfeld, *Chirurgische Grundlagen*. 2008: Georg Thieme Verlag.
5. Radlanski, R., *Curriculum Orale Struktur-und Entwicklungsbiologie*. Quintessenz, Berlin, 2011: p. p. 453-520.
6. Jackowski, J., H. Peters, and F. Hölzle, *Praxisleitfaden Zahnärztliche Chirurgie*. 2007: Urban & Fischer bei Elsev. p. 290.
7. Lüllmann-Rauch, R., *Taschenlehrbuch Histologie, 3. vollständig-überarb. Auflage*. 2009: Stuttgart, New York: Thieme.
8. Barth, J., G. Richter, and P. Altmeyer, *Dermatologie*. 1991: Barth.
9. Welsch, U., *Sobotta Lehrbuch Histologie mit StudentConsult-Zugang: Zytologie, Histologie, Mikroskopische Anatomie*. StudentConsult. 2006: Elsevier, Urban&FischerVerlag. p. 108-110, 116-124, 338-341.
10. Lesch, C., et al., *The permeability of human oral mucosa and skin to water*. Journal of Dental Research, 1989. **68**(9): p. 1345-1349.
11. Hugger, A., J.C. Türp, and T. Kerschbaum, *Curriculum Orale Physiologie*. 2006: Quintessenz. p. 35, 37, 143, 161.
12. Schwenzer, N. and M. Ehrenfeld, *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*. 2011: Georg Thieme Verlag.
13. Regezi, J.A., J.J. Sciubba, and R.C. Jordan, *Oral pathology: clinical pathologic correlations*. 2008: Elsevier Health Sciences.
14. Koch-Institut, R., *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*. 2016, Berlin: Zentrum für Krebsregisterdaten im Robert Koch-Institut.
15. Ebhardt, H. and P.A. Reichart, *curriculum Spezielle Pathologie für Zahnmediziner*. 2009: Quintessenz-Verlag-GmbH.
16. Ostwald, C., et al., *Human papillomavirus 6/11, 16 and 18 in oral carcinomas and benign oral lesions*. Med Microbiol Immunol, 2003. **192**(3): p. 145-8.
17. Anil, S., et al., *Oral squamous cell carcinoma in a case of dyskeratosis congenita*. Annals of dentistry, 1993. **53**(1): p. 15-18.
18. Prime, S.S., et al., *A review of inherited cancer syndromes and their relevance to oral squamous cell carcinoma*. Oral Oncology, 2001. **37**(1): p. 1-16.
19. Weber, F., et al., *Squamous cell carcinoma in junctional and dystrophic epidermolysis bullosa*. ACTA DERMATOVENEREOLOGICA-STOCKHOLM-, 2001. **81**(3): p. 189-192.
20. Neville, B.W., et al., *Oral and maxillofacial pathology*. 2002: Elsevier Health Sciences.

21. Lazarus, P., et al., *Relationship between p53 mutation incidence in oral cavity squamous cell carcinomas and patient tobacco use*. Carcinogenesis, 1996. **17**(4): p. 733-9.
22. Fan, H., et al., *Relationship between squamous cell carcinoma of the tongue and the position of dental prosthesis*. J Adv Prosthodont, 2015. **7**(2): p. 129-37.
23. Alnuaimi, A.D., et al., *Oral Candida colonization in oral cancer patients and its relationship with traditional risk factors of oral cancer: a matched case-control study*. Oral Oncol, 2015. **51**(2): p. 139-45.
24. Hettmann, A., et al., *Infectious Agents Associated with Head and Neck Carcinomas*, in *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health: Volume 1*, G. Donelli, Editor. 2016, Springer International Publishing: Cham. p. 63-80.
25. Krogh, P., B. Hald, and P. Holmstrup, *Possible mycological etiology of oral mucosal cancer: catalytic potential of infecting Candida albicans and other yeasts in production of N-nitrosobenzylmethylamine*. Carcinogenesis, 1987. **8**(10): p. 1543-8.
26. Pindborg, J.J., et al., *Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa*. Pathology, 1997: p. p. 11-13.
27. Wolff K.-D., B.F., Beck J., Bikowski K., Böhme P., Budach W., Burkhardt A., Danker H., Eberhardt W., Engers K., Fietkau R., Frerich B., Gauler T., Germann G., GittlerHebestreit N., Grötz K., Horch R., Ihrler S., Keilholz U., Lell M., Lübbe A., Mantey W., Nusser-Müller-Busch R., Pistner H., Paradies K., Reichert T., Reinert S., Schliephake H., Schmitter M., Singer S., Westhofen M., Wirz S., Wittlinger M., *Leitlinienprogramm Onkologie, "Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms"*, ed. L. Onkologie and D.K.e.V.u.D.K.e.V. der AWMW. 2012.
28. Irimie, A.I., et al., *Future trends and emerging issues for nanodelivery systems in oral and oropharyngeal cancer*. International Journal of Nanomedicine, 2017. **12**: p. 4593-4606.
29. Marron, M., et al., *Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk*. Int J Epidemiol, 2010. **39**(1): p. 182-96.
30. Nerem, R.M., *Regenerative medicine: the emergence of an industry*. Journal of the Royal Society Interface, 2010: p. rsif20100348.
31. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
32. Izumi, K., J. Song, and S.E. Feinberg, *Development of a tissue-engineered human oral mucosa: from the bench to the bed side*. Cells Tissues Organs, 2004. **176**(1-3): p. 134-152.
33. Vacanti, J.P. and R. Langer, *Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation*. The Lancet, 1999. **354**: p. S32-S34.
34. Kasper, C., *Ersatzteillager Mensch? Tissue Engineering*. Chemie in unserer Zeit, 2005. **39**(6): p. 394-401.
35. Griffith, L.G. and G. Naughton, *Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities*. Science, 2002. **295**(5557): p. 1009-1014.

36. Moharamzadeh, K., et al., *Tissue-engineered oral mucosa*. Journal of dental research, 2012. **91**(7): p. 642-650.
37. Moharamzadeh, K., et al., *Tissue-engineered oral mucosa: a review of the scientific literature*. Journal of Dental Research, 2007. **86**(2): p. 115-124.
38. Izumi, K., et al., *Ex vivo development of a composite human oral mucosal equivalent*. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, 1999. **57**(5): p. 571-577.
39. Kinikoglu, B., O. Damour, and V. Hasirci, *Tissue engineering of oral mucosa: a shared concept with skin*. Journal of Artificial Organs, 2015. **18**(1): p. 8-19.
40. MADDEN, M.R., et al., *Grafting of cultured allogeneic epidermis on second-and third-degree burn wounds on 26 patients*. Journal of Trauma and Acute Care Surgery, 1986. **26**(11): p. 955-962.
41. Lauer, G., et al., *Cultured gingival epithelium: a possible suitable material for pre-prosthetic surgery*. Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery, 1991. **19**(1): p. 21-26.
42. Mohammadi, M., M.A. Shokrgozar, and R. Mofid, *Culture of Human Gingival Fibroblasts on a Biodegradable Scaffold and Evaluation of Its Effect on Attached Gingiva: A Randomized, Controlled Pilot Study*. Journal of Periodontology, 2007. **78**(10): p. 1897-1903.
43. Clugston, P.A., et al., *Cultured epithelial autografts: three years of clinical experience with eighteen patients*. Journal of Burn Care & Research, 1991. **12**(6): p. 533-539.
44. Rosdy, M. and L.-C. Clauss, *Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface*. Journal of Investigative Dermatology, 1990. **95**(4): p. 409-414.
45. Kinikoglu, B., et al., *Reconstruction of a full-thickness collagen-based human oral mucosal equivalent*. Biomaterials, 2009. **30**(32): p. 6418-25.
46. Rosdy, M., A. Pisani, and J.P. ORTONNE, *Production of basement membrane components by a reconstructed epidermis cultured in the absence of serum and dermal factors*. British Journal of Dermatology, 1993. **129**(3): p. 227-234.
47. Moharamzadeh, K., et al., *Development, optimization and characterization of a full-thickness tissue engineered human oral mucosal model for biological assessment of dental biomaterials*. J Mater Sci Mater Med, 2008. **19**(4): p. 1793-801.
48. Yadev, N.P., et al., *Evaluation of tissue engineered models of the oral mucosa to investigate oral candidiasis*. Microbial pathogenesis, 2011. **50**(6): p. 278-285.
49. Dongari-Bagtzoglou, A. and H. Kashleva, *Development of a highly reproducible three-dimensional organotypic model of the oral mucosa*. Nat. Protocols, 2006. **1**(4): p. 2012-2018.
50. Ng, K.W., H.L. Khor, and D. Hutmacher, *In vitro characterization of natural and synthetic dermal matrices cultured with human dermal fibroblasts*. Biomaterials, 2004. **25**(14): p. 2807-2818.
51. Liu, J., et al., *Skin and oral mucosa equivalents: construction and performance*. Orthodontics & craniofacial research, 2010. **13**(1): p. 11-20.

52. Rennekampff, H.O., et al., *Acellular human dermis promotes cultured keratinocyte engraftment*. Journal of Burn Care & Research, 1997. **18**(6): p. 535-544.
53. Hildebrand, H., et al., *Characterization of organotypic keratinocyte cultures on de-epithelialized bovine tongue mucosa*. 2002.
54. Nakamura, T., et al., *The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosal epithelial cells on amniotic membrane*. Investigative ophthalmology & visual science, 2003. **44**(1): p. 106-116.
55. Hodde, J., et al., *Vascular endothelial growth factor in porcine-derived extracellular matrix*. Endothelium, 2001. **8**(1): p. 11-24.
56. Voytik-Harbin, S.L., et al., *Identification of extractable growth factors from small intestinal submucosa*. Journal of cellular biochemistry, 1997. **67**(4): p. 478-491.
57. Wei, R.Q., et al., *Grafts of porcine small intestinal submucosa with cultured autologous oral mucosal epithelial cells for esophageal repair in a canine model*. Exp Biol Med (Maywood), 2009. **234**(4): p. 453-61.
58. Beckstead, B.L., et al., *Esophageal epithelial cell interaction with synthetic and natural scaffolds for tissue engineering*. Biomaterials, 2005. **26**(31): p. 6217-6228.
59. HECK, E.L., P.R. BERGSTRESSER, and C.R. BAXTER, *Composite skin graft: frozen dermal allografts support the engraftment and expansion of autologous epidermis*. Journal of Trauma and Acute Care Surgery, 1985. **25**(2): p. 106-112.
60. McKay, I., et al., *Reconstruction of human skin from glycerol-preserved allodermis and cultured keratinocyte sheets*. Burns, 1994. **20**: p. S19-S22.
61. Dang, J.M. and K.W. Leong, *Natural polymers for gene delivery and tissue engineering*. Advanced drug delivery reviews, 2006. **58**(4): p. 487-499.
62. MacCallum, D. and J. Lillie, *Evidence for autoregulation of cell division and cell transit in keratinocytes grown on collagen at an air-liquid interface*. Skin Pharmacology and Physiology, 1990. **3**(2): p. 86-96.
63. Yannas, I. and J.F. Burke, *Design of an artificial skin. I. Basic design principles*. Journal of biomedical materials research, 1980. **14**(1): p. 65-81.
64. Moharamzadeh, K., et al., *Development, optimization and characterization of a full-thickness tissue engineered human oral mucosal model for biological assessment of dental biomaterials*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 2008. **19**(4): p. 1793-1801.
65. Peña, I., et al., *In vitro engineering of complete autologous oral mucosa equivalents: characterization of a novel scaffold*. Journal of periodontal research, 2010. **45**(3): p. 375-380.
66. Golinski, P., et al., *Oral mucosa model based on a collagen–elastin matrix*. Journal of periodontal research, 2011. **46**(6): p. 704-711.
67. Ophof, R., et al., *Oral keratinocytes cultured on dermal matrices form a mucosa-like tissue*. Biomaterials, 2002. **23**(17): p. 3741-3748.
68. Costa, R.R., et al., *Layer-by-layer assembly of chitosan and recombinant biopolymers into biomimetic coatings with multiple stimuli-responsive properties*. Small, 2011. **7**(18): p. 2640-2649.

69. Huang, L., et al., *Generation of synthetic elastin-mimetic small diameter fibers and fiber networks*. *Macromolecules*, 2000. **33**(8): p. 2989-2997.
70. Costa, R.R., et al., *Layer-by-layer film growth using polysaccharides and recombinant polypeptides: a combinatorial approach*. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2013. **117**(22): p. 6839-6848.
71. Vande Vannet, B.M.R.A. and J.L. Hanssens, *Cytotoxicity of two bonding adhesives assessed by three-dimensional cell culture*. *The Angle orthodontist*, 2007. **77**(4): p. 716-722.
72. Moharamzadeh, K., et al., *Mucotoxicity of dental composite resins on a tissue-engineered human oral mucosal model*. *Journal of dentistry*, 2008. **36**(5): p. 331-336.
73. Trombetta, D., et al., *Toxic effect of nickel in an in vitro model of human oral epithelium*. *Toxicology letters*, 2005. **159**(3): p. 219-225.
74. Schmalz, G., H. Schweikl, and K.A. Hiller, *Release of prostaglandin E2, IL-6 and IL-8 from human oral epithelial culture models after exposure to compounds of dental materials*. *European journal of oral sciences*, 2000. **108**(5): p. 442-448.
75. Vannet, B.V., J.-L. Hanssens, and H. Wehrbein, *The use of three-dimensional oral mucosa cell cultures to assess the toxicity of soldered and welded wires*. *The European Journal of Orthodontics*, 2007. **29**(1): p. 60-66.
76. Chai, W.L., et al., *Ultrastructural analysis of implant–soft tissue interface on a three dimensional tissue-engineered oral mucosal model*. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 2012. **100**(2): p. 269-277.
77. Chai, W.L., et al., *Development of a novel model for the investigation of implant-soft tissue interface*. *Journal of periodontology*, 2010. **81**(8): p. 1187-1195.
78. Koschier, F., et al., *In vitro effects of ethanol and mouthrinse on permeability in an oral buccal mucosal tissue construct*. *Food and chemical toxicology*, 2011. **49**(10): p. 2524-2529.
79. Moharamzadeh, K., et al., *Biologic assessment of antiseptic mouthwashes using a three-dimensional human oral mucosal model*. *Journal of periodontology*, 2009. **80**(5): p. 769-775.
80. Hearnden, V., et al., *New developments and opportunities in oral mucosal drug delivery for local and systemic disease*. *Advanced drug delivery reviews*, 2012. **64**(1): p. 16-28.
81. Mostefaoui, Y., I. Claveau, and M. Rouabhia, *In vitro analyses of tissue structure and interleukin-1 β expression and production by human oral mucosa in response to Candida albicans infections*. *Cytokine*, 2004. **25**(4): p. 162-171.
82. Gursoy, U.K., et al., *Biofilm formation enhances the oxygen tolerance and invasiveness of Fusobacterium nucleatum in an oral mucosa culture model*. *Journal of periodontology*, 2010. **81**(7): p. 1084-1091.
83. Andrian, E., D. Grenier, and M. Rouabhia, *In vitro models of tissue penetration and destruction by Porphyromonas gingivalis*. *Infection and immunity*, 2004. **72**(8): p. 4689-4698.

84. Nittayananta, W., et al., *HIV type 1 fails to trigger innate immune factor synthesis in differentiated oral epithelium*. AIDS research and human retroviruses, 2009. **25**(10): p. 1013-1021.
85. Fischbach, C., et al., *Engineering tumors with 3D scaffolds*. Nature methods, 2007. **4**(10): p. 855-860.
86. Prime, S., et al., *Oral epithelial atypia and acantholytic dyskeratosis in rats painted with 4-nitroquinoline N-oxide*. Journal of Oral Pathology & Medicine, 1986. **15**(5): p. 280-283.
87. Gaballah, K., et al., *Tissue engineering of oral dysplasia*. The Journal of pathology, 2008. **215**(3): p. 280-289.
88. Costea, D.E., A.C. Johannessen, and O.K. Vintermyr, *Fibroblast control on epithelial differentiation is gradually lost during in vitro tumor progression*. Differentiation, 2005. **73**(4): p. 134-141.
89. Gaballah, K., et al., *Lysis of dysplastic but not normal oral keratinocytes and tissue-engineered epithelia with conditionally replicating adenoviruses*. Cancer research, 2007. **67**(15): p. 7284-7294.
90. Nyström, M., et al., *Development of a quantitative method to analyse tumour cell invasion in organotypic culture*. The Journal of pathology, 2005. **205**(4): p. 468-475.
91. Marsh, D., et al., *Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients*. J Pathol, 2011. **223**(4): p. 470-81.
92. Colley, H., et al., *Development of tissue-engineered models of oral dysplasia and early invasive oral squamous cell carcinoma*. British journal of cancer, 2011. **105**(10): p. 1582-1592.
93. McGregor, F., et al., *Molecular changes associated with oral dysplasia progression and acquisition of immortality potential for its reversal by 5-azacytidine*. Cancer Research, 2002. **62**(16): p. 4757-4766.
94. Dalley, A.J., et al., *Organotypic culture of normal, dysplastic and squamous cell carcinoma-derived oral cell lines reveals loss of spatial regulation of CD44 and p75NTR in malignancy*. Journal of Oral Pathology & Medicine, 2013. **42**(1): p. 37-46.
95. Kulasekara, K.K., et al., *Cancer progression is associated with increased expression of basement membrane proteins in three-dimensional in vitro models of human oral cancer*. archives of oral biology, 2009. **54**(10): p. 924-931.
96. Mackenzie, I.C., *Growth of malignant oral epithelial stem cells after seeding into organotypical cultures of normal mucosa*. Journal of oral pathology & medicine, 2004. **33**(2): p. 71-78.
97. Dickson, M.A., et al., *Human keratinocytes that express hTERT and also bypass a p16INK4a-enforced mechanism that limits life span become immortal yet retain normal growth and differentiation characteristics*. Molecular and cellular biology, 2000. **20**(4): p. 1436-1447.
98. Thomas, G., J. Jones, and P. Speight, *Integrins and oral cancer*. Oral oncology, 1997. **33**(6): p. 381-388.
99. Elenbaas, B. and R.A. Weinberg, *Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation*. Experimental cell research, 2001. **264**(1): p. 169-184.

100. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer Statistics, 2017*. CA Cancer J Clin, 2017. **67**(1): p. 7-30.
101. Moll, C., et al., *Tissue engineering of a human 3D in vitro tumor test system*. JoVE (Journal of Visualized Experiments), 2013(78): p. e50460-e50460.
102. Mertsching, H., et al., *Engineering of a vascularized scaffold for artificial tissue and organ generation*. Biomaterials, 2005. **26**(33): p. 6610-6617.
103. Groeber, F., et al., *A first vascularized skin equivalent for as an alternative to animal experimentation*. Altex, 2016. **33**(4): p. 415-422.
104. Lindberg, K. and S.F. Badylak, *Porcine small intestinal submucosa (SIS): a bioscaffold supporting in vitro primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins*. Burns, 2001. **27**(3): p. 254-266.
105. Cai, W.-X., et al., *Evidence of phenotypic stability after transduction of fluorescent proteins in two human tongue cancer cell lines*. Archives of Oral Biology, 2017. **79**: p. 48-54.
106. Meadows, G.G., *Integration/Interaction of Oncologic Growth*. Vol. 15. 2005: Springer Science & Business Media.
107. Okabe, M., et al., *'Green mice' as a source of ubiquitous green cells*. FEBS letters, 1997. **407**(3): p. 313-319.
108. Sapoznik, E., et al., *Fluorescent Cell Imaging in Regenerative Medicine*. Biomedical engineering and computational biology, 2016. **7**(Suppl 1): p. 29.
109. Katz, M.H., et al., *A novel red fluorescent protein orthotopic pancreatic cancer model for the preclinical evaluation of chemotherapeutics*. Journal of Surgical Research, 2003. **113**(1): p. 151-160.
110. Liang, C.-C., A.Y. Park, and J.-L. Guan, *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. Nature protocols, 2007. **2**(2): p. 329-333.
111. Brauchle, E., et al., *Design and analysis of a squamous cell carcinoma in vitro model system*. Biomaterials, 2013. **34**(30): p. 7401-7.
112. Mueller-Klieser, W., *Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications*. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 1997. **273**(4): p. C1109-C1123.
113. Mueller-Klieser, W., *Multicellular spheroids*. Journal of cancer research and clinical oncology, 1987. **113**(2): p. 101-122.
114. Mueller-Klieser, W., J. Freyer, and R. Sutherland, *Influence of glucose and oxygen supply conditions on the oxygenation of multicellular spheroids*. British journal of cancer, 1986. **53**(3): p. 345.
115. Javaherian, A., et al., *Normal keratinocytes suppress early stages of neoplastic progression in stratified epithelium*. Cancer research, 1998. **58**(10): p. 2200-2208.
116. Remmele, W., G. Klöppel, and H.H. Kreipe, *Pathologie: Kopf-Hals-Region, Weichgewebstumoren, Haut*. 2008: Springer-Verlag.
117. Commandeur, S., et al., *An in vitro three-dimensional model of primary human cutaneous squamous cell carcinoma*. Experimental dermatology, 2009. **18**(10): p. 849-856.

Literaturverzeichnis

118. Lane, D.P., *Cancer. p53, guardian of the genome*. Nature, 1992. **358**: p. 15-16.
119. Piffkó, J. and Á. Bánkfalvi, *Immunhistochemische Expression des p53-Proteins in Plattenepithelkarzinomen und normalem und dysplastischem Epithel der Mundhöhle*. Oral and Maxillofacial Surgery, 1997. **1**(1): p. 104-107.
120. Li, N., et al., *Development of an improved three-dimensional in vitro intestinal mucosa model for drug absorption evaluation*. Tissue Engineering Part C: Methods, 2013. **19**(9): p. 708-719.
121. Klausner, M., et al., *Organotypic human oral tissue models for toxicological studies*. Toxicol In Vitro, 2007. **21**(5): p. 938-49.
122. Sutherland, R.M., *Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model*. Science, 1988. **240**(4849): p. 177-184.

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
2D	Zweidimensional
3D	Dreidimensional
AB	Antibiotikum
AK	Antikörper
ALI-Methode	„Air-to-liquid-Interface“ - Methode
bzw.	Beziehungsweise
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CK	Cytokeratin
cm ²	Quadratcentimeter
CT	Computertomographie
d	Tag
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DED	Deepithelialisierte Dermis
DMEM	„Dulbecco's MEM“ (s. MEM)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DVT	Digitale Volumetomographie
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
engl.	auf Englisch
ER	endoplasmatisches Reticulum
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	fötales Kälberserum
g	Gewichtskraft
GAG	Glycosaminoglykan
GFP	green fluorescent protein

Abkürzungsverzeichnis

h	Stunde
HE	Hämatoxylin-Eosin
HeK-Zellen	„Human embryonic kidney“-Zellen
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HRP	„Horseradish peroxidase“
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
MEM	„Minimal essential medium“ (Minimalessentielles Medium)
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
MSH	Mundschleimhaut
MV	Modellversuch
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
o.g.	oben genannt
OMÄ	Orales Mukosaäquivalent
OP	Operation
p	Passage
P.G.	Porphyromonas Gingivalis
PBS	„phosphate-buffered saline“ (Phosphat-gepufferte Kochsalzlosung)
PD	Population Doublings
PDT	Population doubling time
PECA	Plattenepithelkarzinom
PET-CT	Positron-Elektron-Computertomographie
PG	Proteoglykan
RFP	red fluorescent protein

Abkürzungsverzeichnis

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
s	Sekunde
SIS	small intestinal mucosa
SIS/MUC	small epithelial mucosa with preserved mucosa
sog.	sogenannt
TE	Tissue Engineering
TEER	„Transepithelial electrical resistance“
TNM-Klassifikation	„Tumour-Node-Methastasis“-Klassifikation
U	Unit
v.a.	vor allem
v.	von
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus der Mundschleimhaut	2
Abbildung 2: Prinzip des Tissue Engineering	17
Abbildung 3: Bespannung der Zellkronen mit dezellularisiertem Schweinedarm (SIS/MUC)	67
Abbildung 4: Schema zum Modellaufbau der einzelnen Tumormodelle	79
Abbildung 5: RFP-transduzierte FaDu-Zellen.....	85
Abbildung 6: Kontrollmodell - Histologische Charakterisierung eines OMÄ ohne Tumorzellen (H.E.-Färbung)	86
Abbildung 7: H.E.-Übersichtsfärbung eines Kontrollmodells und Darstellung mit einem Fluoreszenzmikroskop.....	87
Abbildung 8: Kontrollmodell - Immunhistochemische Charakterisierung epidermaler Anteile	88
Abbildung 9: Kontrollmodell - Immunhistochemische Charakterisierung dermalen Anteile	89
Abbildung 10: Kontrollmodell - graphische Darstellung der Entwicklung des TEER-Wertes der einzelnen Modellversuche ab dem Zeitpunkt der ALI-Kultivierung.....	90
Abbildung 11: H.E.-Übersichtsfärbung von Tumormodellen, generiert durch Applikation von Spots auf OMÄ.....	92
Abbildung 12: Immunhistochemische Charakterisierung von Tumormodellen, generiert durch Applikation von Spots auf OMÄ.....	93
Abbildung 13: Tumormodell, generiert durch Applikation von Spots - graphische Darstellung der Entwicklung des TEER-Wertes der einzelnen Modellversuche ab dem Zeitpunkt der ALI-Kultivierung.....	94
Abbildung 14: Multizelluläre Tumorsphäroide aus RFP-transduzierten FaDu-Zellen	95
Abbildung 15: H.E.-Übersichtsfärbung eines Tumormodells, generiert durch Applikation von Tumorzellsphäroiden auf OMÄ	95

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 16: Immunhistochemische Charakterisierung von Tumormodellen, generiert durch Applikation von Tumorzellsphäroiden auf OMÄ.....	96
Abbildung 17: Tumormodell, generiert durch Applikation von Sphäroiden - graphische Darstellung der Entwicklung des TEER-Wertes der einzelnen Modellversuche.....	97
Abbildung 18: H.E.-Übersichtsfärbung von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis von 1:50 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)	98
Abbildung 19: H.E.-Übersichtsfärbung von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis von 1:33 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)	99
Abbildung 20: H.E.-Übersichtsfärbung von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis von 1:25 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)	100
Abbildung 21: H.E.-Übersichtsfärbung von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis von 1:25 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten) und Darstellung mit dem Fluoreszenzmikroskop.....	101
Abbildung 22: H.E.-Übersichtsfärbung von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis von 1:10 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)	102
Abbildung 23: Immunhistochemische Färbung von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis 1:50 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)	103

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 24: Immunhistochemische Färbung von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis 1:33 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)	104
Abbildung 25: Immunhistochemische Färbung epidermaler Anteile von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis 1:25 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)	105
Abbildung 26: Immunhistochemische Färbung dermalen Anteile von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis 1:25 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)	106
Abbildung 27: Immunhistochemische Färbung von Tumormodellen, generiert durch Applikation eines Gemisches aus primären Keratinozyten und Tumorzellen im Mischungsverhältnis 1:10 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)	107
Abbildung 28: Graphische Darstellung des TEER-Werts der einzelnen Modellversuche eines Tumormodells, generiert durch Applikation eines Zellgemisches aus Tumorzellen und primären Keratinozyten im Verhältnis 1:50, 1:33, 1:25, 1:10 (Tumorzellen/primäre Keratinozyten)	108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Grading nach Broders.....	12
Tabelle 2: TNM-Klassifikation.....	13
Tabelle 3: Beispiele von Zelllinien und etablierten Kulturen von Zellen des Plattenepithelkarzinoms.....	26
Tabelle 4: Geräte.....	37
Tabelle 5: Labormaterialien.....	41
Tabelle 6: Verbrauchsmaterialien.....	42
Tabelle 7: Chemikalien und Lösungen.....	44
Tabelle 8: Medien für die Zellkultur.....	47
Tabelle 9: Lösungen für die Zellkultur.....	49
Tabelle 10: Lösungen für die Histologie.....	50
Tabelle 11: Antikörper.....	51
Tabelle 12: Immunhistochemie-Kit.....	52
Tabelle 13: Puffer und Lösungen für die Immunhistologie.....	52
Tabelle 14: Software.....	54
Tabelle 15: zellspezifische Medien.....	55
Tabelle 16: Puromycinkonzentrationen [$\mu\text{g/ml}$] in der Selektionsphase.....	64
Tabelle 17: Protokoll Paraffineinbettung.....	71
Tabelle 18: HE-Färbung nach Mayer.....	73
Tabelle 19: Protokoll zur HE-Färbung, absteigende Reihe.....	74
Tabelle 20: Protokoll aufsteigende Reihe.....	74
Tabelle 21: Protokoll immunhistologische Färbung mit HRP-basiertem Nachweissystem.....	76
Tabelle 22: Anzahl der angesetzten Modellarten in den unterschiedlichen Versuchsreihen.....	78
Tabelle 23: Population Doublings.....	80
Tabelle 24: Übersicht der getesteten Puromycinkonzentrationen an nicht transduzierten FaDu-Zellen.....	82
Tabelle 25: Übersicht der getesteten Puromycinkonzentrationen an transduzierten FaDu-Zellen.....	83

Danksagung

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit ganz wesentlich beigetragen haben und ohne die die Durchführung der Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Mein erster Dank gebührt meiner Erstgutachterin Frau Professor Dr. Heike Walles, für die Bereitstellung dieses Themas und für die Ermöglichung der Promotion am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin der Universität Würzburg.

Bei Priv.-Doz. Dr. Stephan Hackenberg bedanke ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens, die stets sehr nette und kollegiale Betreuung und die Bereitstellung der FaDu-Zellen.

Besonders danke ich Frau Dr. Angela Rossi für ihre hilfsbereite, kompetente und zeitintensive Betreuung, für die Vermittlung des benötigten Fachwissens und die geduldige Beantwortung aller Fragen. Dafür, dass sie zu jeder Zeit mit hilfreichen Lösungsansätzen für mich da war.

Außerdem danke ich der gesamten Kollegschaft des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin der Universität Würzburg für die schöne Zeit während und auch nach meiner experimentellen Versuchsphase. Vor allem danke ich Sebastian Kress und Heike Oberwinkler, die mir stets mit ihrer lebenswerten Art und großen Hilfsbereitschaft mit Rat und Tat zur Seite standen. Der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie danke ich für die Bereitstellung der Mundschleimhautbiopsien. Mein besonderer Dank gilt hierbei meinem Hauptansprechpartner Dr. Dr. Christian Linz.

Zudem möchte ich mich bei Frau Dr. Dr. Elena Hartmann für die kompetente und nette Betreuung im histopathologischen Themengebiet bedanken.

Zuletzt danke ich meiner Familie, meinen Eltern und meinen Omas für die Motivation und Unterstützung während meines Studiums und der Dissertationsphase und meinen Freunden, die mich während der gesamten Zeit mit großem Verständnis und viel Geduld unterstützt haben.

Besonderer Dank geht an meine Schwester Lisa, für ihre bedingungslose Unterstützung und unendliche Schwersternliebe – weil ohne sie einfach „ois nix war“.