

Aus dem Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin
der Universität Würzburg

Komm. Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Groll

**Etablierung eines dreidimensionalen Tumormodells für das orale
Plattenepithelkarzinom unter Einsatz von Tissue Engineering**

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

vorgelegt von

Andrea Birgit Kunze
aus Würzburg

Würzburg, Juni 2020

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

Korreferent: apl. Prof. Dr. med. Stephan Hackenberg

Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 18.01.2021

Die Promovendin ist Zahnärztin.

In Liebe und Dankbarkeit meiner Familie gewidmet.

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AK	Antikörper
ALI	engl.: Air-Liquid-Interphase
ca.	circa / ungefähr
CaCl ₂	Kalziumchlorid
CK	Cytokeratin
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
CT	Computertomographie
d	engl.: day/days
DAB	Diaminobenzidin
DED	deepidermialisierte Dermis
DMEM	engl.: Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
EZM	Extrazellulärmatrix
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Fluoresceindiacetat
FeO	Eisenoxid
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykan

GTR	engl.: guided tissue regeneration
HE	Hämatoxylin-Eosin
HKGS	Human Keratinocyte Growth Supplement
HLaC	engl.: Cellosaurus cell line
HPV	Humanes Papillomvirus
HRP	engl.: horseradish (dt.: Meerrettichperoxidase)
Ig	Immunoglobulin
IHC	Immunhistochemie
k.A.	keine Angabe
KGF	Keratinocyte Growth Factor
mg	Milligramm
min	Minute / Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mm ²	Quadratmillimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NEAA	engl.: non essential amino acids
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
Nr.	Nummer
OMÄ	orales Mukosaäquivalent
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD-1	engl.: programmed cell death protein 1
PDT	engl.: population doubling time
PECA	Plattenepithelkarzinom
PET-CT	Positronen-Emissions-Tomographie – Computertomographie
pH	pH-Wert
PI	Propidiumiodid
PLA	Polylactid
rpm	engl.: revolutions per minute

RPMI	engl.: Roswell Park Memorial Institute
sek	Sekunde / Sekunden
SISmuc	engl.: Small Intestinal Submucosa
TEER	engl.: transepithelial electrical resistance
TNM	engl.: tumour, (lymph) node, metastasis
VE-Wasser	vollentsalztes Wasser
vgl.	vergleiche

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die Mundschleimhaut und das Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs	1
1.1.1	Schleimhaut der Mundhöhle	2
1.1.1.1	Der Aufbau der Schleimhaut	2
1.1.1.2	Die Funktion der Schleimhaut	8
1.1.2	Entstehung des Plattenepithelkarzinoms	9
1.1.3	Klinisches Erscheinungsbild des Plattenepithelkarzinoms	10
1.1.4	Diagnostik des Plattenepithelkarzinoms	11
1.1.5	Behandlungsmöglichkeiten des Plattenepithelkarzinoms	14
1.2	Tissue Engineering der Mundschleimhaut und des Plattenepithelkarzinoms	15
1.2.1	Das Prinzip des Tissue Engineerings	15
1.2.2	Tissue Engineering der Mundschleimhaut	17
1.2.2.1	Klinische Anwendung der <i>in vitro</i> Mundschleimhaut	21
1.2.2.2	<i>In vitro</i> Testsysteme zur Testung von Medikamenten und Materialien, sowie zur Erforschung von Krankheiten	22
1.2.3	Tissue Engineering von pathologischen Mundschleimhautmodellen einschließlich des Plattenepithelkarzinoms	22
1.3	Ziel der Arbeit	25
2	Material	27
2.1	Gewebe und Zellen	27
2.1.1	Biopsate	27
2.1.2	SISmuc als Zellmatrix	27
2.1.3	Tumorzelllinien FaDu, HLaC79 und HLaC79 Clone 1	28
2.2	Geräte	28
2.3	Labormaterialien	31
2.4	Verbrauchsmaterialien	32
2.5	Chemikalien und Lösungen	33
2.6	Medien für die Zellkultur	35

2.7	Lösungen für die Histologie	37
2.8	Lösungen für die Immunhistologie	38
2.9	Medikamente	40
2.10	Software	40
3	Methoden	41
3.1	Zellkultur	41
3.1.1	Isolation primärer Zellen	41
3.1.1.1	Isolation humaner Keratinozyten aus der Mundschleimhaut	41
3.1.1.2	Isolation primärer Fibroblasten aus der Mundschleimhaut	42
3.1.2	Passagieren von Zellen	42
3.1.2.1	Passagieren der Keratinozyten	42
3.1.2.2	Passagieren der Fibroblasten und der FaDu-, HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Tumorzellen	43
3.1.2.3	Neubauer Zählkammer	43
3.1.3	Kryokonservierung von Zellen	44
3.1.4	Auftauen von Zellen	44
3.1.5	Markierung der Tumorzellen mit perimag [®] Partikeln	44
3.1.6	Aufbau von oralen Mukosaäquivalenten und dreidimensionalen Plattenepithelkarzinommodellen	45
3.1.6.1	Zellkronen und SISmuc	45
3.1.6.2	Aufbau der dermalen Komponente	46
3.1.6.3	Aufbau der epidermalen Komponente	46
3.1.6.4	Aufbau von Mukosaäquivalenten mit Tumorzellen	47
3.1.6.5	Aufbau von Tumormodellen mit Hilfe eines gedruckten Zylinders	47
3.1.7	Isolation von primärem Tumorgewebe	48
3.2	Histologie	49
3.2.1	Herstellung der Paraffinschnitte	49
3.2.2	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	50
3.2.3	Berliner-Blau-Färbung	51
3.2.4	Immunhistologische Färbung mit HRP-basiertem Nachweissystem	53
3.3	Lebend-Tot-Färbung mit FDA/PI	55
3.4	Impedanzspektroskopie zur Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes	56

3.5	MTT-Assay	56
4	Ergebnisse	58
4.1	Isolation von primären Tumorzellen aus oralen Plattenepithelkarzinomen	58
4.2	Tumormodelle mit Zellen der FaDu-Tumorzelllinie	62
4.2.1	Histologie der Tumormodelle mit Zellen der FaDu-Zelllinie	62
4.2.2	Transepithelialer Widerstand der FaDu-Tumormodelle	66
4.2.3	Markierung der FaDu-Tumorzellen mit Eisenoxid	67
4.3	Tumormodelle mit Zellen der HLaC79-Tumorzelllinie und der HLaC79 Clone 1-Tumorzelllinie	70
4.3.1	Histologie der Tumormodelle mit Zellen der HLaC79- und der HLaC79 Clone 1-Zelllinie	70
4.3.2	Histologie der Tumormodelle mit Zellen der HLaC79-Zelllinie in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen	73
4.3.3	Immunhistologie der Tumormodelle mit Zellen der HLaC79-Zelllinie	75
4.3.4	Transepithelialer Widerstand der HLaC79-Tumormodelle	78
4.3.5	Markierung der HLaC79-Tumorzellen mit Eisenoxid	79
4.3.6	Histologie des HLaC79-Tumormodells nach Aufbau mit einem Zylinder aus PLA-Filament	80
4.4	Behandlung der HLaC79-Tumorzellen und der HLaC79-Tumormodelle mit den Medikamenten Salinomycin und Paclitaxel	82
4.4.1	Behandlung von HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Tumorzellen mit Salinomycin in zweidimensionaler Kultivierung	83
4.4.1.1	MTT-Test zur Zellviabilitätsbestimmung nach Behandlung in zweidimensionaler Kultivierung	83
4.4.1.2	Lebend-Tot-Färbung mit FDA/PI nach Behandlung in zweidimensionaler Kultivierung	85
4.4.2	Behandlung von HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Tumorzellen mit Paclitaxel in zweidimensionaler Kultivierung	87
4.4.2.1	MTT-Test zur Zellviabilitätsbestimmung nach Behandlung in zweidimensionaler Kultivierung	87
4.4.2.2	Lebend-Tot-Färbung mit FDA/PI nach Behandlung in zweidimensionaler Kultivierung	88
4.4.3	Behandlung von HLaC79-Tumormodellen mit Paclitaxel in dreidimensionaler Kultivierung	90
4.4.3.1	Histologie der HLaC79-Tumormodelle nach Behandlung	90

4.4.3.2	Transepithelialer Widerstand nach Behandlung in dreidimensionaler Kultivierung	93
4.4.3.3	MTT-Test zur Zellviabilitätsbestimmung nach Behandlung in dreidimensionaler Kultivierung	94
5	Diskussion	96
5.1	Diskussion der Methoden	96
5.2	Diskussion der Ergebnisse	106
6	Zusammenfassung	119
	Literaturverzeichnis	121
	Abbildungsverzeichnis	132
	Literaturverzeichnis der Abbildungen	134
	Tabellenverzeichnis	135

1 Einleitung

Jährlich versterben in Deutschland rund 210 000 Menschen an den Folgen einer Krebserkrankung. Krebs ist damit nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache ^[1]. Dementsprechend sind die Bemühungen in Forschung und Wissenschaft groß, die Tumormedizin weiter zu modernisieren und zu forcieren. „[...] Die neuartige Tumormedizin [...] zielt darauf ab, individuelle Therapien für Patienten zu entwickeln. Dies ist nur mit einem hochgradig vernetzten Forschungs- und Versorgungsmodell möglich [...]“, erkannte Erwin Liek in seinem Buch „Der Kampf gegen den Krebs“ bereits 1934 ^[2]. Dabei wird nicht immer nur das Einstellen von Tierversuchen gefordert. Für die Vergleichbarkeit wissenschaftlicher Arbeiten ist auch das Bestreben nach möglichst standardisierten und reproduzierbaren Methoden unerlässlich. Nur derartige Methoden können letzten Endes Aussage über das Potential einer etwaigen Therapie geben. So liegt der Wunsch nahe, auch dreidimensionale *in vitro* Tumormodelle im Rahmen der Forschung zu etablieren, diese histologisch zu charakterisieren und mit primären Tumoren zu vergleichen. Am Ende steht die Reliabilität im Vordergrund, um als nächsten Schritt neuartige Medikamente vorerst *in vitro* zu testen, bevor sie für den klinischen Nutzen am Patienten eingesetzt werden können.

1.1 Die Mundschleimhaut und das Plattenepithelkarzinom des Kopf- und Halsbereichs

Orale Plattenepithelkarzinome werden in der Histogenese den malignen ektodermalen Tumoren zugeordnet. Im Folgenden werden die Risikofaktoren und die Entstehung des Mundhöhlenkarzinoms mit seinen verschiedenen Präkanzerosen, das klinische Erscheinungsbild, die Diagnostik und die möglichen Therapien geschildert.

Um diese maligne Schleimhautveränderung jedoch von einer gesunden physiologischen Mundschleimhaut sowohl makro- als auch mikroskopisch abzugrenzen, wird anfangs die apathologische orale Schleimhaut in verschiedenen Regionen der Mundhöhle beschrieben.

Einleitung

1.1.1 Schleimhaut der Mundhöhle

Durch die Alveolarfortsätze im Ober- und Unterkiefer lässt sich die Mundhöhle in zwei Räume einteilen. Der Mundvorhof, Vestibulum oris, ist der Raum zwischen den Lippen und Wangen und den Zähnen. Die eigentliche Mundhöhle, Cavum oris proprium, wird anterior und lateral von den Zahnreihen, posterolateral von den Gaumenbögen, kaudal von der Zunge und von dem Mundboden und kranial von dem harten und weichen Gaumen begrenzt.

1.1.1.1 Der Aufbau der Schleimhaut

Das Epithel der Lippen, des Vestibulums, der Gingiva, der Wangen, des Mundbodens und des Gaumens ist ektodermalen Ursprungs, während das Zungenepithel endodermaler Herkunft ist. Die Mundschleimhaut kleidet die gesamte Mundhöhle aus und besteht generell aus einem mehrschichtigen Plattenepithel, einer Lamina propria und einer Submukosa. Dabei treten im Aufbau Abweichungen zwischen den verschiedenen Regionen der Mundhöhle auf, weshalb von Orban und Sicher im Jahr 1943 die Unterteilung in drei Arten erfolgte ^[3]:

1. Die mastikatorische Schleimhaut, die die Gingiva und die Schleimhaut des harten Gaumens einschließt.
2. Die auskleidende Schleimhaut, die sich im Bereich des Mundbodens, der Wangen, des weichen Gaumens und der Innenlippen befindet.
3. Die spezialisierte Schleimhaut mit ihren Geschmacksknospen für die Geschmackswahrnehmung auf der hinteren Zungenoberfläche.

Einleitung

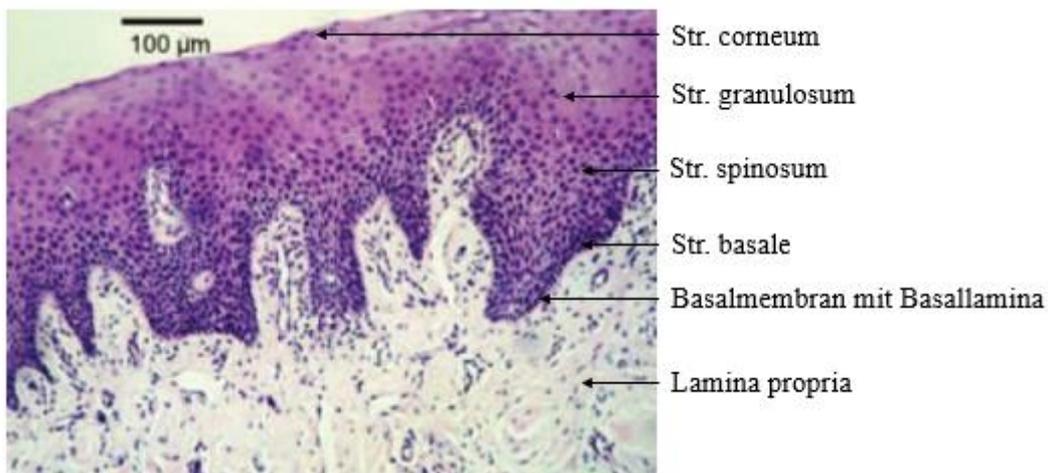


Abbildung 1 ^[4]: **Native parakeratinisierte mastikatorische Schleimhaut.** Histologisches Bild nach H.E.-Färbung mit Beschriftung der einzelnen Schichten. Größenbalken entspricht 100 µm.

Das mehrschichtige Plattenepithel der oralen Schleimhaut besteht gewöhnlich aus vier Schichten, welche vor allem in der **mastikatorischen Schleimhaut** vorzufinden sind. Von innen nach außen treten die Schichten in folgender Reihenfolge auf: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum ^[5] (vgl. Abbildung 1).

Die oralen Keratinozyten des Stratum basale sitzen der Basallamina, welche die Grenze zwischen Epithel und darunterliegendem Bindegewebe darstellt, kubisch palisadenförmig auf. Die Keratinozyten werden in regelmäßigen Abständen erneuert, da sich ältere Keratinozyten von basal nach apikal einem Differenzierungsprozess unterziehen, indem sie ihre Zell- und Kernmorphologie ändern und zuletzt nach 41 bis 57 Tagen in der oberflächlichsten Schicht, dem Stratum corneum, abgeschilfert werden ^[6, 7]. Die Keratinozyten im Stratum basale produzieren membranverkleidende Granula, die das Epithel vor Mikroorganismen und Flüssigkeitseintritt schützen ^[8].

Das Stratum spinosum ist die erste Schicht, in denen differenzierte Epithelzellen sichtbar werden. Durch die Zunahme von Keratin und Desmosomen liegt hier ein stärkerer Zellverband vor ^[9]. Des Weiteren erfolgt eine Verstärkung der Expression von Cytokeratin 10 und eine Verminderung von Cytokeratin 14 ^[10]. Bei den Cytokeratinen handelt es sich um Intermediärfilamente in allen Epithelien, die bei einer Differenzierung als Epithelmarker dienen ^[4].

Einleitung

In der nächsten Schicht, dem Stratum granulosum, haben sich die Keratinozyten weiter differenziert und haben jetzt das Aussehen von großen polygonalen Zellen mit sichtbarer Keratohyalingranula ^[11]. Dies sind kleine, dunkle, scharf begrenzte und von Ribosomen umgebene Granula, die Keratohyalin beinhalten. Dieses wird im Stratum corneum in Keratin umgewandelt ^[5]. In den äußeren Zellschichten wird weniger Cytokeratin 10 exprimiert ^[10].

Die größten Abweichungen des Mundschleimhautepithels sind aufgrund der unterschiedlichen Lokalisationen in der Mundhöhle im Stratum corneum vorzufinden. Die mastikatorische Schleimhaut ist sowohl im Bereich der befestigten Gingiva, und somit in unmittelbarer Nachbarschaft zu den Zähnen, als auch am harten Gaumen vorzufinden. Diese Gebiete sind höheren mechanischen Belastungen ausgesetzt als die restliche Mundschleimhaut und weisen aufgrund dessen ein orthokeratinisiertes oder parakeratinisiertes Epithel auf ^[12]. Bei einer Orthokeratinisierung besteht das homogene Stratum corneum aus flachen und dicht aneinander gereihten Keratinozyten ohne Zellkern. Diese Hornschuppen setzen sich aus Keratinfilamenten zusammen. Im Gegensatz dazu verschwinden bei einer Parakeratinisierung die Zellorganellen, die Granula und der Zellkern der Keratinozyten jedoch nur zum Teil ^[7]. Das Stratum corneum liegt also als homogene Schicht mit stark pyknotischen Zellkernen vor (vgl. Abbildung 2). Bei einer Entzündung der mastikatorischen Schleimhaut ist manchmal auch ein unvollständig parakeratinisiertes Epithel aufzufinden ^[13]. Histologisch zeigt sich dies in einem inhomogenen Stratum corneum mit kernlosen und kernhaltigen Zellen, die Granula enthalten. Das Epithel ist insgesamt flexibler, verformbar und weist eine weniger wasserresistente Schicht auf ^[6].

Gap junctions und Desmosomen verknüpfen alle Epithelzellen miteinander, um Stofftransport und Kommunikation untereinander zu ermöglichen, wobei deren Dichte von basal nach superfizial zunimmt ^[5, 8, 9]. Besonders der Keratinocyte Growth Factor (KGF) sorgt für das Wachstum und die Differenzierung der Keratinozyten ^[10].

Zusätzlich zu den Keratinozyten liegen Melanozyten für die Pigmentierung, Merkel-Zellen für die Somatosensorik und Langerhans-Zellen für die immunologische Abwehr im Epithel vor ^[11]. Das Epithel der mastikatorischen Schleimhaut ist insgesamt zwischen 200 µm und 300 µm dick ^[9].

Unter dem Stratum basale liegt zwischen Epithel und Lamina propria die Basalmembran

Einleitung

mit einer Dicke von 1 μm , die hauptsächlich von den Epithelzellen gebildet wird und eine Basallamina enthält. Diese 50 nm bis 100 nm dicke Basallamina wird wiederum unterteilt in eine Lamina lucida und eine Lamina densa ^[14]. Dabei verankert die Lamina densa kollagene Ankerfibrillen, die von der darunterliegenden Lamina propria dorthin ausstrahlen, und lässt eine zapfenartige Verzahnung und ein Zerklüftungsmuster entstehen. Gleichzeitig strahlen vom Stratum basale Hemidesmosomen mit Tonofilamenten in die Basallamina ein ^[5]. Dadurch entsteht durch diesen sogenannten Papillarkörper eine große Kontaktfläche zwischen Epithel und Bindegewebe, die vor allem bei der mastikatorischen Schleimhaut aufgrund der hohen mechanischen Belastung vorzufinden ist ^[15]. Die Basallamina enthält neben Kollagen IV auch Laminin und Integrine ^[16, 17].

Die Lamina propria, das subepitheliale Bindegewebe, wird von den Fibroblasten gebildet, die hier ihr größtes Vorkommen aufweisen. In dieser befindet sich zum einen der Papillarkörper, der für eine Verankerung der Lamina propria mit dem Epithel sorgt, und zum anderen kommen hier kleine Blutgefäße, Kollagenfasern und freie Nervenendigungen vor, die sich ebenfalls bis in das Epithel ziehen können ^[18]. Da elastische Fasern hier gänzlich fehlen, bilden Kollagenfasern den dento-alveolären Faserapparat ^[19]. Des Weiteren sorgen Kollagenfaserbündel mit verschiedenen Kollagentypen durch ihr Einstrahlen in das benachbarte Wurzelzement oder das Periost für eine unverschiebliche Verankerung zwischen Gingiva und Zahn sowie Gingiva und Knochen ^[8].

In der tieferliegenden Submukosa liegen einzelne Speicheldrüsen, größere Blutgefäße und Fettzellen ^[11].

Einleitung

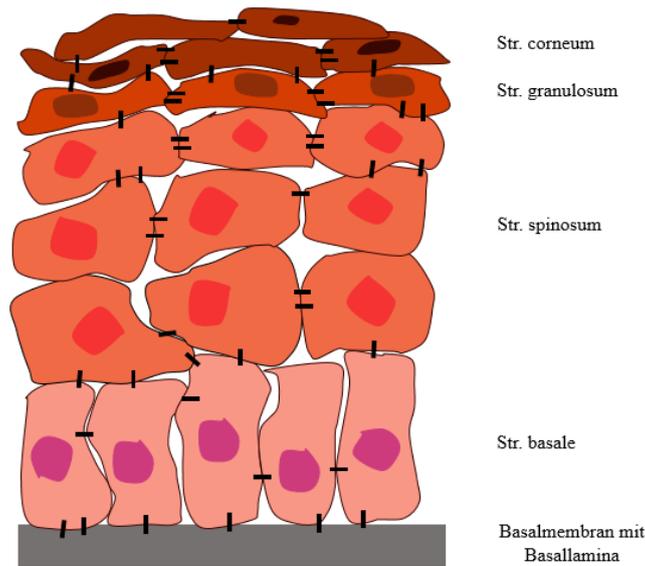


Abbildung 2 ^[20]: **Schematische Darstellung eines parakeratinisierten mehrschichtigen Plattenepithels.** Mit Beschriftung der einzelnen Schichten von basal nach apikal.

Die **auskleidende Schleimhaut** bedeckt intraoral die Lippen, die Alveolarfortsätze, den Mundvorhof, die Wangen, den weichen Gaumen, die kaudale Seite der Zunge und den Mundboden ^[20]. Aufgrund ihrer Lokalisation wird diese während der Kauphasen weniger bis kaum beansprucht, was sich auch besonders im Aufbau des Epithels bemerkbar macht. Histologisch zeigt sich dies mit einer Dicke von 580 μm , folglich also ein doppelt so dickes Epithel wie die mastikatorische Schleimhaut ^[21]. Die Schichten lassen sich von basal nach superfizial als Stratum basale, Stratum filamentosum und Stratum distendum bezeichnen. Wie auch bei der mastikatorischen Schleimhaut differenzieren sich die basalen Zellen schnell während sie mit der Zeit an die Oberfläche gelangen. Die Keratinozyten sind im Stratum filamentosum größer und polygonal, flachen im oberen Bereich dieser Schicht und im Stratum distendum stark ab und haben dort eine langgestreckte Morphologie mit wenig Keratohyalin granula ^[19]. Während das Stratum distendum an der Lippe vergleichsweise dünn ist, hat es an der Wange eine beachtliche Dicke ^[9]. Die Grundsubstanz der Keratinozyten nimmt zur Oberfläche hin ab und ab dem Stratum filamentosum nehmen die zytoplasmatischen Keratinfilamente zu ^[22]. Gap junctions kommen auch hier vor und der Anteil der Desmosomen nimmt zur Oberfläche hin ebenfalls zu. Das Epithel der Wange, der Lippen und des Mundbodens wird nach 14 Tagen erneuert ^[19].

Einleitung

Die Basalmembran unterhalb des Stratum basale entspricht in ihrem Aufbau der der mastikatorischen Schleimhaut: die Basallamina sowie retikuläre und kollagene Fibrillen sind vorhanden. Der Papillarkörper jedoch, der von der Lamina propria gebildet wird und durch Papillen mit dem Epithel verzapft ist, ist hier weniger dicht als in der Gingiva ^[23]. Das lockere Bindegewebe mit vielen elastischen Fasern in der Lamina propria weist ebenfalls auf die lockere Struktur dieser Schleimhautareale hin und bildet einen großen Kontrast zum Bindegewebe in der mastikatorischen Schleimhaut ^[11].

In der Submukosa liegen viele Fettzellen, Blutgefäße, Nervenendigungen und Drüsen, die die kleinen mukösen Speicheldrüsen Glandulae labiales und buccales und die große seromuköse Glandula sublingualis bilden ^[19]. Die Lippen- und Wangenschleimhaut hat keine Eigenbeweglichkeit, da die Fasern der Lamina propria in die Sehnen der mimischen Muskulatur einstrahlen. Da die Submukosa der Mundbodenschleimhaut jedoch an die zahlreichen tieferliegenden Drüsen grenzt, ist sie nur wenig mit der Faszie der Mundbodenmuskulatur verbunden und gegen diese sehr frei beweglich ^[7].

Hiervon abzugrenzen ist die Alveolarschleimhaut, die von der mukogingivalen Grenze bis zur vestibulären Umschlagsfalte vorkommt ^[24]. Da von der Submukosa nur wenige kollagene Faserbündel in das darunterliegende Periost einstrahlen, ist diese gut dagegen verschiebbar und auch abhebbar ^[8]. Insgesamt ist die Alveolarschleimhaut dünner als die Lippen- und Wangenschleimhaut.

Eine weitere abgrenzbare Mundschleimhautregion ist die **spezialisierte Schleimhaut**, die der dorsalen Zunge aufliegt. Ihre große Oberfläche, die durch zahlreiche Krypten zustande kommt und mit vielen unterschiedlichen Papillen versehen ist, ermöglicht das Tast-, Temperatur- und Geschmacksempfinden. Die Schichten des Epithels entsprechen denen der mastikatorischen Schleimhaut (Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum und Stratum corneum). Die Lamina propria der hinteren Zungenschleimhaut weist je nach Ausprägung und Aussehen unterschiedlich große Papillen auf, sodass sich diese in Papillae filiformes, Papillae fungiformes, Papillae foliatae und Papillae vallatae aufteilen lassen. Die Papillae filiformes, die auf dem kompletten Zungenrücken zu finden sind, werden von einem orthokeratinisierten Epithel mit Melanozyten und Langerhans-Zellen überzogen, welches an der Zungenspitze dicker ist als an der Zungenwurzel. Im Unterschied dazu werden die Abschnitte zwischen

Einleitung

den Papillen von unvollständig parakeratinisiertem Epithel überzogen ^[25]. Die Submukosa enthält kollagene und elastische Faserbündel sowie freie Nervenendigungen. Im posterioren Bereich der Zunge befinden sich Krypten, die lymphatisches Gewebe beinhalten ^[11].

1.1.1.2 Die Funktion der Schleimhaut

Durch den Aufbau der mastikatorischen Schleimhaut mit einer gegen darunterliegende anatomische Strukturen wie dem Periost oder Muskelfasern unverschieblichen Lamina propria und vielen desmosomalen Zell-Zell-Kontakten findet man diesen oralen Schleimhauttyp dort, wo große mechanische Belastungen auftreten: in der Gingiva und im harten Gaumen. Dadurch wird gleichzeitig eine Art mechanische Barriere gebildet, die das darunterliegende Gewebe vor harten Nahrungsbestandteilen schützt. Gleichzeitig sorgt diese Morphologie der mastikatorischen Schleimhaut für eine chemische Barriere, sodass hier keine chemischen Noxen in das Gewebe eindringen können. Im Gegensatz dazu weist die auskleidende Schleimhaut eine weniger dichte Barriere auf und ist zum Beispiel für Medikamente in geeigneten Konzentrationen permeabel, sodass einige Medikamente schnell über die Mundbodenschleimhaut aufgenommen werden und sich systemisch im Körper ausbreiten können ^[7, 26].

Eine weitere Funktion der oralen Schleimhaut ist die Speichelsekretion. In der gesamten Mundschleimhaut sind kleine Speicheldrüsen angesiedelt, die sowohl in Ruhe, als auch bei einem Stimulus Speichel sezernieren. Bestimmte Enzyme im Speichel sorgen für eine Vorverdauung der aufgenommenen Nahrung, eine Abmilderung von mechanischen Reizen, eine Neutralisierung von chemischen Reizen und eine Remineralisation der Zähne nach Nahrungskontakt um einer Kariesentstehung vorzubeugen. Außerdem sorgt der Speichel für eine gewisse Gleitfähigkeit des Essensbolus nach posterior in den Pharynx, wobei die Zunge durch ihre Transportfunktion auch hierbei eine große Rolle spielt ^[19].

In der gesamten oralen Schleimhaut befinden sich Sinnesrezeptoren, die für die Somatosensorik und Nozizeption verantwortlich sind. Diese sind neben den Geschmacksknospen für fünf verschiedene Geschmacksrichtungen ebenfalls auf der spezialisierten Zungenschleimhaut vorzufinden ^[20].

1.1.2 Entstehung des Plattenepithelkarzinoms

Maligne Tumoren im Kopf- und Halsbereich haben einen Anteil von 5 bis 6 Prozent unter allen bösartigen Tumoren ^[27]. Das Robert-Koch-Institut publizierte 2017 seinen neuesten jährlichen Bericht zum Krebsgeschehen und veröffentlichte die Anzahl an Patienten, die im Jahr 2016 neu an Karzinomen der Lippe, der Mundhöhle, des Rachens und der oberen Atemwege erkrankten: 4 523 Frauen und 14 992 Männer. Das durchschnittliche Erkrankungsalter lag bei den Frauen bei 66,2 Jahren und war mit 63,8 Jahren bei den Männern leicht höher ^[28]. Während der aktuelle Trend der Neuerkrankungen bei den Männern mit – 0,7 % leicht rückläufig ist, liegt dieser bei den Frauen bei + 1,3 %, welcher sich durch die Zunahme an Raucherinnen erklären lässt ^[29]. Die 5-Jahr-Überlebensrate beträgt 61 % bei den Frauen und 51 % bei den Männern ^[28]. Dieser geringe Prozentsatz kommt vor allem durch die späte Diagnosestellung zustande, da orale Plattenepithelkarzinome aufgrund ihrer fehlenden und atypischen Symptome oftmals nur zufällig bei einer Kontrolluntersuchung entdeckt werden und dann schon meistens ein beträchtliches Ausmaß angenommen haben und sich sowohl Metastasen in angrenzende Lymphknoten als auch Fernmetastasen gebildet haben ^[30].

Der Beginn der Kanzerogenese, also der Tumorentstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms, kann sowohl durch Mutationen in der Zellteilung spontan auftreten ^[30], als auch durch Kanzerogene hervorgerufen werden. Unter dem Begriff Kanzerogene werden tumorerzeugende Faktoren zusammengefasst. So spielt der Alkoholgenuss kombiniert mit Tabakkonsum eine entscheidende Rolle in der Entstehung des oralen Plattenepithelkarzinoms ^[31], während reiner Alkoholkonsum in Maßen nicht als Risikofaktor angesehen wird. Bei einer Zunahme des Alkoholkonsums im Sinne eines chronischen Alkoholmissbrauchs, wird das Immunsystem jedoch derart geschwächt, dass das Krebsrisiko und die Tumorentstehung dennoch begünstigt werden können ^[30, 32]. Außerdem erhöht Alkohol die Permeabilität und erleichtert so ein Eindringen des kanzerogenen Tabaks in die Mundschleimhaut, welcher dort für eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 sorgt ^[33, 34].

Eine weitere Ursache liegt in der dauerhaften mechanischen Reizung der Mundschleimhaut, welche durch abstehende Füllungs- und Kronenränder, aber auch durch Dekubitusstellen von schlecht sitzenden Zahnprothesen hervorgerufen werden kann.

Auch die humanen Papillomaviren 16 und 18 nehmen eine zunehmend größere Rolle in der Ätiologie der Plattenepithelkarzinomentstehung ein ^[35, 36] und sorgen vor allem am Zungenrund, im Oropharynx und an den Tonsillae palatinae für eine Tumorzellproliferation ^[28]. So werden heutzutage in zwei Drittel aller oralen Plattenepithelkarzinome HPV-DNS nachgewiesen, wobei vor allem die Onkogene des HPV-16 das Tumorsuppressorgen p53 inaktivieren und für eine Tumorzellproliferation sorgen ^[37].

1.1.3 Klinisches Erscheinungsbild des Plattenepithelkarzinoms

Das Erscheinungsbild des oralen Plattenepithelkarzinoms weist viele Variationen auf. Schon Leukoplakien oder Erythroplakien, also flächenhafte weiße oder rötliche Mundschleimhautveränderungen, können maligne entarten ^[30, 38]. Während die Erythroplakien ein größeres Entartungsrisiko besitzen, schwankt das Risiko bei den Leukoplakien zwischen 4 und 54 % ^[39, 40]. Diese Präkanzerosen können sich im weiteren Verlauf als Tumor exophytisch blumenkohlartig in die Mundhöhle vorwölben oder endophytisch infiltrierend wachsen, welches dazu veranlasst, dass sich die klinischen Symptome nicht unter einem Erscheinungsbild zusammenfassen lassen ^[41]. Ein klares Abgrenzen zur gesunden oralen Schleimhaut ist nicht möglich. Da sich die meisten Schleimhautveränderungen als schmerzlose Erscheinungen darstellen, werden diese kaum von der erkrankten Person wahrgenommen und selbst Hauszahnärzte erkennen Präkanzerosen im Durchschnitt lediglich in 10 % aller Fälle ^[42].

Allerdings treten auch Symptome auf, die von betroffenen Patienten bemerkt werden. Darunter kann zum einen das Auftreten einer Spontanblutung fallen, ohne dass das Schleimhautareal mechanisch lädiert wurde. Zum anderen klagen Patienten mit einem herausnehmbaren Zahnersatz bei einem Karzinom im Mundboden oder am Gaumen über einen schlechteren Prothesensitz. Bei Karzinomen, die den Unterkieferknochen infiltrieren, kann es zu einer Läsion des Nervus alveolaris inferior kommen, die der Patient als Hyp- oder Parästhesien beschreibt. Gewichtsverlust, Halitosis, Schluckbeschwerden und Mundöffnungsbehinderungen können ergänzend dem klinischen Erscheinungsbild hinzugefügt werden ^[41]. Da die ersten Fernmetastasen überwiegend in der Lunge gebildet werden, klagen betroffene Patienten oft über eine Dyspnoe ^[43].

1.1.4 Diagnostik des Plattenepithelkarzinoms

Bei der Diagnostik des Plattenepithelkarzinoms in der Mundhöhle, im Pharynx und im Larynx werden die Anamnese, die klinische und die bildgebende Diagnostik voneinander unterschieden ^[30].

Die allgemeine Anamnese des Patienten gibt Aufschluss über ein erstmaliges Auftreten von Begleitsymptomen. Dazu gehören zum Beispiel Leistungsabfall und ungewollter Gewichtsverlust. Weiterhin liefert die Anamnese Informationen über mögliche Risikofaktoren, die die Tumorentstehung begünstigen: Tabak, Alkohol und andere Expositionen gegenüber weiteren Kanzerogenen ^[30]. Auch die Berufsanamnese darf nicht in den Hintergrund geraten: Personen, die einer hohen Sonnenexposition ausgesetzt sind oder waren, wie beispielsweise Landwirte, besitzen ein höheres Risiko an einem Plattenepithelkarzinom der Unterlippe zu erkranken ^[44].

Zur klinischen Diagnostik gehört die Anwendung der Sinneswahrnehmungen des behandelnden Arztes. Jeder Zahnarzt ist verpflichtet, im Rahmen eines Prophylaxetermins die oralen Schleimhäute seines Patienten optisch genauestens auf rötliche und weißliche Farbveränderungen, sowie auf entzündliche und offene Stellen zu untersuchen, diese zu beobachten und zu dokumentieren. Dabei spielen vor allem Größe, Farbe, Oberflächenbeschaffenheit, Abgrenzbarkeit und Konsistenz des Tumors eine große Rolle ^[30]. In diesem Zug kann schon eine vorläufige Diagnose gestellt werden, da sich benigne und maligne Tumoren in diesen Kriterien meistens gut voneinander abgrenzen lassen (vgl. Kapitel 1.1.3). Nicht rückläufige Schleimhautveränderungen sollten mit Hilfe einer Biopsie histopathologisch untersucht werden ^[45], um eine sichere Benignität oder Malignität zu diagnostizieren. Des Weiteren entwickeln Patienten mit persistierenden ulzerierenden malignen Schleimhautveränderungen einen unangenehmen Mundgeruch (vgl. Kapitel 1.1.3), der von Personen im näheren Umfeld registriert werden kann. Patienten mit einem Larynxkarzinom leiden oft unter Heiserkeit, welche von Betroffenen selbst, aber auch von anderen Personen, wahrgenommen werden kann. Die Lymphknoten im Halsbereich sollten regelmäßig palpiert werden um Schwellungen und Konsistenzveränderungen frühestmöglich zu erkennen und somit weitere Metastasen verhindert werden können ^[46].

Eine bildgebende Diagnostik ist im Rahmen der Tumordiagnostik unumgänglich. Dazu gehören zum einen die Sonographie, die konventionelle zweidimensionale

Einleitung

Röntgenuntersuchung durch ein Orthopantomogramm, die digitale Volumentomographie (DVT), die Computertomographie (CT), die Positronen-Emissions-Tomographie (PET-CT) und die Magnetresonanztomographie (MRT), die Informationen der Infiltration des Tumors in benachbarte Strukturen wie Knochen und Weichteilgewebe und seine tatsächliche Größe sowie über eventuell vorkommende Zweitkarzinome liefern [30, 47]. Zum anderen erfolgt eine Panendoskopie des Ösophagus, der Trachea, des Larynx und des Pharynx um einen Zweitbefund auszuschließen [48]. Eine weitere Methode, um Fernmetastasen aufzusuchen, ist die Skelettszintigrafie. Eine Probeexzision des verdächtigen Gewebes für die pathologische Untersuchung erfolgt bestmöglich nach den bildgebenden Verfahren, damit kein künstlich hervorgerufenen entzündliches Gewebe geschaffen wird und somit eine Verfälschung der Ergebnisse stattfindet.

Dies alles wird unter dem Begriff „Staging“ zusammengefasst, um das Plattenepithelkarzinom in ein TNM-Stadium einzuordnen und erfolgt vor jeder operativen Exzision.

Die TNM-Klassifikation dient der Einordnung des Tumors in ein Stadium. Die Klassifikation wurde erstmals von Pierre Denoix in den Jahren 1943 bis 1952 entwickelt [49] und wird seit dem Jahr 1950 von der Union internationale contre le cancer (UICC, deutsch: Internationale Union gegen den Krebs) weitergeführt, um eine internationale Tumorklassifikation zu etablieren [50]. Dafür werden sowohl die Größe und Ausbreitung des Primärtumors (T0 bis T4), als auch das Vorkommen von Lymphknotenmetastasen im Kopf- und Halsbereich (N0 bis N2) und Fernmetastasen (M0 und M1) berücksichtigt (TNM, englisch: tumor, node, metastasis). Dabei wird das cTNM-Stadium (englisch: clinical), welches lediglich die Ergebnisse der bildgebenden Untersuchungen beschreibt, von dem pTNM-Stadium (englisch: pathological), in welches der Tumor nach der histopathologischen Untersuchung eingeordnet wird, unterschieden. Letzteres wird dafür verwendet um eine geeignete und individuelle postoperative Therapie festzulegen.

In Tabelle 1 werden die unterschiedlichen Stadien des TNM-Schemas der 7. Ausgabe der UICC von 2010 eines oralen Plattenepithelkarzinoms dargestellt [30, 51].

Tabelle 1: TNM-Klassifikation eines oralen Plattenepithelkarzinoms

T0	Kein Primärtumor
-----------	------------------

Einleitung

T1	Tumorgröße kleiner als 2 cm
T2	Tumorgröße zwischen 2 und 4 cm
T3	Tumorgröße größer als 4 cm
T4a	Tumor infiltriert durch Knochen in Gesichtshaut, Zunge oder Kieferhöhle
T4b	Tumor infiltriert in Kaumuskulatur, Pterygoid, Schädelbasis und/oder Arteria carotis interna
Tis	Carcinoma in situ
Tx	Keine Beurteilung möglich
N0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase in ipsilateralen Lymphknoten, kleiner als 3 cm
N2a	Metastase in ipsilateralen Lymphknoten zwischen 3 und 6 cm
N2b	Metastasen in ipsilaterale Lymphknoten unter 6 cm
N2c	Metastasen in kontralateralen oder bilateralen Lymphknoten unter 6 cm
N3	Metastasen in Lymphknoten größer als 6 cm
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen vorhanden

Einleitung

Die Union internationale contre le cancer, welche 1933 gegründet wurde, teilt die Stadien der TNM-Klassifikation nochmals in vier Stadien ein ^[30, 51]. Tabelle 2 zeigt die UICC-Einteilung des oralen Plattenepithelkarzinoms.

Tabelle 2: UICC-Einteilung des oralen Plattenepithelkarzinoms mit Hilfe der TNM-Klassifikation

Stadium 0	Tis N0 M0
Stadium I	T1 N0 M0
Stadium II	T2 N0 M0
Stadium III	T3 N1 M0
Stadium IV A	T4 N2 M0
Stadium IV B	T4 N3 M0
Stadium IV C	jedes T, jedes N und M1

1.1.5 Behandlungsmöglichkeiten des Plattenepithelkarzinoms

Bei den Behandlungsmöglichkeiten des oralen Plattenepithelkarzinoms lassen sich zwei Arten von Therapien voneinander unterscheiden: die kurative und die palliative Therapie ^[30]. Dabei ist stets ein Zusammenkommen von Fachärzten im Rahmen eines Tumorboards notwendig, um eine auf den Patienten und die Gesamtsituation individuell abgestimmte Therapie zu ermöglichen. Abzuwägen sind dabei die Größe und Infiltration des Tumors, die Chance einer vollständigen Resektion mit anschließender Rekonstruktion und die postoperative Lebensqualität des Patienten ^[52].

Während die palliative Therapie von Beginn an keine komplette Tumorheilung beabsichtigt, sondern dem Patienten eine individuelle Behandlung anbietet, sein Tumorleiden und die damit verbundenen Einschränkungen in seinen letzten Lebtagen so angenehm wie möglich zu gestalten, zielt die kurative Therapie auf eine vollständige Heilung ohne Rezidive ab. Dabei wird ebenfalls ein individuelles Vorgehen vereinbart, welches sich nach Lokalisation und TNM-Stadium des Tumors, aber auch nach Allgemeinzustand und Wunsch des Patienten richtet. Die kurativen Therapieoptionen werden eingeteilt in die alleinige Operation, die alleinige Radiatio oder Radiochemotherapie und die kombinierte Therapie aus Operation und anschließender

Radiatio oder Radiochemotherapie ^[53, 54]. Oberstes Ziel einer Operation ist es dabei eine vollständige Tumorresektion mit Sicherheitsabstand im gesunden Gewebe, als auch eine ein- oder beidseitige Lymphadenektomie des Halses, eine Neck dissection, bei Metastasen in den dort angrenzenden Lymphknoten, durchzuführen ^[30]. Bei einer Radiatio, also einer Strahlentherapie, wird das betroffene Areal ionisierender Strahlung ausgesetzt um eventuell zurückgebliebene Tumorzellen dauerhaft zu schädigen und das Wachstum zu hemmen.

Bei der Chemotherapie kommen Chemotherapeutika zum Einsatz, die entweder systemisch oder lokal und meistens in Kombinationen verabreicht werden. Die meisten Chemotherapeutika sollen Mikrometastasen und postoperativ verbliebene Tumorzellen eliminieren, indem sie die Tumorzellen auf die Strahlenwirkung sensibilisieren ^[55, 56]. Chemotherapeutika greifen dabei alle schnell proliferierenden Zellen an. Das sind neben verbliebenen Tumorzellen auch Zellen in der Hämatopoese und im Gastrointestinaltrakt, die zu starken Nebenwirkungen wie Anämie, Übelkeit und Erbrechen führen können ^[57]. Neben der genannten konservativen Säule der onkologischen Therapie hat sich zuweilen die Immuntherapie als zusätzliche Behandlungsstrategie von Plattenepithelkarzinomen bei Patienten mit Rezidiven und Metastasen etabliert. Pembrolizumab, ein Checkpoint-Inhibitor, erhielt 2016 in den Vereinigten Staaten die Zulassung zur Anwendung bei Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich, wobei es die Bindung von PD-1 an seinen Rezeptor unterbindet und somit die Potenz des Immunsystems vorantreibt ^[58]. Es kann als alleinige Monotherapie eingesetzt werden oder in Kombination mit Chemotherapie, sodass diese weiterhin eine zentrale Rolle in der Bekämpfung des Karzinoms einnimmt ^[59].

1.2 Tissue Engineering der Mundschleimhaut und des Plattenepithelkarzinoms

1.2.1 Das Prinzip des Tissue Engineerings

Die Thematik des Tissue Engineerings hat in den letzten Jahrzehnten sehr an Bedeutung gewonnen. Der Begriff Tissue Engineering bezeichnet eine künstliche Herstellung von Gewebe aus patienteneigenen Zellen *in vitro*, wobei eine starke interdisziplinäre Zusammenarbeit aus Fachleuten der Biologie, der Chemie, der Physik und der Medizin

Einleitung

unabdingbar ist ^[60]. Durch die begrenzte Anzahl an Spenderorganen für bedürftige Patienten und das aus experimentellen und klinischen Studien eindeutige Ergebnis, dass Patienten autogene, also körpereigene, Gewebetransplantate ohne Abstoßungsreaktion und ohne lebenslange Einnahme von Immunsuppressiva sehr gut annehmen, sind allogene, xenogene und synthetische Gewebeersatzpräparate allmählich in den Hintergrund gerückt ^[4]. Das oberste Ziel des Tissue Engineerings ist es, ein Material zu schaffen, welches in vielen mikroskopischen und makroskopischen Aspekten mit dem Gewebe des Transplantationsortes übereinstimmt. Das Prinzip des Tissue Engineerings ist in Abbildung 3 dargestellt. Dabei werden einem Spender ein oder mehrere Gewebe entnommen um anschließend im Labor die verschiedenen Zellarten voneinander zu isolieren. Mit geeigneten Zellkulturmedien und entsprechenden Wachstumsfaktoren werden diese Zellen kultiviert und zur Proliferation angeregt. Durch die Anwendung einer biologischen oder synthetischen Matrix, oft auch Scaffold genannt, wird ein Gerüst geschaffen, in welchem die Zellen zu einer dreidimensionalen Kultivierung heranwachsen können. Diese Zell-Matrix-Konstrukte können zu jedem beliebigen Zeitpunkt für diverse Tests herangezogen werden. Bei gewünschten Ergebnissen können diese fertigen Konstrukte dem Spender transplantiert werden ^[61, 62].

Erste Erfolge mit dem Kultivieren von patienteneigenen Zellen und anschließender Reimplantation beschrieben Madden *et al*, die 1986 apathologische Vollhaut und Schleimhaut von Verbrennungsoffern entnahmen und nach *in vitro* Vermehrung mit diesen Gewebstransplantaten Brandwunden abdeckten ^[63]. Ein weiterer Nutzen ist durch die *in vitro* Nachbildung einer *in vivo* gesunden oder pathologischen Struktur die anschließende Testung von komplett neuartigen Pharmaka und Pharmaka mit einer neuen Zusammensetzung mit Hilfe von Biokompatibilitätstests oder beispielhaft die histologische zeitliche Auswertung bei einer Wundheilung ^[4]. So ist es möglich, die Anzahl an Tierversuchen zu verringern. Dies zieht eine niedrigere Tiersterberate mit sich und Testabweichungen zwischen Tier und Mensch werden auf ein Minimum reduziert.

Das große Ziel der Forschung ist es, komplette Organe mit Hilfe des Tissue Engineerings zu rekonstruieren und bei demselben Spender zu reimplantieren. Bis *dato* konnten große Erfolge in der Gewebekonstruktion von Knorpelgewebe verzeichnet werden, da es aus einer einzelnen Zellart besteht und das Fasergerüst selbst bildet ^[64]. Es wird also auch in Zukunft höchstwahrscheinlich große Fortschritte in diesem Forschungsbereich geben.

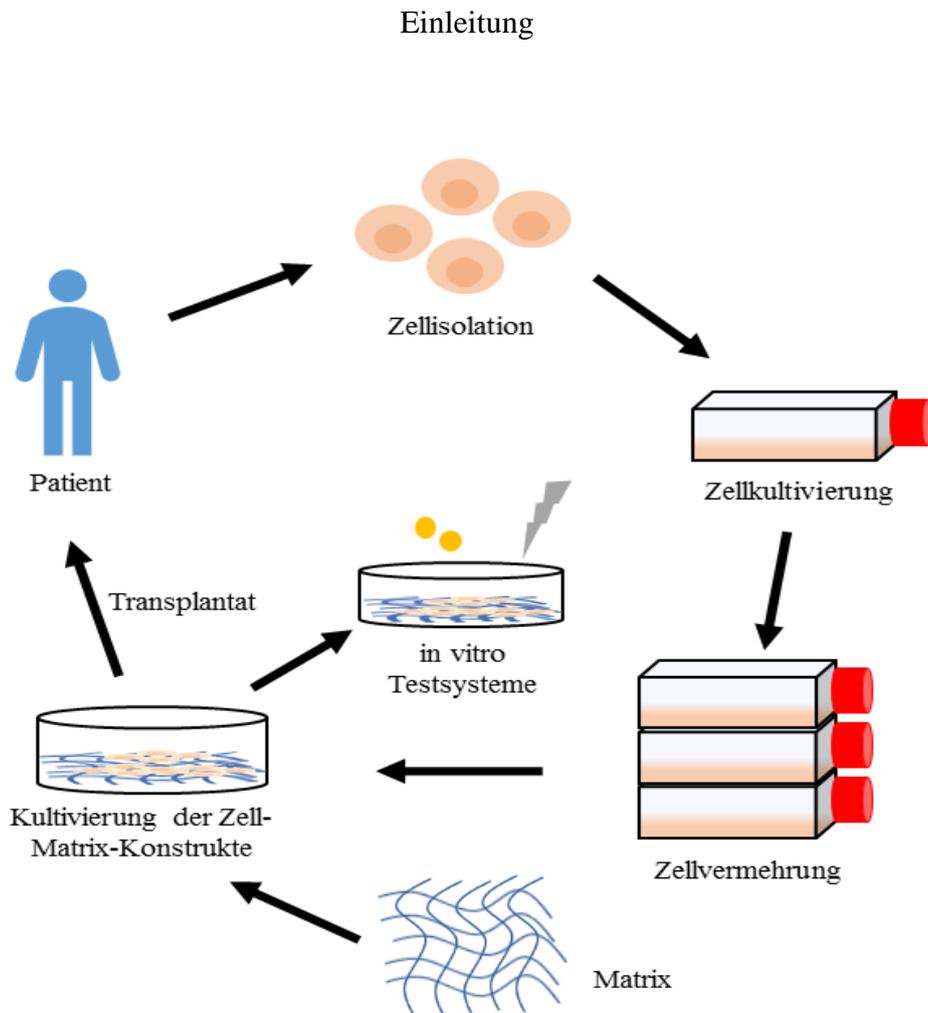


Abbildung 3 ^[65]: **Schematische Darstellung des Prinzips des Tissue Engineerings.**

1.2.2 Tissue Engineering der Mundschleimhaut

In der Zahnmedizin und Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie stehen Zahnärzte und Chirurgen oft vor dem Problem, Operationsgebiete anschließend wieder ausreichend zu decken, da in der Mundhöhle das Angebot an oraler Schleimhaut stark begrenzt ist. In der Parodontalchirurgie werden beispielhaft zur Rezessionsdeckung Schleimhauttransplantate vom Gaumen entnommen und an der Gingiva retransplantiert, um dort ein größeres Angebot an mastikatorischer Schleimhaut aufzuweisen ^[66]. Dennoch besteht die Gefahr der Transplantatkontraktion. Die Entnahmestelle ist ebenfalls anatomisch begrenzt und schließt eine mehrwöchige Heilungsphase mit Verbandsplatte und mehrmaliger Wundversorgung mit ein. Ohne die Compliance des Patienten ist diese Art der Transplantation fraglich ^[4]. Auch die Chirurgen sehen sich oftmals mit der Herausforderung konfrontiert, am Patienten eine geeignete Entnahmestelle für ein autogenes Transplantat zu finden. Besonders nach großen Tumorresektionen oder

Einleitung

Traumadefekten wird ungern auf ein xenogenes, allogenes oder synthetisches Transplantat zurückgegriffen, um eine mögliche Infektion oder Abstoßungsreaktion zu vermeiden. Aus diesen Gründen ist das Tissue Engineering der Mundschleimhaut ein zentraler Punkt in der Forschung ^[67].

Für die Entwicklung und Kultivierung eines dreidimensionalen *in vitro* Modells, welches die *in vivo* Situation einer Mundschleimhaut nachbildet, werden drei Bestandteile benötigt: die Spenderzellen, eine Zellträgermatrix und ein Nährmedium.

Die **Spenderzellen** stellen also eine zentrale Rolle in der Modellentwicklung dar. Diese werden dem Patienten atraumatisch entnommen, wobei aus der Mundhöhle ein kleines Biopsat ausreichend ist. Die Keratinozyten und Fibroblasten, die für den Aufbau eines oralen Mukosaäquivalents (OMÄ) benötigt werden, werden mit Hilfe entsprechender Protokolle aus dem Biopsat isoliert und anschließend kultiviert. Takeda *et al.* haben 1992 herausgefunden, dass die primären oralen Fibroblasten für den Modellaufbau in einer möglichst frühen Passage herangezogen werden sollten, da weniger Extrazellulärmatrix gebildet wird, je höher die Passage der Zellen ist ^[68]. Auch die Keratinozyten sollten in einer frühen Passage verwendet werden, aber immortalisierte Keratinozyten, also solche, die sich in einer Zellkultur beliebig oft teilen können, ermöglichen die Verwendung auch in höheren Passagen ^[69, 70]. Die Keratinozyten können also für den Aufbau von individuellen Mundschleimhautmodellen primäre kultivierte Spenderzellen sein, oder aus einer etablierten Zelllinie stammen. Geläufige Zelllinien sind die TR146 und die OKF6/TERT-2. Die Zelllinie TR146 wird von SkinEthic™ beim Aufbau von Mundschleimhautmodellen verwendet. Die primären Zellen wurden aus einer Lymphknotenmetastase einer an einem oralen Plattenepithelkarzinom erkrankten Patientin entnommen und als Zelllinie in der Datenbank etabliert. Das erschaffene *in vitro* Mundschleimhautmodell weist ein parakeratinisiertes Plattenepithel auf ^[4, 71]. Da die vermeintlich physiologischen Keratinozyten mit einem Tumor assoziiert sind, kann man dyskeratotische Veränderungen in dem Modell nicht ausschließen. Im Gegensatz dazu wurde die Zelllinie OKF6/TERT-2 durch gesunde orale Keratinozyten aufgebaut, die aus einem Biopsat des Mundbodens isoliert wurden und dadurch keine pathologischen Veränderungen aufweisen ^[72].

Das **Zellkulturnährmedium** unterscheidet sich oft in den Publikationen und diversen Lehrstühlen. Essentiell für ein Medium sind spezielle Wachstumsfaktoren, wie FCS, EGF

Einleitung

und KGF, sowie Fungizone, Streptomycin und Penicillin, um eine Kontamination zu verhindern.

Um für den Modellaufbau ein Gerüst zu schaffen, wurden bislang verschiedenste **Zellträgermatrizes** verwendet. *In vivo* bilden die Zellen selbst die Trägerstruktur aus Sacchariden, Proteinen und weiteren Biomolekülen. *In vitro* muss der Ersatz die gleichen biomechanischen Eigenschaften aufweisen wie die Extrazellulärmatrix. Hier ist zum einen die mechanische Festigkeit ein wichtiges Kriterium um Belastungen wie Kaukräfte und Nahrungskontakte abzupuffern. Auf der anderen Seite ist es essentiell, dass das Gerüst weiterhin eine Kommunikation zwischen den Zellen zulässt. Nur so kann ein Zellverhalten garantiert werden, wie es *in vivo* vorkommt. Des Weiteren sollte eine Barriere gegen chemische und toxische Bestandteile vorhanden sein, aber auch eine gewisse Porosität, um den Wasserhaushalt des Gewebes aufrecht zu erhalten und Medikamentenwirkstoffen die Diffusion zu ermöglichen ^[4].

Es gibt eine Vielzahl an Publikationen, die unterschiedliche Trägermatrizes, auch Scaffolds genannt, in ihren Versuchen heranziehen. Als natürliche Matrix wurden von Izumi *et al.* eine allogene azellularisierte Dermis verwendet. Diese aufbereitete Leichenhaut, die den Handelsnamen AlloDerm™ hat, besitzt eine Seite für die Epithelzellen und eine andere für die Fibroblasteninfiltration ^[73]. Die deepidermialisierte Dermis (DED) hat histologisch und immunhistochemisch eine große Ähnlichkeit mit der oralen Schleimhaut *in vivo* ^[74]. Durch ihre gute Haltbarkeit, ihrer geringen Abstoßungsgefahr und der Formstabilität wird die DED oft benutzt ^[75]. Ein Nachteil ist jedoch die sehr geringe Fibroblasteninfiltration ^[4]. Weitere Matrizes, die zu den fibroblastenbesetzten Gewebeersatzmaterialien gehören, sind Dermagraft™ von Advanced Tissue Sciences Inc. und Apligraf™ von Organogenesis. Während Ersteres vitale humane Fibroblasten in einer Polylactidmatrix beinhaltet, besteht Apligraf™ aus einer Kollagenmatrix mit allogenen neonatalen Fibroblasten und einer Art Stratum corneum mit allogenen Keratinozyten ^[76, 77]. Weitere Hautersatzmaterialien, in denen Fibroblasten proliferieren und extrazelluläre Matrix ausbilden, sind Orcel™, Polyactive™ und Hyalograf™.

Die kollagenbasierten Scaffolds wurden erstmals 1996 von Masuda *et al.* beschrieben, die eine Kokultivierung von primären gingivalen Keratinozyten auf eine mit Fibroblasten benetzte kontrahierte Rinderhaut mit Kollagengel heranzogen. Diese Modelle mit

Einleitung

xenogener Matrix waren histologisch mit der oralen Schleimhaut *in vivo* sehr ähnlich ^[78]. Einen Schritt weiter ging Moriyama im Jahr 2001, der diese Methode mit einer Kollagentyp I Schwammatrix mit kontrahierter Rinderhaut und Kollagengel weiterführte. Das Kollagengel unterstützte die Fibroblastenproliferation und die Ausbildung eines Multilayers mit Keratinozyten ^[79]. Die beschriebenen Scaffolds mit purem Kollagen sind zwar sehr biokompatibel, weisen aber eine geringe Stabilität auf. Aus diesem Grund wurden die zusammengesetzten Kollagenmatrizes erforscht: die Kollagen-Chitosan-Membran (Ma *et al.* 2003), die Kollagen-Elastin-Membran (Hafemann *et al.* 1999), die Kollagen-Glucosaminoglycan-C-GAG-Matrix (Ojeh *et al.* 1999) und die Kollagen-GAG-Chitosan-Membran (Vaissiere *et al.* 2000). Die Ähnlichkeit von Chitosan mit Cellulose und Chitin, dem Polysaccharid von Krabbenskeletten, ermöglicht den Aufbau eines sehr stabilen Gerüsts ^[4]. Glucosaminoglykane sind Bestandteile der *in vivo* Extrazellulärmatrix, die man erfolgreich aus Rindertrachea oder Rinderknorpel isolieren kann. Sie sind hydrophil und formen dadurch Wassergele, in denen sich Fibroblasten gut kultivieren können ^[80].

Weitere Scaffolds sind die auf Gelatine basierenden Matrizes: die Gelatin-Glucane-Membran (Lee *et al.* 2003), die Gelatin-Hyaluronsäure-Membran (Choi 1999) und die Gelatin-Chitosan-Hyaluronsäure-Membran (Mao *et al.* 2003). Glucane sind dabei antibakteriell, antiviral und antikoagulierend, während Hyaluron für bessere biologische und mechanische Eigenschaften sorgt ^[4].

Das Protein Fibrin, welches *in vivo* vor allem bei der Blutgerinnung ein zentraler Faktor ist, wurde ebenfalls für neue Trägermatrizes im Tissue Engineering herangezogen. So benutzt die BioTissues Technologies GmbH in ihren verschiedenen Bioseed™ Ersatzmaterialien eine Fibrinklebermatrix mit autologen humanen Keratinozyten mit ausreichender Stabilität, guter Reproduzierbarkeit und geringen Kosten ^[81].

Alle natürlichen Materialien haben jedoch einen großen Nachteil. Dadurch, dass sie aus menschlichen und tierischen Geweben aufgebaut sind, sind diese nur begrenzt verfügbar und weisen Spendervariabilitäten auf.

SkinEthic™ und MatTek Modelle verwenden synthetische Membranen. Diese Membranen sind meist aus dem Co-polymer Poly-(ethylenglycolterephthalat)-Poly-(butylterephthalat), kurz PEGT/BGT. Weitere Membranen, die für das Tissue Engineering der Mundschleimhaut verwendet werden können sind aus Polyglycolsäure

oder Polylactatsäure. Vorteile der synthetischen Zellträger sind die guten mechanischen Eigenschaften, die geringe Infektionsgefahr am Zielort und die unbegrenzte Verfügbarkeit ^[4].

1.2.2.1 Klinische Anwendung der *in vitro* Mundschleimhaut

Vor allem durch die geringe Verfügbarkeit von autogenen Schleimhaut- oder Bindegewebestransplantaten in der Mundhöhle im Zusammenhang mit einer operativen traumatischen Entnahme und anschließender wochenlangender Wundheilung wurde die klinische Anwendung von *in vitro* hergestellter apathogener Mundschleimhaut in den Vordergrund gerückt. Solche Transplantate kommen beispielsweise in der Präprothetik zum Einsatz, wenn durch tief inserierende Lippen- und Wangenbänder das Vestibulum für eine ausreichende Kunststoffausdehnung der Prothesenbasis anatomisch zu flach gestaltet ist oder wenn im Rahmen einer Implantatsetzung die vorhandene keratinisierte Gingiva zu gering und somit ein vollständiges Einheilen des Implantates nicht möglich ist. Des Weiteren werden Mundschleimhauttransplantate für Rezessionsdeckungen in der Parodontalchirurgie, zur Deckung einer Alveole nach erfolgreicher Extraktion, nach traumatischen Defekten oder nach Resektionen von präkanzeröser oder kanzeröser Mundschleimhaut verwendet ^[66, 82, 83].

Der Versuch, das Gewebe in der Mundhöhle durch Ersatzmaterialien so zu steuern, dass der gewünschte Effekt einer Gewebsregeneration eintritt, wird Guided Tissue Regeneration (GTR) genannt. Das ausschlaggebende Ziel ist es vor allem durch kollagene Materialien eine Barriere zu schaffen, sodass die Migration der schneller proliferierenden oralen Epithelzellen für eine gewisse Zeit gestoppt wird und sich langsamer teilende Osteoblasten erfolgreich in einer Extraktionsalveole ansammeln und für eine knöcherne Regeneration sorgen können ^[84]. Diese künstlich aufgebaute Barriere sorgt somit für eine selektive zelluläre Repopulation, sodass die ersten Zellen, die in den Defekt migrieren, den Attachment Typen beeinflussen können ^[85]. Heutzutage sind diese Materialien sogar resorbierbar, sodass ein zweiter Eingriff zur Entfernung entfällt ^[86]. Ein solches Material ist beispielsweise Bio-Gide[®] ^[87].

Izumi *et al.* schauten sich 2003 die Patientengruppe an, die aufgrund einer pathologischen Schleimhautveränderung eine Deckung mithilfe *in vitro* Transplantaten benötigten. Dabei versorgten sie die Hälfte aller Patienten, die an der Studie teilnahmen, mit der allogenen

azellularisierten Dermis AlloDerm™. In der zweiten Gruppe wurde dieses Ersatzmaterial mit zusätzlichen autologen primären oralen Keratinozyten herangezogen. In der zuletzt genannten Gruppe war mit Abstand eine bessere entzündungsfreie Wundheilung mit deutlicher Vaskularisierung erkennbar [88].

Luitaud *et al.* legten 2007 in ihrer Studie den Fokus auf die Deckung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten mit Hilfe von *in vitro* hergestellten Mundschleimhautmodellen mit Orthokeratinisierung, die der Epithelmorphologie eines physiologischen Gaumens entsprechen. Dabei kultivierten sie primäre Fibroblasten und Keratinozyten auf CollaTape®, einem Rinderkollagen. Das Ergebnis war ein *in vitro* Modell, welches große Ähnlichkeit mit dem humanen weichen Gaumen aufwies. Die Autoren kamen zu dem Entschluss, dass sich CollaTape® aufgrund der hohen Flexibilität und der starken Zelladhäsion als geeignetes Material im klinischen Gebrauch beweisen würde [89].

1.2.2.2 *In vitro* Testsysteme zur Testung von Medikamenten und Materialien, sowie zur Erforschung von Krankheiten

Ein wichtiges Kriterium für *in vitro* Tests ist die Reproduzierbarkeit eines Mundschleimhautmodells um signifikante Ergebnisse aufzuzeichnen. Damit ist es möglich, die Anzahl an Tierversuchen zu verringern und Systeme zu entwickeln, um neuartige Medikamente oder andere Substanzen *in vitro* zu testen, die im Alltag mit der humanen Mundschleimhaut in Kontakt treten können. So gibt es beispielsweise Publikationen über die Testung von diversen Mundhygieneartikeln (Moharamzadeh *et al.* [90]), zahnärztlichen Werkstoffen wie Amalgam, Komposite und Kunststoffe (Schmalz *et al.* [70], Trombetta *et al.* [91]), Bondingadhäsiven und kieferorthopädischen Drähten (Vannet *et al.* [92, 93]).

1.2.3 Tissue Engineering von pathologischen Mundschleimhautmodellen einschließlich des Plattenepithelkarzinoms

Nachdem sich die physiologischen *in vitro* Mundschleimhautmodelle in den letzten Jahren etabliert und in verschiedenen Tests bewiesen haben, wurden auch pathologische Mundschleimhautmodelle entwickelt. In Studien wurde deutlich, dass das Tumorwachstum in den dreidimensionalen Modellen wesentlich erfolgreicher ist als in Monolayern [94]. Das Erforschen der Karzinogenese des oralen Plattenepithelkarzinoms auf molekularer Ebene oder die Modellherstellung von pathologischer und präkanzeröser

Einleitung

oralen Schleimhaut waren die Gründe für den nächsten Schritt im Bereich Tissue Engineering. So haben Gursoy *et al.* die Auswirkung von gram-negativen Bakterien wie Porphyromonas gingivalis und Fusobacterium nucleatum auf aopathologische *in vitro* Mundschleimhautmodelle getestet und ausgewertet. Die Kriterien waren das Ausmaß der Bakterieninvasion und der Grad der Gewebeerstörung ^[95]. Auch Andrian *et al.* haben mit Hilfe von gingivitisassoziierten Keimen wie Porphyromonas gingivalis aus gesunden Mundschleimhautmodellen entzündete *in vitro* Schleimhaut hergestellt, um anschließend neue Therapieansätze zu testen. Des Weiteren haben sie durch Besiedlung der gesunden Modelle mit Candida albicans eine Candidiasis *in vitro* etabliert ^[96]. In einer weiteren Studie wurden Mundschleimhautmodelle wie bei einer Radiotherapie nach Tumordiagnose bestrahlt und im Anschluss mit bestimmten Salben und Gelen versorgt um die oberflächlichen strahleninduzierten Verbrennungen zu beheben ^[97].

Neben den oben genannten Gingivitis-, Candidiasis- und Radiatiomodellen sind auch Tumormodelle etabliert worden, die das orale Plattenepithelkarzinom *in vitro* nachahmen. Colley *et al.* haben Mundschleimhautmodelle etabliert, die sowohl eine orale Dysplasie als Präkanzerose des Plattenepithelkarzinoms als auch ein invasives Karzinom nachbilden ^[98]. Dafür zogen sie Tumorzellen aus etablierten Zelllinien heran. Zum einen wurden Tumorzellen aus der Zelllinie Cal27 von der American Tissue Culture Collection, die aus einem Plattenepithelkarzinom der Zunge eines 56-jährigen Kaukasiers isoliert wurden, verwendet. Zum anderen wurden die FaDu-Tumorzellen der LGC Promochem hinzugezogen, die primär aus einem hypopharyngealen Plattenepithelkarzinom stammen ^[99]. Außerdem wurden die beiden dysplastischen Keratinozytenzelllinien DOK aus einer milden pathologischen Zungenschleimhautveränderung im hinteren Zungendrittel eines 57-jährigen Mannes und D20 aus einer schweren lateralen Zungendysplasie verwendet ^[100, 101]. Die Dysplasiezelllinien weisen einige Vorteile wie Reproduzierbarkeit, Standardisierung und eine Unabhängigkeit von der Lokalisation der Dysplasie und dem Patientenalter auf. Colley baute alle Modelle mit der kommerziell erhältlichen Trägermatrix DED auf, da sich diese in langen Kultivierungsphasen positiv behauptet haben. Abhängig vom gewünschten Grad der Dysplasie wurden die verschiedenen Modelle unterschiedlich lang kultiviert. So entstanden neue dreidimensionale *in vitro* Modelle, die von einer oralen Dysplasie über ein Carcinoma in situ bis hin zu einem invasiven oralen Plattenepithelkarzinom alle Stadien darstellten und

Einleitung

sich in diversen Tests bewiesen ^[98].

Gaballah *et al.* haben sich 2008 ebenfalls den dysplastischen *in vitro* Mundschleimhautmodellen gewidmet, indem sie die milde Keratinozyten-dysplasiezelllinie DOK, die moderate Dysplasiezelllinie POE9n und die schwere Dysplasiezelllinie D20 aus der Zelldatenbank heranzogen. Die Zellen wurden auf einer Matrix aus dem Kollagentyp I aufgebaut. Es wurde ein Dysplasieindex etabliert, der mit Hilfe verschiedener Kriterien wie Architektur und Zytologie einen Vergleich zwischen *in vitro* Modellen und *in vivo* Läsionen ermöglichte ^[102].

Costea *et al.* haben sich die morphologischen und charakteristischen Unterschiede von dreidimensionalen Modellen angeschaut, die sowohl auf einer Kollagentyp-I-Matrix mit Fibroblasten als auch auf einer fibroblastenfreien Matrix aufgebaut wurden. Das Ergebnis waren signifikante Unterschiede in der Morphologie. Die tieferliegenden Fibroblasten scheinen die Proliferation der oberflächlicheren Keratinozyten und der Tumorzellen zu verstärken ^[103].

Auf die Rolle der oralen Fibroblasten der *in vitro* Modelle gingen auch Nyström *et al.* 2005 in ihrer Studie genauer ein und untersuchten mehrere Tumormodelle, ebenfalls auf einer Kollagentyp-I-Matrix, mit einer unterschiedlichen Anzahl an zuvor ausgesäten Fibroblasten. Zur Auswertung etablierten sie ein Bildanalyseprogramm, welches die Morphologie und die Tumorzellinvasion charakterisierte ^[104].

Fischbach *et al.* untersuchten 2007 die Unterschiede zwischen zweidimensionalen und dreidimensionalen Modellen, indem sie Modelle mit der Zelllinie OSCC-3, die aus einem Plattenepithelkarzinom an der Zunge etabliert wurde, auf einer hochporösen synthetischen Polylactidmatrix aufbauten und anschließend mit Modellen aus anderen extraoralen Zelllinien (LCC, MCF-7 und U87) verglichen. In allen Modellen wurde eine ähnlich starke Angiogenese wie in *in vivo* Biopsaten festgestellt. Außerdem wurde ein neuartiges Medikament, LY294002, an den Modellen getestet, welches die Angiogenese inhibieren soll. Es zeigte sich eine deutlich herabgesetzte Wirkung an den dreidimensionalen Modellen, wobei die zweidimensionalen Modelle sehr sensitiv gegenüber diesem Wirkstoff waren ^[94].

Aus den vorangegangenen Publikationen wird somit die Evidenz der Erforschung von *in vitro* Tumormodellen deutlich. Es ist wichtig, die Entstehung von oralen Präkanzerosen und Plattenepithelkarzinomen auf molekularer Ebene nachzubilden und

nachzuvollziehen. Aus diesen Informationen können die dreidimensionalen Modelle wiederum für Testungen von neuen Wirkstoffen aus der Pharmakologie herangezogen werden, deren Ziel letztendlich der direkte Einsatz am Menschen ist.

1.3 Ziel der Arbeit

Bisherige Ergebnisse der histologischen Auswertung von diversen *in vitro* Modellen des oralen Plattenepithelkarzinoms zeigen im Vergleich unverkennbar unterschiedliche Morphologien.

Das Ziel der Arbeit ist es deshalb, reproduzierbare Strategien für die Generierung von organotypischen *in vitro* Modellen des oralen Plattenepithelkarzinoms zu etablieren. Die Modelle sollen dabei sowohl tumoröses Gewebe als auch apathogenes orales Gewebe umfassen, wobei eine dezellularisierte, porcine Dünndarmmukosa (SISmuc) als Trägermatrix für die Modelle genutzt werden soll.

Als Zellquelle für den tumorösen Anteil sollen dabei sowohl etablierte Zelllinien als auch primäre Plattenepithelkarzinomzellen verwendet werden. Dazu sollen in einem ersten Schritt Plattenepithelkarzinommodelle mit den Tumorzelllinien FaDu, HLaC79 und dessen paclitaxelresistenten Klon HLaC79 Clone 1 generiert werden. Die Verwendung von verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlichem Dysplasiegrad, ehemaligem Patientenalter und primärem Lokalisationsort soll dabei eine Stratifizierung zwischen verschiedenen Patientengruppen simulieren. Dabei soll das richtige Konzentrationsverhältnis zwischen gesunden Keratinozyten und Tumorzellen getestet werden, welches ein *in vitro* Plattenepithelkarzinom entstehen lässt. Die Morphologie und der Malignitätsgrad sollen denen eines *in vivo* Plattenepithelkarzinoms gleichen, um die Karzinogenese weiter zu erforschen und neue Medikamente zu testen. Des Weiteren sollen aus diesem Grund im Anschluss zwei Tumorthapeutika - Paclitaxel und Salinomycin - zur Behandlung des Plattenepithelkarzinoms getestet werden. Paclitaxel ist ein weit verbreitetes und lang etabliertes Zytostatikum, welches in Kombination mit anderen Zytostatika zur Behandlung des oralen Plattenepithelkarzinoms eingesetzt wird. Da es ein Spindelgift ist, unterdrückt es die Tumorzellproliferation. Salinomycin dagegen ist ein Polyether-Antibiotikum, welches für eine Entgleisung des Elektrolythaushaltes in den Zellen sorgt und somit eine Apoptose von Zellen induziert. Salinomycin wird bis *dato* nicht in der Tumorthherapie eingesetzt, zeigte jedoch vielversprechende Ergebnisse

Einleitung

in diversen Voruntersuchungen ^[105-107]. Beide Medikamente sollen sowohl in zweidimensionalen Zellkulturbedingungen als auch Paclitaxel bei den dreidimensionalen Tumormodellen evaluiert werden. Die Hypothese ist dabei, dass in den organotypischen Modellen eine sehr viel genauere Nachbildung der klinischen Situation möglich ist und dass die verschiedenen Zelllinien unterschiedlich auf die zwei Medikamente reagieren. Anschließend sollen als Vorbereitung für eine spätere patientenspezifische Herstellung von Tumormodellen geeignete Methoden zur Isolation und Kultivierung von primären Tumorzellen aus oralen Plattenepithelkarzinomen etabliert werden. Effektivität und Zuverlässigkeit haben dabei höchste Priorität, damit diese Tumormodelle ebenfalls für Testungen von neuartigen Therapien und Medikamenten herangezogen werden können.

2 Material

2.1 Gewebe und Zellen

2.1.1 Biopsate

Die Biopsate wurden freundlicherweise von Chirurgen der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie und der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Würzburg während einer geplanten Operation entnommen. Dabei stammten die Biopsate mit gesunder Mundschleimhaut aus der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie, die im Rahmen von Frakturversorgungen, Entfernung von Osteosyntheseplatten, bimaxillären Umstellungsosteotomien und chirurgischen Zahnsanierungen aus den Bereichen des harten Gaumens, der mastikatorischen Schleimhaut und der auskleidenden Schleimhaut entfernt wurden. In der Hals-Nasen-Ohrenklinik wurde zum einen gesunde Mundschleimhaut und zum anderen Tumorgewebe von Plattenepithelkarzinomen entnommen, die in der Mundhöhle, im Pharynx oder im Larynx lokalisiert waren. Die Schleimhaut des oberen Larynx ist auch wie die des Pharynx ein mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel. Die Biopsate wurden den Spendern zwischen August 2017 und Februar 2018 entnommen. Das Patientenalter lag zwischen 16 und 78 Jahren. Die Größe dieser Biopsate betrug ca. 5 x 5 mm. Alle Biopsate wurden in Intubationsnarkose entnommen. Einen Tag präoperativ wurden die Patienten mündlich und schriftlich aufgeklärt (gemäß Ethikvotum 182/10 vom 4. April 2011).

2.1.2 SISmuc als Zellmatrix

Als Zellträger für die Modellversuche diente SISmuc (Small Intestinal Submucosa), ein dezellularisiertes submuköses Gewebe, welches aus porcinem Dünndarm gewonnen wurde. Bei der Herstellung wurde die Serosa an der Außenseite entfernt, sodass die Submukosa und die Mukosa luminal überblieben. Die luminale Seite eignet sich durch ihre makroskopische und mikroskopische Struktur für dreidimensionale Mundschleimhautmodelle, da ihre Morphologie weitestgehend der der humanen Mundschleimhaut gleicht.

2.1.3 Tumorzelllinien FaDu, HLaC79 und HLaC79 Clone 1

Die Tumorzellen FaDu, HLaC79 und HLaC79 Clone 1, die für die *in vitro* Herstellung der oralen Plattenepithelkarzinome dienen, entstammten aus zwei verschiedenen Tumorzelllinien. Beide wurden bereits in der Vergangenheit im Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin Würzburg für Versuche herangezogen. Die Tumorzelllinie FaDu wurde mit Hilfe eines Plattenepithelkarzinoms des Hypopharynx eines indischen Patienten etabliert und besitzt eine Population Doubling Time (PDT) von 50 Stunden. Im Gegensatz dazu stammt die Tumorzelllinie HLaC79 aus einer Metastase eines zervikalen Lymphknotens, die aufgrund eines unbehandelten Larynxkarzinoms entstand. Die Zelllinie HLaC79 Clone 1 wurde an der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten der Universität Würzburg etabliert und weist im Vergleich zu den HLaC79 Tumorzellen eine Resistenz gegenüber dem Chemotherapeutikum Paclitaxel auf.

2.2 Geräte

Tabelle 3: Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Absaugpumpe	Vacuum System BVC 21 NT	Vacuubrand GmbH & Co KG (Wertheim, D)
Abzug		Prutscher Laboratory Systems (Neudörfel, A)
Autoklav	Technoclav	Biomedis (Gießen, D)
Cedex Bio	HT Analyzer	Hoffmann-La Roche (Basel, CH)
Cytozentrifuge	Cytospin 4	Thermo Scientific (Dreieich, D)
Dampfkocher	MultiGourmet	Braun (Kronberg, D)
Einfrühbehälter	CoolCell ® LX	Biocision
Flockeneisbetreiber	AF-80	Scotsman (Illinois, USA)

Material

Gerät	Modell	Hersteller
Gefrierschrank - 80 °C	HFU586 Basic	Heraeus (Hanau, D)
Gefrierschrank - 20 °C	G 5216	Liebherr (Biberach, D)
Gewebeeinbettautomat	Microm STP120	Thermo Scientific (Dreieich, D)
Handstückzähler	IVO T120	Baumer (Friedberg, D)
Impedanzmesssystem	3522-50 LCR HiTester	Hioki (Nagano, J)
Impedanzspektroskopie + 24-well-TiN-Messplatte	3522-50 LCR HiTester	Hioki E.E. Corporation (Koizumi Ueda, Japan)
Inkubator	BBD 6220 CO ₂ -Inkubator	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
Kassettendrucker	VCP 5001	Vogel (Fernwald, D)
Kühlplatte	EG 1150R	Leica (Nussloch, D)
Kühlraum 4 °C		Genheimer (Höchberg, D)
Kühlschrank 4 °C	LABEX-340	Kirsch (Willstätt-Sand, D)
Lichtmikroskop	EVOS FL Imaging System	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
Lichtmikroskop mit Objektiven (A-Plan, 5x, 10x, 20x)	Axiovert 40 C	Zeiss
Mikroskop	Biorevo BZ-9000	Keyence (Neu-Isenburg, D)
Mikrotom	SM 2010R	Leica (Nussloch, D)
Mikrotomklinge	Microtome Blades S35	Feather
Mikrowaage	MSE3.6P-000-DM	Sartorius Weighing Technology GmbH (Göttingen, D)
Modulares Einbettssystem (Kühlplatte + Paraffinausgießstation)	EG 1150H	Leica (Nussloch, D)
Objektträgerdrucker	VSP 5001	Vogel (Fernwald, D)

Material

Gerät	Modell	Hersteller
Objektträger- Schnelltrockner	TDO 66	Medite GmbH (Burgdorf, D)
Paraffinstreckbad	1052	GFL (Burgwedel, D)
Pipetten	Eppendorf Research [®] Plus 0,5-10 µl, 10-100 µl, 100-1000µl	Eppendorf (Wesseling- Berzorf, D)
Pipettierhilfe	Accu-Jet [®] pro	Brand (Wertheim, D)
Präzisionsheizplatte 37 °C	Präzitherm PZ	Harry Gestigkeit GmbH
Spark[®] Multimode Microplate Reader		Tecan Group (Männedorf, CH)
Stickstofftank	MVE 815 P-190	German-Cryo (Jüchen, D)
Tischzentrifuge	Heraeus Multifuge X1R	Thermo Scientific (Dreieich, D)
Vortex	Genie 2	Scientific Industries (New York, USA)
Wasserbad	WNB7 , 7 Liter	Memmert (Schwabach, D)
Werkbank	Safe 2020	Thermo Scientific (Massachusetts, USA)
Zählkammer	Neubauer Improved Profondeur 0,100 mm Tiefe; 0,0025 mm ²	Hartenstein (Würzburg, D)

2.3 Labormaterialien

Tabelle 4: Labormaterialien

Labormaterial	Hersteller
Bechergläser	Schott (Mainz, D)
Fettstift	Dako (Hamburg)
Glasküvetten / Färbetröge	Mercateo (München, D)
Kälteschutzhandschuhe	VWR (Darmstadt, D)
Kunststoffbechergläser	Brand (Wertheim, D)
Kunststoff-Zellkronen	Minucells and Minutissue Vetriebs GmbH (Bad Abbach, D)
Messzylinder	Hirschmann (Eberstadt, D)
Mikrochirurgische Pinzetten	S&T JF-5 TC und S&T JFA-5b TC von Fine Science Tools FST (Heidelberg, D)
Objektträgerhalter	Mercateo (München, D)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim, D)
Pinzetten	Modell 11018-12 von Fine Science Tools FST (Heidelberg, D)
Schutzbrille	
Skalpellhalter	Bayha (Tuttlingen, D)

2.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Abfallbeutel	Hartenstein (Würzburg, D)
Cryo Freezing Tubes	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Deckgläser (24 x 60 mm)	Menzel-Gläser (Braunschweig, D)
Einbettkassetten	Hartenstein (Würzburg, D)
Einwegpipetten CellStar	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	
Eppendorf Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, D)
Gewebeschaum / Biopsy Pad	VWR International GmbH (Darmstadt, D)
Kryoröhrchen 1,8 ml	Nunc (Wiesbaden, D)
Lab-Tek®	Nunc (Rochester, USA)
Chamber Slide™	
4 well Glass Slide	
Nitrilhandschuhe	Paul Hartmann AG (Heidenheim, D)
Objektträger	Polysine Slides, Menzel-Gläser (Braunschweig, D) SuperFrost Plus, R.Langensbrinck (Emmendingen, D)
Parafilm® M	Bemis (Wisconsin, USA)
Pipettenspitzen	Eppendorf (Wesseling-Berzdorf, D)
(bis 1 µl, bis 100 µl, bis 200 µl, bis 1000 µl)	
Skalpellklingen steril	Nummer 12 von Bayha (Tuttlingen, D)

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Zellkulturflaschen	
25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ²	TPP 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	TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, CH)
Zellkulturschalen	
40 x 11 mm und 60 x 15 mm	TPP Techno Plastic Products AG (Trasadingen, CH)
Zentrifugenröhrchen / Falcon®	Greiner
15 ml, 50 ml	

2.5 Chemikalien und Lösungen

Tabelle 6: Chemikalien und Lösungen

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
Aceton	Sigma-Aldrich	650501
Antikörper-Verdünnungslösung	DCS Innovative Diagnostik-Systeme (Hamburg, D)	1.01047.1000
Ascorbyl-2-phosphat	Sigma-Aldrich	A8960
BSA (Bovine Serum Albumin)	Santa Cruz	Sc-500949
Calciumchlorid	VWR	1.02391.1000
Calciumchlorid-Dihydrat	Sigma-Aldrich	C7902-500G
Descosept	Dr. Schumacher	00311L-100
Dispase II	Life Technologies	17105041

Material

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
DMSO Dimethyl-sulfoxide for molecular biology	Sigma-Aldrich	D8418
DPBS⁻ (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)	Sigma-Aldrich	D8537-500ml
DPBS⁺ (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline with calcium chloride and magnesium chloride)	Sigma-Aldrich	D1283-500ML
Entellan	Merck	1.07961.0500
Ethanol 96 % vergällt	Carl Roth	T171.4
FCS (Fetal Calf Sera)	Bio&Sell	BS.FCS.ADD.0500 EVA
Fluoresceindiacetat	Sigma-Aldrich	F7378-5G
Gentamycin	PAA	P11-010
HKGS (Human Keratinocyte Growth Supplement)	ThermoFisher Scientific	S0015
Incidin Plus	Ecolab	3011520
Incidin Rapid	Ecolab	hn 3040230
Isopropanol	Carl-Roth	6752.1
KGF (Keratinocyte Growth Factor)	Sigma-Aldrich	K1757-10UG
Methanol	VWR	20.864.320
MTT	Th. Geyer GmbH & Co. KG	5 g
Natriumpyruvat 100 mM	Life Technologies	11360-039
NEAA (Non-Essential Amino Acid)	Life Technologies	11140035

Material

Substanz	Hersteller	Bestellnummer
Paraffin	Carl-Roth	6642.6
Penicillin / Streptomycin 10000 U / ml	Sigma-Aldrich	P4333-100ml Aliquot mit 5ml
Perimag[®]-Partikel (Oberfläche NH₂) mit 70 % Eisenoxid	Micromod Partikeltechnologie	102-01-132
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich	P4170-10MG
Rho Kinase Inhibitor Y27632 10mM		
Roti[®] Histofix 4 %	Carl-Roth	P087.5
StemPro Accutase	ThermoFisher Scientific	A1110501
Triton-X 100	Sigma-Aldrich	T8787-100ML
Trypanblau 0,4 %	ThermoFisher Scientific	15250061
Trypsin/EDTA 0,5 %	Life Technologies	15400-054
Tween-20	VWR	8.22184.0500
Wasserstoffperoxid 30 %	Carl Roth	8.070.2
Xylol	Carl Roth	9713.2

2.6 Medien für die Zellkultur

Tabelle 7: Medien für die Zellkultur

Medien	Zusammensetzung
Ascorbylphosphat-Lösung	Ascorbylphosphat in Epilife [®] Medium sterilfiltrieren Lagerung als 500 µl Aliquot bei -20 °C

Material

Medien	Zusammensetzung
Calciumchlorid-Lösung CaCl₂ Lösung 300 mM	44 mg/ml Calciumchlorid-Dihydrat in Reinstwasser sterilfiltrieren, Lagerung als 500 µl Aliquot
Dispase II (2 U/ml)	400 mg Dispasepulver in 100 ml DPBS ⁻ sterilfiltrieren Lagerung als 5 ml Aliquot bei -20 °C
DPBS⁻ / EDTA- Stammlösung	0,2 g/l EDTA-Dinatriumsalz-Dihydrat in DPBS ⁻ sterilfiltrieren, Lagerung als 500 µl Aliquot
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	500 ml DMEM + GlutaMAX™-I (Life Technologies, 61965-026) + 10 % FCS + 1 % Penicillin / Streptomycin
Epilife® Medium 1 (E1)	500 ml Epilife® Medium mit 60 µM Calciumchlorid (ThermoFisher Scientific, MEPI500CA) + 5 ml HKGS + 1 % Penicillin / Streptomycin
Epilife® Medium 2 (E2)	500 ml Epilife® Medium mit 60 µM Calciumchlorid (ThermoFisher Scientific, MEPI500CA) + 5 ml HKGS + 1 % Pencillin / Streptomycin + 2,4 ml 300 mM Calciumchlorid
Epilife® Medium 3 (E3)	500 ml Epilife® Medium mit 60 µM Calciumchlorid (ThermoFisher Scientific, MEPI500CA) + 5 ml HKGS + 2,4 ml 300 mM Calciumchlorid + 1 % Penicillin / Streptomycin

Medien	Zusammensetzung
RPMI Medium 1640	500 ml RPMI Medium 1640 (Life Technologies, 21875-034) + 10 % FCS +1 % NEAA + 1 % Natriumpyruvat +1 % Penicillin /Streptomycin
Stocklösung RPMI Medium 1640 mit Paclitaxel 10 µM	7026 µl RPMI Medium 1640 (Life Technologies, 21875-034) + 10 % FCS + 1 % NEAA + 1 % Natriumpyruvat + 1 % Penicillin /Streptomycin + 10 µl Paclitaxel (6 mg/ml)
Trypsin / EDTA-Lösung	1:10 10 % Trypsin / EDTA-Stammlösung 10x in DPBS ⁻

2.7 Lösungen für die Histologie

Tabelle 8: Lösungen für die Histologie

Lösung	Zusammensetzung
Eosin 1 % (Morphisto)	10 mg/ml Eosin in VE-Wasser
Hämatoxylin sauer nach Mayer (Morphisto)	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

Lösung	Zusammensetzung
Kaliumhexacyanoferrat (II) 5 % (Morphisto)	K ₄ [Fe(CN) ₆] • 3 H ₂ O 422,39 g/mol
Kernechtrot 0,1 % (Morphisto)	Wasser Aluminiumsulfat Kernechtrot
Salzsäure 5 % für Eisennachweisreaktion (Morphisto)	Wasser Salzsäure

2.8 Lösungen für die Immunhistologie

Tabelle 9: Primäre Antikörper

Antikörper	Spezies	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
CK 10	Maus	anti-human	1:100	DAKO Cytomation (Eching, D)
CK 14	Kaninchen	anti-human	1:2000	Sigma-Aldrich (München, D)
Ki67	Kaninchen	anti-human	1:100	abcam (Cambridge, GB)
Kollagen IV	Kaninchen	anti-human	1:500	abcam (Cambridge, GB)
p53	Maus	anti-human	1:50	DAKO Cytomation (Eching, D)
Vimentin	Maus	anti-human	1:2000	abcam (Cambridge, GB)

Tabelle 10: Puffer und Lösungen für die Immunhistologie

Lösung	Zusammensetzung
3 %ige Peroxidase-Blockierungslösung	1:10 Wasserstoffperoxid 30 % mit VE-Wasser verdünnt Lagerung bei Raumtemperatur
Blocklösung	1 g BSA + 50 ml DPBS ⁻ + 0,3 % Triton-X 100
Citratpuffer-Gebrauchslösung	1:10 Citratpuffer-Stammlösung mit VE-Wasser verdünnt Lagerung bei Raumtemperatur
DCS Super Vision 2 HRP-Polymer-Kit (DCS Innovative Diagnostik-Systeme; Hamburg, D)	DCS Polymer-Enhancer DCS HRP-Polymer-Reagenz DAB Chromogen (1 Tropfen DAB- Konzentrat je ml DAB-Puffer) Lagerung bei 4 °C
PBS⁻Waschpuffer mit 0,5 % Tween-20	1:10 DPBS ⁻ Stammlösung mit VE-Wasser verdünnt 0,5 % Tween-20 Lagerung bei Raumtemperatur

2.9 Medikamente

Tabelle 11: Medikamente

Medikamentenname	Bestellnummer und Hersteller
Salinomycin als Pulver, Lagerung bei 4 °C	S4526-5mg Sigma-Aldrich (Schnelldorf, D)
Paclitaxel (6 mg/ml) Infusionslösung-Konzentrat, Lagerung bei 4 °C	PZN 0399189-50ml Teva GmbH (Petach Tikwa, ISR)

2.10 Software

Tabelle 12: Software

Software	Verwendung	Hersteller
BZ-II Viewer und BZ-II Analyzer	Mikroskopierprogramme	Keyence (Neu-Isenburg, D)
Endnote	Literaturverwaltungsprogramm	Thomson Reuters (Philadelphia, USA)
Office Excel 2016	Tabellenkalkulationsprogramm	Microsoft (Unterschleißheim, D)
Office Power Point 2016	Präsentationsprogramm	Microsoft (Unterschleißheim, D)
Office Word 2016	Textverarbeitungsprogramm	Microsoft (Unterschleißheim, D)

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Isolation primärer Zellen

Die Biopsate wurden nach der Entnahme in Epilife® Medium mit Gentamicin oder Penicillin und Streptomycin transportiert, um das Risiko einer Kontamination zu minimieren. Noch am Entnahmetag wurden die Mundschleimhautproben aus dem Transportbehälter in eine sterile Petrischale überführt und dreimal mit 8 ml DPBS⁺ gewaschen. Überschüssiges Bindegewebe wurde mit einem scharfen Skalpell entfernt und das Biopsat in ca. 3 mm breite Stücke geschnitten. 5 ml Dispase-Lösung 2 U / ml wurden hinzugefügt und die mit Parafilm verschlossene Petrischale über Nacht für 16 bis 18 Stunden in einen Kühlschrank bei 4 °C gestellt.

Am nächsten Tag wurden zwei 6 cm² Petrischalen mit DPBS⁺ befüllt und 10 ml 0,05 %ige Trypsin/EDTA-Gebrauchslösung in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen im Wasserbad vorgewärmt. Mit zwei mikrochirurgischen Pinzetten wurde die Epidermis von der Lamina propria getrennt und beide jeweils in eine Petrischale überführt.

3.1.1.1 Isolation humaner Keratinozyten aus der Mundschleimhaut

Je nach Größe des Epidermisstückes wurde dieses noch einmal in ca. 3 mm x 3 mm große Stücke geschnitten, welche dann in die vorgewärmte Trypsinlösung gegeben wurden. Nach 5-minütigem Schwenken im Wasserbad wurde die enzymatische Reaktion mit 1 ml FCS abgestoppt und, um die Keratinozyten aus ihrem Zellverband zu lösen, für weitere 5 Minuten mit einer Einmalpipette kräftig auf-und-abpipettiert. Das Zentrifugenröhrchen wurde bei 300 g für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellett mit 1 ml Epilife® Medium E1 resuspendiert. In einer Zellkulturflasche mit einem Volumen von 25 cm² (T25) wurden 3 ml Epilife® Medium E1 vorgelegt und mit der Zellsuspension vermischt. Der Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 (ROCK-Inhibitor, 10 mM) wurde mit einer Konzentration von 1:1000 hinzugefügt. Die Zellkulturflasche wurde ab dem Zeitpunkt bei 37 C° inkubiert.

Nach 24 Stunden erfolgte der erste Mediumwechsel. Um das Wachstum der Zellen im weiteren Verlauf zu garantieren und zu fördern, musste an jedem zweiten Tag bei allen

Methoden

in Kultur gehaltenen Zellen ein Mediumwechsel durchgeführt werden. Dabei wurde das alte verbrauchte Medium jeweils mit einer Pasteurpipette abgesaugt und neues zellspezifisches Medium hinzugefügt. Dabei war zu beachten, dass die Pipette nicht den Boden der Zellkulturflaschen berührte, um adhärenzte Zellen nicht zu beschädigen.

Vor jedem Mediumwechsel wurden die Zellen unter einem Lichtmikroskop betrachtet, um das Wachstum einzustufen und ein rechtzeitiges Passagieren zu erkennen.

3.1.1.2 Isolation primärer Fibroblasten aus der Mundschleimhaut

Da von einem Spender neben den Keratinozyten auch Fibroblasten zum Modellaufbau benötigt wurden, musste die Lamina propria ebenfalls in kleinere Fragmente geschnitten und für 20 Minuten auf den Boden einer T25-Zellkulturflasche gesetzt werden damit sich diese adhären können. Im Anschluss wurden 2 ml DMEM dazugegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden weitere 2 ml DMEM hinzugefügt. Nach weiteren 24 Stunden erfolgte auch hier der erste Mediumwechsel. Nach einigen Tagen wurde ein konzentrisches Wachstum von Fibroblasten um die Lamina propria-Stücke beobachtet.

3.1.2 Passagieren von Zellen

Bei einer Konfluenz von 80 bis 90 % der Gesamtfläche eines Zellkulturflaschenbodens erfolgte das Passagieren der Zellen. Für den Aufbau der Mundschleimhautmodelle wurden Keratinozyten in Passage 3 und Fibroblasten zwischen Passage 2 und Passage 5 benötigt. Dabei war zu beachten, dass die verschiedenen Zellarten unterschiedliche Verfahren zur Ablösung und erneutem Aussäen durchliefen.

3.1.2.1 Passagieren der Keratinozyten

Das Medium wurde aus der Zellkulturflasche abgesaugt und mit 0,06 µl / cm² DPBS- (10,5 ml bei einer T175 Flasche) gespült. Für ein schonendes Ablösen der Keratinozyten wurden 0,04 µl / cm² Accutase (7 ml bei einer T175 Flasche) in die Zellkulturflasche überführt und für 20 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Zeit waren unter dem Lichtmikroskop die abgekugelten und gelösten Keratinozyten erkennbar, die sich frei in der Accutase bewegten. Um alle Zellen abzulösen, wurde die Zellkulturflasche vorsichtig gegen den Handballen geklopft. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml

Methoden

Zentrifugenröhrchen überführt und die Flasche nochmals mit DPBS⁻ gewaschen und ebenfalls in dasselbe Röhrchen pipettiert. Es wurde 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellett – je nach Größe – mit 3 bis 5 ml Epilife[®] Medium E1 resuspendiert. Mit Hilfe der Neubauer Zählkammer erfolgte die Zellzählung und die Zellen wurden anschließend in neue T175 Zellkulturflaschen ausgesät ($2-3 \times 10^3$ Keratinozyten / cm²).

3.1.2.2 Passagieren der Fibroblasten und der FaDu-, HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Tumorzellen

Bei dem Passagieren der Fibroblasten, sowie der FaDu-, HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Tumorzellen wurden anfangs die gleichen Arbeitsschritte wie bei dem Passagieren der Keratinozyten durchgeführt. So wurde das zellspezifische Medium abgesaugt und mit PBS⁻ gespült. Zum Ablösen der Zellen vom Zellkulturflaschenboden wurden 7 ml Trypsin (Trypsinverdünnung bestehend aus 10 % Trypsin/EDTA und 90 % DPBS⁻) dazugegeben und für 5 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml FCS, um die Reaktion des Trypsins zu hemmen. Die Zellsuspension wurde ebenfalls in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die nächsten Schritte entsprachen den gleichen Arbeitsvorgängen wie dem Passagieren der Keratinozyten (vgl. Kapitel 3.1.2.1). Die Aussaatdichte in neue T175 Zellkulturflaschen betrug allerdings 1×10^3 Zellen / cm².

3.1.2.3 Neubauer Zählkammer

Das Zählen der Zellen erfolgte mit der Neubauer Zählkammer und Trypanblau. Durch das Trypanblau werden alle avitalen Zellen blau gefärbt, da der Farbstoff durch die zerstörte Membran in das Zytoplasma dringen kann und es lässt alle vitalen Zellen mit einer intakten Membran ungefärbt. Je nach gewünschtem Verdünnungsfaktor wurde die Zellsuspension mit Trypanblau verdünnt und in eine Zählkammer überführt. Es wurden alle vitalen ungefärbten Zellen in allen vier Quadranten ausgezählt und man errechnete mit folgender Formel die absolute Zellzahl:

$$(Anzahl\ der\ Zellen / 4) \times Verdünnungsfaktor \times 10.000 \times Gesamtmilliliter$$

3.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Das Ablösen der Zellen erfolgte wie beim Passagieren der Zellen (vgl. Kapitel 3.1.2.1 und Kapitel 3.1.2.2). Je Kryoröhrchen wurden 1×10^6 Zellen eingefroren. Dazu wurde je eine Zellsuspension von 900 μl in ein Kryoröhrchen überführt und mit 100 μl DMSO versetzt, sodass sich ein Gesamtvolumen von 1 ml ergab. Die Zellsuspensionen der Fibroblasten und die der Tumorzellen wurden vor dem Einfrierprozess noch zusätzlich mit 10 % FCS versehen. Die Zugabe von DMSO sollte die Eiskristallbildung während des Einfrierens verhindern. Die Röhrchen wurden in den Einfrierbehälter gesetzt, der durch einen auf 37 °C vorgewärmten Metallring für ein langsames und konstantes Herabkühlen der Zellsuspension sorgte. Der Einfrierbehälter Mr. Frosty kam für einen Tag in den – 80 °C Gefrierschrank. Dabei war zu beachten, dass der Einfriervorgang zügig ablief, da das DMSO bei Raumtemperatur zelltoxisch wirkt. Nach Ablauf der 24 Stunden wurden die Kryoröhrchen in den Stickstofftank bei – 181 °C überführt.

3.1.4 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde bereits vorher zellspezifisches vorgewärmtes Medium in Zellkulturflaschen vorgelegt, damit die darin enthaltenen Proteine schon davor am Flaschenboden adhären konnten. Außerdem wurden 7 ml Medium in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

Das gewünschte Kryovial wurde aus dem Stickstofftank entnommen und in einer Styroporbox auf Eiswürfeln oder Trockeneis transportiert. 1 ml aus dem Zentrifugenröhrchen wurde auf die noch gefrorene Zellsuspension appliziert und mehrmals auf- und abpipettiert, damit die Zellen langsam auftauen konnten. Die entstandene Zellsuspension wurde wieder in das Zentrifugenröhrchen überführt und bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, um die Zellen von dem toxischen DMSO zu trennen. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellett mit 1 ml Medium resuspendiert und in einer Zellkulturflasche ausgesät. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 2 Tagen.

3.1.5 Markierung der Tumorzellen mit perimag[®] Partikeln

Perimag[®]-Partikel wurden für die Markierung der FaDu- und HLaC79-Tumorzellen herangezogen. Diese Partikel weisen einen Durchmesser von 130 nm auf und besitzen

eine Oberfläche aus Aminogruppen. Damit können sie eine kovalente Bindung zu Proteinen eingehen. Weiterhin enthalten sie 70 % Eisenoxid, welches sich im Zytosol von Zellen anreichern kann. Ziel war es die zuvor markierten Tumorzellen zusammen mit gesunden oralen Keratinozyten und Fibroblasten für den Modellaufbau zu verwenden um im Anschluss das von ausschließlich den Tumorzellen aufgenommene Eisenoxid mit Hilfe einer Berliner-Blau-Färbung histologisch nachweisen zu können. Dafür wurden entweder die FaDu- oder die HlaC79-Tumorzellen vom Boden einer T175 Zellkulturflasche abgelöst und mit einer Dichte von $1 \times 10^3 / \text{cm}^2$ mit einer höheren Passage in T25 Flaschen neu ausgesät. Nach 24 Stunden wurde eine Lösung mit perimag[®] Partikeln und RPMI Medium so angesetzt, dass eine Eisenoxidkonzentration von $1000 \mu\text{g} / \text{ml}$ vorlag. Das alte Medium in den Zellkulturflaschen wurde abgesaugt und 2 ml der Eisenoxid-Lösung für 48 Stunden in die Flaschen appliziert. Nach diesen 2 Tagen im Inkubator wurde die Lösung abgesaugt, die Tumorzellen gemäß Kapitel 3.1.2.2 abgelöst und im Anschluss für den Modellaufbau eines dreidimensionalen *in vitro* Plattenepithelkarzinoms verwendet (vgl. Kapitel 3.1.6.4).

3.1.6 Aufbau von oralen Mukosaäquivalenten und dreidimensionalen Plattenepithelkarzinommodellen

Im Folgenden wird der Aufbau der oralen Mukosaäquivalenten und der Plattenepithelkarzinommodelle beschrieben.

3.1.6.1 Zellkronen und SISmuc

Sowohl die am Tag vorher zum Autoklavieren abgegeben Kunststoffzellkronen als auch die SISmuc wurden in eine große Petrischale überführt. Ein Stück SISmuc mit einer Länge von 5 cm wurde glattgestrichen und seitlich ein dünner Streifen abgeschnitten, sodass sich diese nun aufklappen ließ und mit dem Lumen nach oben lag. Ausreichend große Stücke wurden nun zurechtgeschnitten und die Zellkronen mit einer Fläche von $0,54 \text{ cm}^2$ damit bespannt, sodass die lumenwärts gerichtete Seite in das Innere der Zellkrone zeigte. Je eine Zellkrone wurde in ein Well einer 12 Well-Platte überführt und das Innenlumen mit DMEM befüllt, um die Dichtigkeit zu überprüfen. Die Wells um die Zellkronen wurden anschließend ebenfalls mit DMEM aufgefüllt und über Nacht

inkubiert. Am nächsten Tag wurde innen und außen das Medium abgesaugt und die Fibroblasten auf die SISmuc ausgesät.

3.1.6.2 Aufbau der dermalen Komponente

Die Fibroblasten wurden wie oben beschrieben abgelöst (vgl. Kapitel 3.1.2.2) und gezählt (vgl. Kapitel 3.1.2.3). Pro Zellkrone wurden 5×10^4 Zellen in 250 μ l DMEM auf die Lumenseite der SISmuc ausgesät und für 2 Stunden inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde DMEM in das Lumen der Zellkrone und in das jeweilige Well dazugegeben und in den Inkubator gestellt. Auf eine genaue Mengenangabe an DMEM konnte hier verzichtet werden, da das Lumen der Zellkrone bis 1 mm unterhalb des Randes und das Well 1 cm mit Medium aufgefüllt wurde, sodass ein Austrocknen der SISmuc vermieden wurde.

Der erste Mediumwechsel erfolgte nach 2 bis 3 Tagen und wurde dann wie gewohnt montags, mittwochs und freitags durchgeführt, bis an Tag 7 die Keratinozyten appliziert wurden.

3.1.6.3 Aufbau der epidermalen Komponente

Sobald 80 bis 90 % des Zellkulturflaschenbodens mit Keratinozyten desselben Spenders bedeckt waren, wurden diese wie oben beschrieben (vgl. Kapitel 3.1.2.1) von dem Boden der Zellkulturflasche abgelöst und gezählt. Pro Modell wurden $2,5 \times 10^5$ Keratinozyten in 250 μ l Epilife[®] Medium E2 (Epilife[®] Medium E1 mit 4,8 μ l / ml Calciumchlorid) ausgesät. Nach 2 Stunden wurden alle Zellkronen innen und die Wells außen mit E2 Medium aufgefüllt.

Nach 24 Stunden erfolgte Kultur als die Air-Liquid-Interface (ALI), sodass das Medium sowohl innerhalb als auch außerhalb der Zellkronen entnommen wurde, die Zellkronen in eine 6-Well-Platte gesetzt und Epilife[®] Medium E3 lediglich in das äußere Kompartiment der jeweiligen Zellkrone gegeben wurde. Auch hier war es essentiell, dass so viel Medium appliziert wurde, dass ein Austrocknen der SISmuc vermieden wurde.

Bis zum Ende der Gesamtkultivierung (Tag 10 nach ALI) erfolgte der Mediumwechsel mit Epilife[®] Medium E3 wie gewohnt dreimal pro Woche.

3.1.6.4 Aufbau von Mukosaäquivalenten mit Tumorzellen

Für sämtliche Versuche wurden zum einen Tumorzellen aus der FaDu-Zelllinie und zum anderen Tumorzellen aus der HLaC79-Zelllinie, sowie HLaC79 Clone 1, ein Paclitaxel-resistenter Klon derselben verwendet. Der Aufbau der Tumormodelle erfolgte analog dem der gesunden oralen Mukosaäquivalenten, den Keratinozyten wurden allerdings noch Tumorzellen in bestimmten Konzentrationsverhältnissen (1:10, 1:17, 1:25 und 1:50) beigemischt. So wurde beispielhaft bei einem Verhältnis von 1:10 ein Gemisch aus $2,5 \times 10^4$ Tumorzellen und $2,5 \times 10^5$ Keratinozyten hergestellt und auf die SISmuc mit bereits vorher applizierten Fibroblasten pipettiert. Dabei war die Anzahl an Keratinozyten stets $2,5 \times 10^5$ pro Modell. Der Modellaufbau mit den zuvor mit perimag[®] Partikel markierten Tumorzellen entsprach den Versuchsabläufen ohne vorherige Markierung. Die Tumormodelle wurden am zehnten Tag nach ALI für weitere Versuche verwendet.

3.1.6.5 Aufbau von Tumormodellen mit Hilfe eines gedruckten Zylinders

Im Rahmen dieser Arbeit war es außerdem ein Ziel ein Tumormodell aufzubauen, welches nicht auf der gesamten Länge aus einem Gemisch von primären gesunden oralen Keratinozyten und Tumorzellen besteht (vgl. Kapitel 3.1.6.4), sondern eine mikroskopisch sichtbare Grenzfläche zwischen *in vitro* nachgebildeter apathologischer Mundschleimhaut und einem Tumor aus Tumorzelllinien besitzt. Da ein separates Pipettieren auf die bereits vorher applizierten Fibroblasten wegen der schnellen Vermischung mit den anderen Zellen nicht möglich war, wurden im Institut von Tissue Engineering und Regenerative Medizin Würzburg mit Hilfe eines 3D-Druckers mehrere kleine Zylinder produziert, die einen Innendurchmesser von 2 mm aufweisen, welcher ein separates Pipettieren mit kleinen Eppendorfpipetten in das Lumeninnere zulässt. Der Außendurchmesser beträgt 6 mm, sodass der Platz von 2 mm zwischen Zylinder und Zellkrone auch dort ein separates Pipettieren von Zellen zulässt. Die Zylinder sind aus Polylactidfilament (PLA) und somit sterilisierbar, sodass diese für einige Wiederholungsversuche wiederverwendbar waren (vgl. Abbildung 4).

Am achten Tag nach Fibroblastenapplikation wurde das Medium im Lumen der Zellkrone komplett abgenommen und die Modelle für 5 Minuten an der Luft getrocknet. Der Zylinder wurde mit Hilfe der kleinen Kunststoffarme an der Zellkrone befestigt. Danach erfolgt das Pipettieren von 15×10^4 HLaC79-Tumorzellen in $10 \mu\text{l}$ Medium in das

Zylinderinnere, welche sich unmittelbar auf die Fibroblasten absetzen. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten wurden 25×10^4 gesunde orale Keratinozyten zirkulär in den Raum zwischen Zylinder und Zellkrone pipettiert. Nach weiteren 2 Stunden Inkubationszeit wurde der Zylinder von den Zellkronen entfernt und das gesamte Innenlumen der Zellkronen mit Epilife® Medium E2 befüllt. Am nächsten Tag erfolgte, wie oben beschrieben, die ALI-Phase. Die Gesamtkultivierung war ebenfalls nach 17 Tagen abgeschlossen.

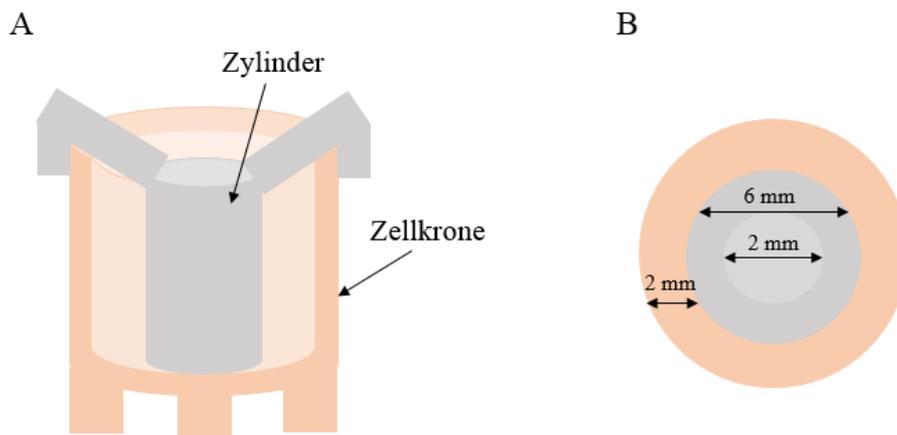


Abbildung 4: **Zeichnerische Darstellung des PLA-Zylinders zum Aufbau von Tumormodellen.** A zeigt eine Zellkrone und den Zylinder von seitlicher Ansicht. B zeigt den Querschnitt von Zellkrone und Zylinder.

3.1.7 Isolation von primärem Tumorgewebe

Ein weiterer Teil dieser Arbeit war es, eine geeignete Isolationsmethode von epithelialen Tumorzellen aus oralen Plattenepithelkarzinomen zu etablieren. Die Biopsate wurden in gleichen Verhältnissen transportiert wie gesundes Gewebe und wurden noch am Operationstag aus dem Transportmedium entnommen. Dabei wurden sechs unterschiedliche Versuchsmöglichkeiten zur Isolation der Tumorzellen erprobt (vgl. Abbildung 5). So wurde zum einen das Transportmedium herunterzentrifugiert und in einer Zellkulturflasche ausgesät (Nummer 1). Zum anderen wurde das zusammenhängende Gewebe in mehrere Stücke geschnitten und auf den Boden einer Zellkulturflasche gesetzt (Nummer 2). Analog der Isolation von Keratinozyten aus gesunder Mundschleimhaut wurde das Tumorgewebe über Nacht in Dispase gelegt und

anschließend mit Trypsin isoliert (Nummer 3) und die Zellsuspension in der Dispase ausgesät (Nummer 4). Ein weiterer Versuch war es, das pathologische Gewebe in Kollagenase zu verdauen und die Zellsuspension in der Kollagenase auszusäen (Nummer 5) und die Gewebestücke nach Kollagenaseverdauung in einer Zellkulturflasche adhären zu lassen (Nummer 6). Als Medium wurde stets Epilife® Medium E1 verwendet und in allen Fällen wurde der Rho-Kinase-Inhibitor Y27632 hinzugefügt.

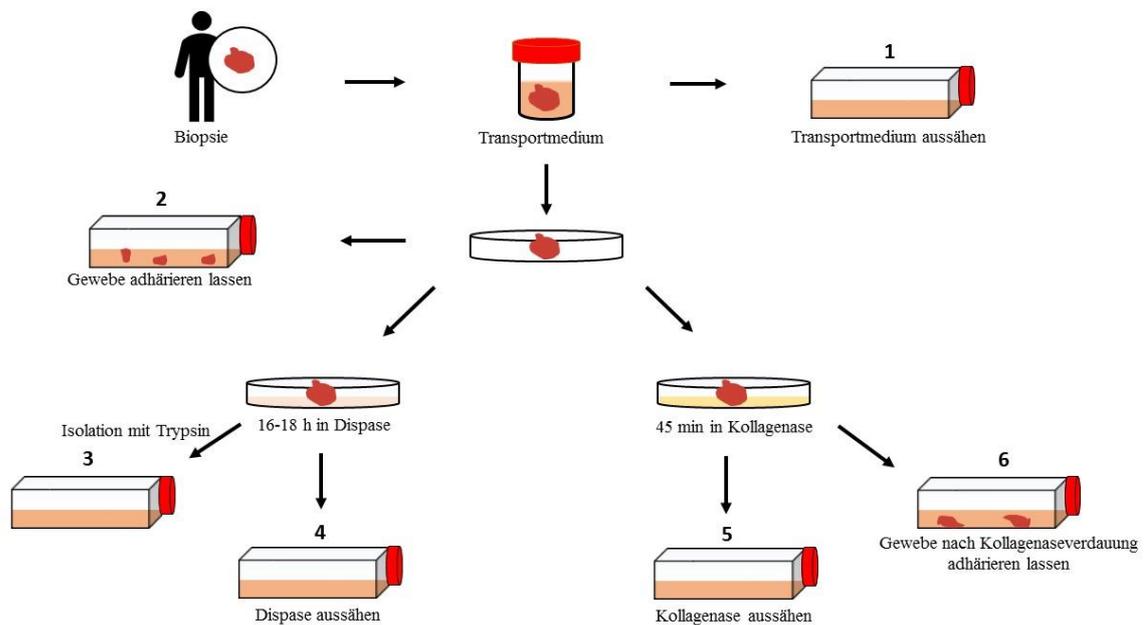


Abbildung 5: **Ablauf der Isolation von Plattenepithelkarzinomzellen aus primär humanem Gewebe.**

3.2 Histologie

3.2.1 Herstellung der Paraffinschnitte

Nach 10 bis 14 Tagen in Kultur wurde das Medium außerhalb der Zellkronen entfernt und mit DPBS⁻ gespült. Die mit Histofix (4 %-haltige Formaldehydlösung) fixierten Modelle wurden über Nacht in der 4 °C Kühlkammer gelagert. Am nächsten Tag wurden die Modelle aus den Zellkronen geschnitten, in Einbettkassetten zwischen Schaumstoff gelegt und über Nacht in den Einbettautomaten gelegt, der 18 Stunden für den Prozess des Einbettens brauchte.

Methoden

Am nächsten Tag erfolgte das Aufblocken der Modelle in Paraffin. Die Modelle wurden mit Hilfe eines scharfen Skalpells und einem Objektträger als Unterlage halbiert und in dem warmen Paraffin mit der Schnittseite nach unten aufrecht hingestellt. Durch Verschieben der Paraffinkassette auf einer kalten Platte ließ sich das Erstarren des Paraffins und die Lage der Modelle genau regeln. Als Deckel wurde der bedruckte Teil der Einbettkassette benutzt.

Das Aushärten des Paraffins war nach 2 Stunden abgeschlossen und die Paraffinblöcke konnten der Kassette entnommen werden. Damit die Schnitte am Mikrotom eine höhere Erfolgsrate haben und weniger schnell reißen, wurden die Paraffinblöcke für eine Stunde auf eine Eisplatte gelegt.

Die Blöcke wurden in das Mikrotom eingeklemmt und die gewünschte Schnittdicke von 3 µm wurde eingestellt. Die Schnitte mussten vorsichtig mit einem Pinsel und einer Pinzette in ein Wasserbad (60 °C) überführt werden, damit diese sich vollständig entfalten konnten und dadurch weniger Unebenheiten aufwiesen. Ein Objektträger wurde mit zwei bis drei Schnitten bestückt und in einen Objektträgerhalter gestellt. Dieser befand sich dann über Nacht in dem 37 °C warmen Ofen, um die Schnitte auf dem Objektträger zu fixieren. Am nächsten Tag wurden diese wieder aus dem Ofen entfernt und konnten entweder direkt im Anschluss gefärbt oder in einer Sammelkassette aufbewahrt werden. Vor jeder Färbung mussten die Objektträger für eine Stunde in den 64 °C Wärmeschrank, damit das Paraffin schmelzen konnte.

3.2.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung gilt als Übersichtsfärbung, die die Zellkerne blau und das Zytoplasma und die Extrazellulärmatrix rot färbt.

Nach einer Stunde wurden die Schnitte dem Wärmeschrank entnommen und durchliefen zum Entparaffinieren und Wässern die absteigende Alkoholreihe (vgl. Tabelle 13). Danach kamen sie in das Hämatoxylin sauer nach Mayer / Morphisto, welches die Zellkerne anfärbt und anschließend in das Eosin, welches das Zytoplasma und den Extrazellulärraum färbt. Zum Entwässern durchliefen die Schnitte die aufsteigende Alkoholreihe. Zuletzt wurden sie direkt aus dem Xylolbad entnommen und mit einigen Tropfen Entellan und einem Deckglas versehen. Zum Ausdunsten verblieben die Objektträger über Nacht unter dem Abzug und wurden am nächsten Tag mikroskopiert.

Tabelle 13: Protokoll der H.E.-Färbung.

Zeit	Lösung	Intention
10 min	Xylol I	Absteigende Reihe: Entparaffinieren / Rehydrieren
10 min	Xylol II	
3x auf- und abtauchen	Ethanol 96 %	
3x auf- und abtauchen	Ethanol 96 %	
3x auf- und abtauchen	Ethanol 70 %	
3x auf- und abtauchen	Ethanol 50 %	
	VE-Wasser	
6 min	Hämatoxylin sauer nach Mayer (Morphisto)	Färben der Zellkerne
	VE-Wasser	Waschen
5 min	Leitungswasser	Bläuen
6 min	Eosin	Färben des Zytoplasmas
	VE-Wasser	Waschen
2x auf- und abtauchen	Ethanol 70 %	Aufsteigende Reihe: Entwässern
2 min	Ethanol 96 %	
5 min	Isopropanol I	
5 min	Isopropanol II	
5 min	Xylol I	
5 min	Xylol II	

3.2.3 Berliner-Blau-Färbung

Bei den Modellen, in denen die Tumorzellen zuvor mit Eisenoxid markiert worden waren, wurde die Berliner-Blau-Färbung durchgeführt. Sie stellt das Eisenoxid im Zytosol in Blau dar und die Zellkerne in Rot. Tabelle 14 zeigt das Protokoll der Färbung. Analog der H.E.-Färbung (vgl. Kapitel 3.2.2) durchliefen die Schnitte anfangs die absteigende

Methoden

Alkoholreihe, wurden anschließend mit dem Kaliumhexacyanoferrat(II) vorbehandelt um dann im Anschluss mit der Salzsäure das Eisen in den Zellen nachzuweisen. Das Kernechtrot färbt die Zellkerne rot. Die aufsteigende Alkoholreihe sorgt für das Entwässern der Paraffinschnitte.

Tabelle 14: Protokoll der Berliner-Blau-Färbung.

Zeit	Lösung	Intention
5 min	Xylol I	Absteigende Reihe: Entparaffinieren / Rehydrieren
5 min	Xylol II	
2 min	Ethanol 96 %	
2 min	Ethanol 80 %	
2 min	Ethanol 70 %	
2 min	Ethanol 60 %	
2 min	VE-Wasser	
5 min (bei 40 °C)	Kaliumhexacyano- ferrat(II) 5 %	Färben des Eisenoxids
30 min (bei 40 °C)	Kaliumhexacyanoferrat + Salzsäure (Verhältnis 1:1)	
5 min	VE-Wasser	Waschen
10 min	Kernechtrot	Färben der Zellkerne
5 min	VE-Wasser	Waschen
2 min	Ethanol 70 %	Aufsteigende Reihe: Entwässern
2 min	Ethanol 96 %	
2 min	Ethanol 96 %	
2 min	Isopropanol	
5 min	Xylol I	
5 min	Xylol II	

3.2.4 Immunhistologische Färbung mit HRP-basiertem Nachweissystem

Die immunhistologische Färbung mit dem HRP-basiertem Nachweissystem beruht darauf, dass das Diaminobenzidin (DAB) als Substrat der Meerrettichperoxidase (HRP) dient. Das antikörpergebundene DAB verantwortet nach erfolgter Antigen / Antikörper-Komplexierung einen Farbumschlag, indem an den Strukturen, an denen die entsprechenden Antigene lokalisiert sind, ein braunfarbiges Reaktionsprodukt entsteht.

Die Schnitte auf den Objektträgern wurden analog der Vorbereitung für die H.E.-Färbung und für die Berliner-Blau-Färbung für eine Stunde in den Wärmeschrank mit einer Temperatur von 60 °C gestellt. Nach Ablauf dieser Stunde durchliefen diese für die Entparaffinierung und Rehydratation direkt die absteigende Alkoholreihe (siehe Schritt 1-7 in Tabelle 13). Ab diesem Zeitpunkt musste genauestens beachtet werden, dass die Schnitte nicht austrocknen. Je nach Datasheet der entsprechenden verwendeten Antikörper erfolgte entweder eine hitzeinduzierte Epitopdemaskierung, bei der die Schnitte in einem spezifischen Puffer für 20 Minuten bei 100 °C in einem Dampfgerät verweilten oder eine direkte Überführung in VE-Wasser und in den PBS-Waschpuffer mit 0,5 % Tween-20, wobei die Schnitte kurz entnommen wurden, um diese mit einem Fettstift zu umranden, um so ein späteres Abfließen der nachfolgenden Lösungen von den Objektträgern zu verhindern.

Die primären Antikörper (vgl. Tabelle 9) wurden entsprechend ihrer Konzentration mit der Antikörperverdünnungslösung verdünnt. Ab hier wurden die Schnitte einer feuchten Dunkelkammer überführt. Die weiteren Handlungsabläufe werden in Tabelle 15 dargestellt.

Methoden

Tabelle 15: Protokoll der immunhistologischen Färbung mit HRP-basiertem Nachweis.

Zeit	Lösung	Ziel
10 min	3 % H ₂ O ₂	Blockieren der zelleigenen Peroxidase
5 min	Waschpuffer	Waschen
30 min	Blocklösung	Hintergrundreduzierung
60 min bei Raumtemperatur/ über Nacht bei 4 °C	Primärantikörper	Färbung der spezifischen Zell- und Gewebestrukturen
3 x 5 min	Waschpuffer	Waschen
10 min	DCS Polymer Enhancer	Applikation von sekundärem Anti-Maus IgG und Anti-Kaninchen IgG
3 x 5 min	Waschpuffer	Waschen
20 min	DCS HRP-Polymer	Applikation von mit Meerrettichperoxidase konjugiertes Polymer gegen Maus- und Kaninchen-Antikörper
3 x 5 min	Waschpuffer	Waschen
zwischen 30 sec und 10 min	DAB Lösung	
2 min	Waschpuffer	Waschen
6 min	Hämatoxylin sauer nach Mayer (Morphisto)	Färbung der Zellkerne
5 min	Leitungswasser	Bläuen
1 min	VE-Wasser	Waschen

Die Objektträger wurden aus dem VE-Wasser entnommen und durchliefen analog der Schritte 13 bis 18 in Tabelle 13 die aufsteigende Alkoholreihe. Sie wurden mit Entellan, einem organischen Eindeckmittel, und einem Deckglas eingedeckt und am nächsten Tag mit dem Keyence Lichtmikroskop begutachtet.

3.3 Lebend-Tot-Färbung mit FDA/PI

Mit der Lebend-Tot-Färbung können vitale Zellen von toten Zellen mit Hilfe der Fluoreszenzmarker Fluoresceindiacetat (FDA) und Propidiumiodid (PI) und einem Fluoreszenzmikroskop unterschieden werden. Das nicht fluoreszierende Fluoresceindiacetat wird dabei von Enzymen der lebenden Zellen in grün fluoreszierendes Fluorescein umgesetzt. Tote Zellen mit nicht mehr funktionsfähigen Enzymen können diese Reaktion nicht katalysieren. Da das Propidiumiodid mit der Desoxyribonukleinsäure der Zellen interkaliert und von toten Zellen aufgrund der geschädigten Membran schneller aufgenommen werden kann, erscheinen diese unter dem Fluoreszenzmikroskop rot leuchtend. Das Ziel dieser Methode war es, unbehandelte und mit Paclitaxel und Salinomycin behandelte Keratinozyten sowie HLaC79 und HLaC79 Clone 1 zu charakterisieren und das Verhältnis von lebenden und toten Zellen zu bestimmen. Dafür wurden 4-well Chamberslides mit jeweils den oben genannten Zelltypen besiedelt und bei einer 80 %igen Konfluenz ein Objektträger mit 5 μM Salinomycin und einer mit 10 nM Paclitaxel für 24 Stunden inkubiert. Außerdem blieb jeweils ein Objektträger unbehandelt. Für die Herstellung der Gebrauchslösung wurden 1 μl der FDA-Stammlösung mit 9 μl der PI-Stammlösung und 990 μl PBS⁻ gemischt. Nachdem die zu färbenden Zellen auf den 4-well Chamberslides zuvor einmalig mit PBS⁻ gespült worden waren, wurden einige Tropfen der Gebrauchslösung auf die Zellen gegeben. Nach einer Einwirkzeit von 10 Sekunden wurde die Färbelösung mit PBS⁻ ausgewaschen und die Zellen unverzüglich unter dem Fluoreszenzmikroskop mikroskopiert. Die einzustellenden Wellenlängen betragen 488 nm und 595 nm.

3.4 Impedanzspektroskopie zur Messung des transepithelialen elektrischen Widerstandes

Die Messung des Impedanzspektrums und die Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER-Wert) ermöglicht die Ermittlung der Diffusionsbarriere der Mundschleimhaut- und Tumormodelle. Eine Barriere entsteht durch enge Zell-Zell-Kontakte (Tight Junctions), die zwei Zellen voneinander trennen und den parazellulären Durchtritt von Molekülen und Ionen kontrollieren. Durch Anlegen einer Wechselspannung misst man somit die elektrische Impedanz (entspricht dem elektrischen Widerstand), die in Abhängigkeit von der Frequenz der Wechselspannung als Impedanzspektrum bezeichnet wird. Je größer dabei der Widerstand ist, desto mehr Zell-Zell-Kontakte existieren und desto höher ist die Diffusionsbarriere.

Für die Messungen wurden die Modelle in eine 24-well Platte gesetzt, die passende Aussparungen für die Titan-Nitrit-Messplatte aufwies. Außen in die Wells wurden je 1100 µl und in die Zellkronen 300 µl Epilife® Medium pipettiert, damit die Höhe des Mediums innen und außen identisch war. Die Messplatte wurde auf die 24-well Platte gesetzt und an das Impedanzmesssystem HIOKI angeschlossen. Die rote Low Current und Low Potential Klemme wurde mit der äußeren Elektrode und die schwarze High Current und High Potential Klemme mit der inneren Elektrode, die in das Innere der Zellkronen zeigte, verbunden.

Die Messung erfolgte an Tag 2, 4, 6, 8 und 10 nach der Airlift-Kultivierung.

3.5 MTT-Assay

Der MTT-Test findet Anwendung darin, die Zellviabilität im Vergleich zu einer Kontrollprobe sowohl in zweidimensionaler als auch in dreidimensionaler Kultivierung zu bestimmen. Dabei werden die Zellen in zweidimensionaler und die OMÄ in dreidimensionaler Kultivierung dem gelben, wasserlöslichen Farbstoff 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid (MTT) in einer Konzentration von 1 mg / ml für 3 Stunden bei 37 °C ausgesetzt. Intakte Zellen nehmen diesen Farbstoff auf und reduzieren ihn zu dem violetten, wasserunlöslichen Farbstoff (E,Z)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan. Im Anschluss sorgt eine einstündige Inkubation in 2-Propanol für das Herauslösen des Farbstoffes aus den Zellen. Nach dem Durchmischen der Lösung wurden jeweils 200 µl in eine 96-well Platte

Methoden

überführt, wobei das 2-Isopropanol als Blank diente. Die Lichtabsorptionsmessung erfolgte bei einer Wellenlänge von 570 nm.

In der zweidimensionalen Kultivierung wurden sowohl humane orale Keratinozyten als auch FaDu, HLaC79 und HLaC79 Clone 1 Tumorzellen getestet, die jeweils für 24 Stunden in Wells von Zellkulturplatten den Medikamenten Paclitaxel und Salinomycin in verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt waren.

Die dreidimensionalen OMÄ und mit HLaC79 Tumorzellen aufgebauten Tumormodelle, welche nach abgeschlossener Kultivierung 24 Stunden mit unterschiedlichen Konzentrationen von Paclitaxel behandelt worden waren, wurden ebenfalls für 3 Stunden bei 37 °C der MTT-Lösung ausgesetzt, indem diese sowohl außen in das jeweilige Well und in das Lumen der Zellkronen pipettiert wurde. Im Anschluss wurden die Modelle mit samt der SISmuc aus den Zellkronen herausgelöst und lose in das 2-Propanol gelegt. Für eine komplette Herauslösung des Farbstoffes wurden die Zellkulturplatten dabei für eine Stunde auf einen Rüttler gestellt. Danach wurde analog der Messung in zweidimensionaler Kultivierung fortgeföhren.

4 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse dargelegt, die im Rahmen dieser Dissertation erarbeitet wurden. Beginnend wird die Isolation von primären Tumorzellen aus Plattenepithelkarzinomen im Mund- und Pharynxbereich beschrieben. Im weiteren Verlauf werden die histologischen und immunhistologischen Charakterisierungen von Tumormodellen beschrieben, welche sowohl mit der FaDu-Zelllinie als auch mit der HLaC79- und der HLaC79 Clone 1-Tumorzelllinie aufgebaut wurden. Der Vergleich dieser Tumormodelle erfolgte mit hergestellten oralen Mukosaäquivalenten (OMÄ), die der physiologischen oralen Mundschleimhaut entsprechen. Zum Ende sind die Ergebnisse sichtbar, die sich aus der Behandlung der HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Tumormodelle mit den Medikamenten Salinomycin und Paclitaxel ergaben.

4.1 Isolation von primären Tumorzellen aus oralen Plattenepithelkarzinomen

Im ersten Teil der Arbeit sollten primäre Tumorzellen aus Plattenepithelkarzinomen isoliert werden. Die sechs Biopsate mit makroskopisch sichtbarer pathologischer Schleimhaut wurden im Rahmen von partiellen oder totalen Tumorresektionen von Chirurgen der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Würzburg aus den zentralen Arealen der Plattenepithelkarzinome entnommen und freundlicherweise bereitgestellt. Die Tumore waren im Pharynx oder im oberen Larynx lokalisiert und wiesen unterschiedliche TNM-Stadien auf.

Tabelle 16 fasst die einzelnen Beobachtungen der Isolationsversuche zusammen.

Ergebnisse

Tabelle 16: Tabellarische Zusammenfassung der Biopsate von oralen Plattenepithelkarzinomen nach Isolationsversuchen.

Spender	TNM-Stadium	Isolation möglich	Kontamination	Zellapoptose
# 83	cT3 cN2b cM0 Hypopharynx - Karzinom	Nein	k.A.	k.A.
# 91	k.A.	Nein	k.A.	k.A.
# 97	cT3 cN0 cM0 Larynx - Karzinom	Ja, Nummer 2, 3 und 4	Nein	Ja
# 99	cT2 cN2b cM0 Tonsillen - Karzinom	Ja, Nummer 1, 5 und 6	Ja	/
# 101	cT2 cN1 cM0 Oropharynx - Karzinom	Ja, Nummer 1, 5 und 6	Ja	/
# 103	k.A.	Ja, Nummer 1, 2 und 3	Nein	Ja

Daraus erkennbar war die Isolation von vier aus insgesamt sechs Biopsaten möglich, da die Biopsate von Spender # 83 und # 91 bereits beim Eintreffen im Institut kontaminiert waren und eine Isolation nach dem Einlegen in Dispase über Nacht erfolglos verlief. Das Biopsat des Spenders # 97 wurde in mehrere Stücke zerschnitten und für die Versuche Nummer 2, 3 und 4 verwendet (vgl. Abbildung 5 in Kapitel 3.1.7 und Abbildung 6). So wurde die Isolation anfangs als geglückt eingestuft, da sich an Tag 1 Zellen in den Zellkulturflaschen befanden. Allerdings waren diese Zellen abgekugelt und morphologisch nicht charakterisierbar. An Tag 7 nach Isolation zeigte sich trotz regelmäßigem Wechsel des Mediums ein stagniertes Wachstum oder sogar eine Apoptose

Ergebnisse

der Zellen. Die Zellen in der ausgesähten Dispase (Nummer 4) und die, die durch Trypsin isoliert wurden (Nummer 3), adhärirten nur teilweise am Boden der Zellkulturflaschen, sodass viele avitale Zellen vorlagen. An Tag 7 waren die Zellkulturflaschen bis auf vereinzelt vorgefundenen Zelldetritus leer. Der Versuch Nummer 2 zeigte mehrere kleine Zellkolonien, die in der Nähe der adhärirten Gewebestücke lokalisiert waren. Das Zellwachstum konnte hier jedoch als sehr langsam eingestuft werden und ein Passagieren der vorhandenen Zellen zeigte sich im weiteren Verlauf als ergebnislos. Die gleichen Ergebnisse brachte die Isolation des Plattenepithelkarzinoms von Spender # 103, sodass diese Isolationsversuche jeweils verworfen wurden.

Bei Spender # 99 wurden Isolationsversuche Nummer 1, 5 und 6 durchgeführt. Bei dem Aussäen des Transportmediums (Nummer 1), welches Epilife® Medium E1 mit Penicillin und Streptomycin enthielt, zeigten sich anfangs adhärirte Zellen in der Flasche, die jedoch an Tag 7 kein Wachstum mehr aufwiesen. Eine Kontamination der Zellen zeigte sich bei Nummer 5, bei der die Kollagenase ausgesät wurde, sowie bei Nummer 6, bei der die kollagenaseverdauten Gewebestücke auf den Boden der Zellkulturflasche appliziert wurden. Eine Kontamination aller drei Versuche zeigte sich bei Spender # 101, sodass diese ebenfalls nicht für weitere Versuche herangezogen werden konnten.

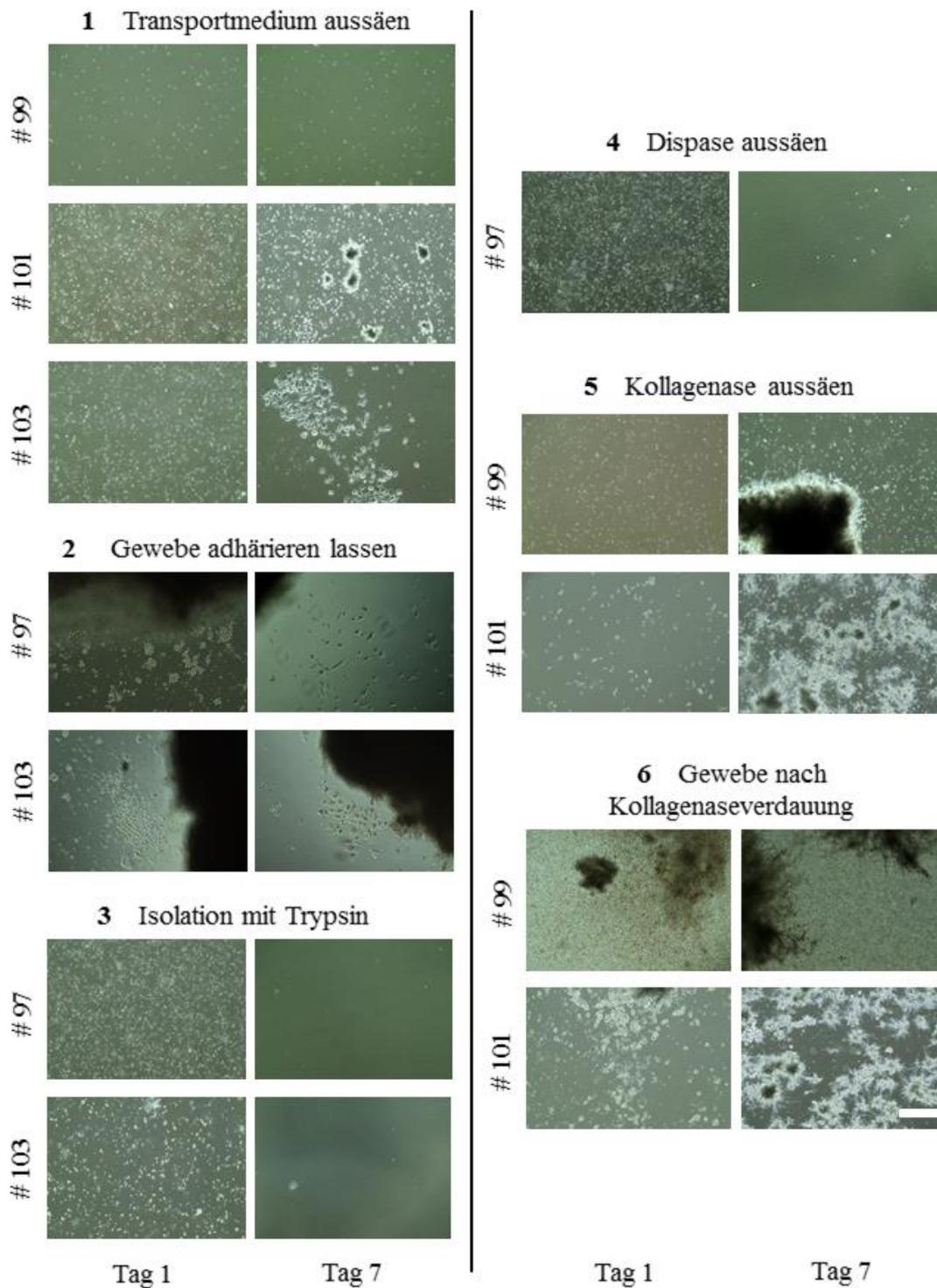


Abbildung 6:

Lichtmikroskopische Aufnahmen der zweidimensionalen Kultivierung von Spender # 97, # 99, # 101 und # 103 nach Isolation der Biopsate von oralen Plattenepithelkarzinomen an Tag 1 und Tag 7. Sortierung nach Isolationsversuchen Nummer 1 bis 7. Alle Bilder bei 10-facher Vergrößerung. Größenbalken entspricht 400 µm.

4.2 Tumormodelle mit Zellen der FaDu-Tumorzelllinie

Die Tumormodelle, die ein orales Plattenepithelkarzinom *in vitro* nachbilden sollten, wurden anfangs mit Tumorzellen der FaDu-Zelllinie aufgebaut. Da diese Tumormodelle bereits im Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin etabliert worden sind, dienten die Versuche in dieser Arbeit dazu, die Reproduzierbarkeit zu testen und im Anschluss mit Tumormodellen zu vergleichen, die mit den HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Tumorzelllinien aufgebaut worden sind. Nachdem die SISmuc in den Zellkronen mit primär oralen Fibroblasten benetzt worden ist, wurden die FaDu-Tumorzellen mit primär oralen apathologischen Keratinozyten in den Konzentrationen 1:10, 1:17 und 1:25 (entspricht eine FaDu-Tumorzelle auf 10, 17 oder 25 Keratinozyten) vermischt und am achten Tag auf die ausgebildete Lamina propria appliziert. Die Gesamtkultivierung betrug 17 Tage. Die FaDu-Tumormodelle wurden anfangs histologisch durch eine H.E.-Färbung charakterisiert. Des Weiteren wurde der transepitheliale Widerstand gemessen um letztendlich Schlussfolgerungen über das Zellwachstum, die Epitheldicke, die Ausbildung einer Diffusionsbarriere und das Verhalten der *in vitro* nachgebildeten Tumormodelle zu ziehen. Für den Vergleich mit den oralen Mukosaäquivalenten wurden diese stets hinzugezogen. Ein weiterer Versuch war die Eisenoxidmarkierung der FaDu-Tumorzellen, mit diesen markierten Zellen anschließend Tumormodelle aufzubauen und mit Hilfe einer Berliner-Blau-Färbung eine vermutliche Invasion der Tumorzellen darzustellen.

4.2.1 Histologie der Tumormodelle mit Zellen der FaDu-Zelllinie

Nach Abschluss der Kultivierung wurden die Modelle einer H.E.-Färbung unterzogen, um anschließend eine mikroskopische Charakterisierung durchzuführen. In Abbildung 7 sind sowohl histologische Bilder des OMÄ erkennbar (A+B), welches bei jedem Versuch dieser Arbeit als Kontrollmodell herangezogen wurde, als auch Bilder der verschiedenen FaDu-Tumormodelle mit den Konzentrationsverhältnissen 1:10 (vgl. Abbildung 7C+D), 1:17 (vgl. Abbildung 7E+F) und 1:25 (vgl. Abbildung 7G+H).

Bei dem OMÄ ist von basal nach apikal deutlich die SISmuc als Matrix erkennbar, auf der die Fibroblasten ausgesät worden sind und eine Lamina propria gebildet haben, in der die Fibroblastenzellkerne unverkennbar sind. Ebenfalls eindeutig zu sehen ist die verflochtene Struktur dieser Schicht. Darüber befindet sich die Basalmembran, auf der

Ergebnisse

die Keratinozyten palisadenförmig angeordnet sind und von basal Richtung apikal wandern und sich dabei in den Schichten von dem Stratum basale bis Stratum granulosum differenzieren, indem sie die kubische Form verlieren und zunehmend ovaler werden. Im Anschluss findet man das Stratum corneum mit Keratinozyten, welche aber noch abgeflachte Zellkerne vorweisen. Es liegt also somit ein parakeratinisiertes mehrschichtiges Plattenepithel vor. Das gesamte Epithel ist ca. 200 µm dick und besteht aus 15 bis 20 Zellschichten. Auf der gesamten Schnittlänge sind keine Dysplasien oder Kontinuitätsunterbrechungen ersichtlich.

Bei dem Konzentrationsverhältnis einer FaDu-Tumorzelle auf 10 Keratinozyten (1:10), also mit der zu erwartenden am meisten pathologisch sichtbaren Auswirkung auf die Modelle, sind die mit Abstand schwerwiegendsten Entartungen und Störungen in der Architektur sichtbar. Das Stratum corneum weist Kontinuitätsunterbrechungen und eine reduzierte Schichtdicke auf, während eine kontinuierliche Basalmembran gänzlich fehlt. Die Keratinozyten weisen eine ungeordnete Anordnung auf und überwiegen mit einer großen Vielfalt an unterschiedlichen Zellgrößen. Zusätzlich zu diesem Zellpleomorphismus ist eine Invasion von Tumorzellen in die Lamina propria an der vorliegenden Verhornungsknospe in dieser Schicht deutlich erkennbar (vgl. Abbildung 7C, schwarzer Pfeil). Im Vergleich dazu ist das Stratum corneum bei der Konzentration von einer FaDu-Tumorzelle auf 17 Keratinozyten (1:17) annähernd so ausgebildet wie in dem OMÄ und verzeichnet keine Reduzierung der Schichtdicke. Eine Abgrenzung zwischen dermalen und epithelialen Komponenten ist ersichtlich und eine Invasion von Tumorzellen in die Lamina propria kann hier ausgeschlossen werden. Die Keratinozyten sitzen der Basalmembran jedoch auch hier in unterschiedlichen Größen ungeordnet auf, sodass die palisadenförmige Anordnung nicht aufzufinden ist. Das komplette Stratum basale weist Einbußen in der Dicke auf und eine Keratinozytendifferenzierung von basal nach apikal ist nicht erkennbar.

Bei den Modellen mit der geringsten Tumorzellkonzentration (1:25) können Parallelen zu den Tumormodellen mit einer Konzentration von 1:17 gezogen werden: Stratum corneum und Stratum basale haben die gleiche Architektur und eine Invasion von FaDu-Tumorzellen kann aufgrund der durchgehenden Basalmembran ausgeschlossen werden. Ein Kriterium, welches für eine weniger ausgeprägte Malignität dieser Modelle spricht, sind die Keratinozyten, die der Basalmembran aufsitzen. Diese weisen hier keine

Ergebnisse

ausgeprägte Größenvarianz auf und haben einen geringeren Differenzierungsgrad. Eine regelmäßige palisadenförmige Keratinozytenanordnung kann jedoch auch hier nicht nachgewiesen werden.

Ergebnisse

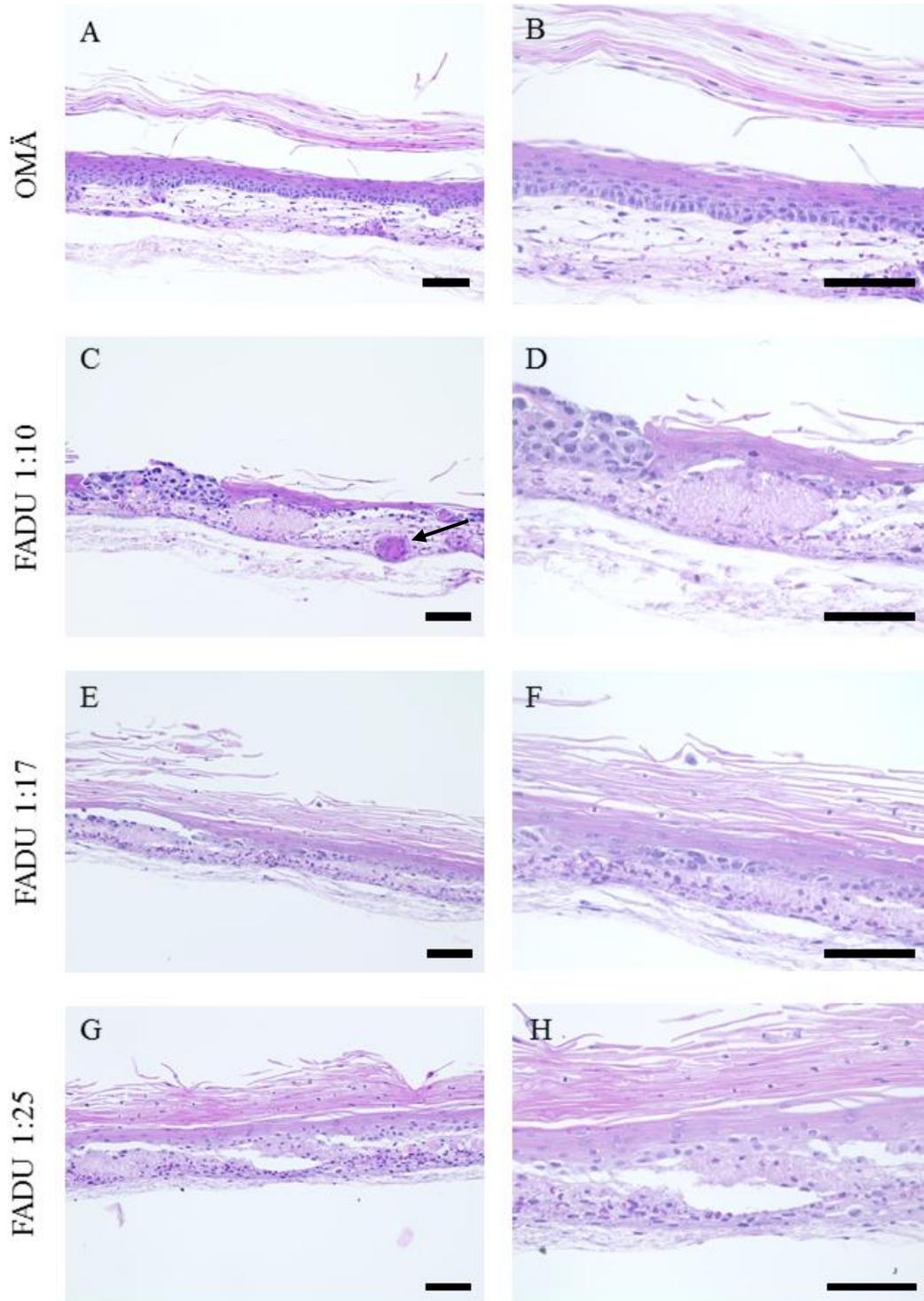


Abbildung 7:

Histologische Charakterisierung durch H.E.-Färbung eines oralen Mukosaäquivalents sowie drei Tumormodellen mit verschiedenen Konzentrationen zwischen primär oralen Keratinozyten und FaDu-Tumorzellen. A+B zeigen ein OMÄ, C+D zeigen die Modelle bei einer Konzentration von 1:10, E+F bei 1:17 und G+H bei 1:25 jeweils in 20-facher und 40-facher Vergrößerung. Größenbalken entsprechen 100 µm.

4.2.2 Transepithelialer Widerstand der FaDu-Tumormodelle

Die Bestimmung des transepithelialen elektrischen Widerstandes (TEER) der FaDu-Tumormodelle dient der Charakterisierung der Diffusionsbarriere, die ein solches Modell im zeitlichen Verlauf über mehrere Tage ausbildet. Die Barriere wird von Zell-Zell-Kontakten (Tight junctions) gebildet, die zwei Zellen voneinander trennen und somit eine wichtige Kontrollfunktion für den parazellulären Durchfluss von Molekülen und Ionen ausüben. Je mehr Zell-Zell-Kontakte vorliegen, desto größer ist die vorhandene Barriere und desto größer ist der gemessene TEER-Wert bei der Impedanzspektroskopie, wobei die Einheit des TEER-Wertes in $\text{Ohm} \times \text{cm}^2$ angegeben wird.

Um einen Unterschied in der Ausbildung von Diffusionsbarrieren zwischen den FaDu-Tumormodellen und den oralen Mukosaäquivalenten zu erfassen, wurde bei diesen Tumormodellen mit Hilfe der Impedanzspektroskopie der TEER-Wert an Tag 2, 4, 6, 8 und 10 nach der ALI-Phase gemessen. Die Modellanzahl betrug $n=6$. Die Konzentrationen von FaDu-Tumorzellen zu gesunden Keratinozyten betragen auch hier 1:10, 1:17 und 1:25.

Abbildung 8 stellt den zeitlichen Verlauf und die Unterschiede zwischen den verschiedenen konzentrierten Tumormodellen dar. Alle Werte sind abzüglich des Leerwertes, die eine mit dezellularisierter SIS muc bespannte Zellkrone in Epilife® Medium E1 aufweist. Deutlich erkennbar ist hierbei, dass sich die Werte der Modelle mit der Konzentration 1:10, also die mit den meisten FaDu-Tumorzellen, denen der Leerwerte ähneln bzw. noch geringer sind und auch keinen signifikanten Anstieg im zeitlichen Verlauf nachweisen. Mit einem Mittelwert von $1,06 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$ wurde der höchste Wert an Tag 8 erreicht.

Anders verhielten sich die Tumormodelle mit den Konzentrationen 1:17 und 1:25, bei denen der TEER-Wert bis zum Tag 8 stetig ansteigt, wobei sich dieser zwischen Tag 6 und Tag 8 sogar um den Faktor 2,58 bei der 1:17-Konzentration erhöht. Bei beiden Konzentrationen wurde ebenfalls an Tag 8 der höchste TEER-Wert erreicht und beträgt $70,96$ bzw. $138,1 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$. Auffällig ist außerdem das Sinken der Werte an Tag 10, wobei dieses bei der Konzentration 1:25 ausgeprägter ist.

Die geringste Konzentration von FaDu-Tumorzellen zu physiologischen Keratinozyten (1:25) zeigt also die höchsten TEER-Werte, gefolgt von den Konzentrationen 1:17 und 1:10. Im Vergleich mit den TEER-Werten der OMÄ liegen diese Werte jedoch weit darunter: Beträgt der mittlere Ausgangswert der OMÄ an Tag 2 noch $103,87 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$,

Ergebnisse

so vergrößert sich dieser acht Tage später um den Faktor 11,8 auf einen Mittelwert von 1230,47 Ohm x cm². Dieser hohe Anstieg deutet auf eine Ausbildung der Diffusionsbarriere hin, die am Anfang des Versuches (von Tag 4 auf Tag 6) intensiv aufgebaut wurde. Bei allen vier Modellen ist am Ende (von Tag 8 auf Tag 10) ein Absinken des TEER-Wertes sichtbar.

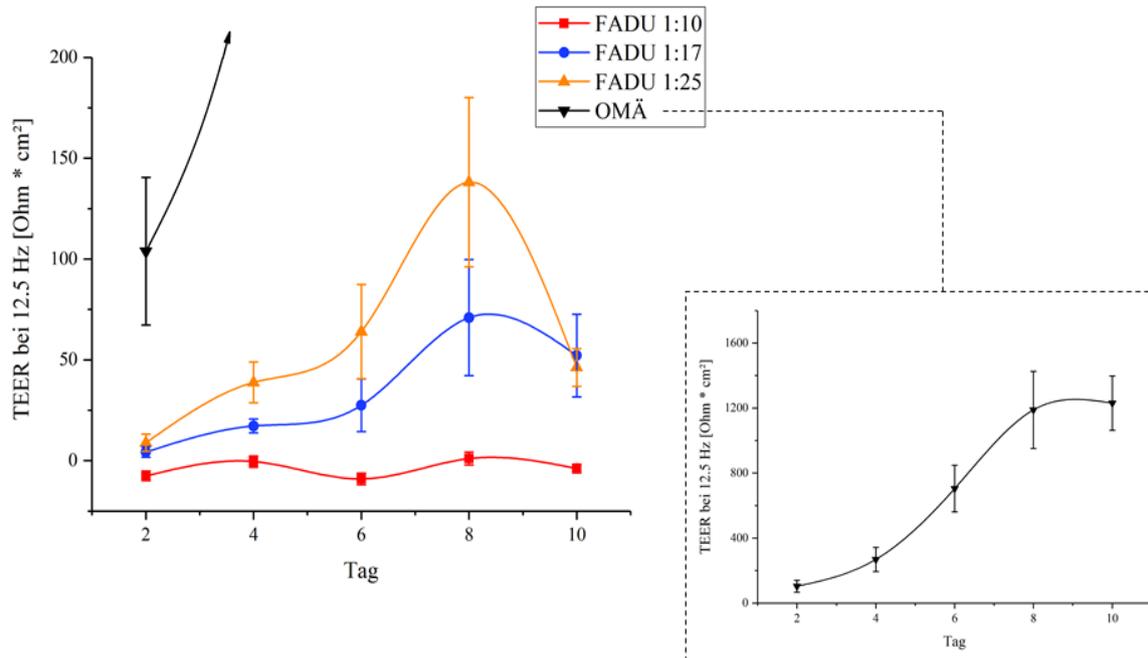


Abbildung 8:

Darstellung des transepithelialen Widerstands der FaDU-Tumormodelle und des oralen Mukosaäquivalents.

TEER-Werte bei 12,5 Hz an den Tagen 2, 4, 6, 8 und 10 nach der ALI-Phase von FaDu-Tumormodellen mit verschiedenen Konzentrationen von Tumorzellen zu gesunden Keratinozyten (1:10, 1:17, 1:25) und OMÄ. Werte nach Abzug des Leerwertes. n=6.

4.2.3 Markierung der FaDu-Tumorzellen mit Eisenoxid

Ein weiterer Teil dieser Arbeit war die Durchführung der Eisenoxidmarkierung (1000 µg / ml) über 48 Stunden von FaDu-Tumorzellen mit perimag[®] Partikeln, diese für den Tumormodellaufbau zu verwenden und anschließend histologisch eine Berliner-Blau-Färbung durchzuführen. Diese färbt mit Hilfe von Salzsäure das aufgenommene Eisenoxid im Zytosol blau dar, während Kernechtrot dafür sorgt, dass die Zellkerne rot erscheinen.

Ergebnisse

Zu Beginn wurden die Tumorzellen durch das Eisenoxid markiert (vgl. Kapitel 3.1.5) und Cytospots angefertigt, die dann mit Hilfe der Berliner-Blau-Färbung angefärbt wurden (vgl. Kapitel 3.2.3). Abbildung 9 stellt die Ergebnisse dieser Charakterisierung dar. Die FaDu-Tumorzellen in den Cytospots sind hinsichtlich der Aufnahme des Eisenoxids ins Zytosol sehr reaktionsfreudig. Dies hebt sich in der Färbung deutlich dunkelblau hervor (A). Lediglich die Zellkerne der markierten Zellen werden durch das Kernechtrot rot angefärbt. Nicht markierte Tumorzellen werden ausschließlich durch das Kernechtrot angefärbt. Dabei sind die Zellkerne intensiver gefärbt als das Zytosol (B). Ein weiterer Vorversuch war das Beobachten und Färben der zuvor markierten Tumorzellen an Tag 1, 7 und 10 direkt in den Wells der Zellkulturplatten, um ein etwaiges Abgeben des Eisenoxids der Zellen zu vermerken und zeitlich einzugrenzen (C-E). Die Bilder zeigen, dass an Tag 7 nur noch vereinzelt blau angefärbte Zellen vorliegen und sich an Tag 10 nach Markierung und weiterem Zellwachstum kein Eisenoxid mehr im Zytosol nachweisen lässt. Diese 10 Tage entsprechen der Dauer nach der ALI-Phase der Kultivierung von Tumorzellen in Kokultur auf der SISmuc. Des Weiteren sind keine abgekugelten avitalen Zellen nach der Eisenoxidmarkierung erkennbar, sodass eine Toxizität des Eisenoxids ausgeschlossen werden kann. Bei der Berliner-Blau-Färbung von Tumormodellen (Tumorzelle:gesunde Keratinozyten = 1:10) mit zuvor markierten FaDu-Zellen (F+G) sind ebenfalls nur noch vereinzelt blau gefärbte Zellen erkennbar (schwarze Pfeile). Dennoch ist die Invasion der FaDu-Tumorzellen in die Lamina propria deutlich erkennbar (gestrichelte Pfeile). Diese Tumormodelle gleichen in ihrer Architektur denen, die keine FeO markierten Tumorzellen beinhalten (H).

Ergebnisse

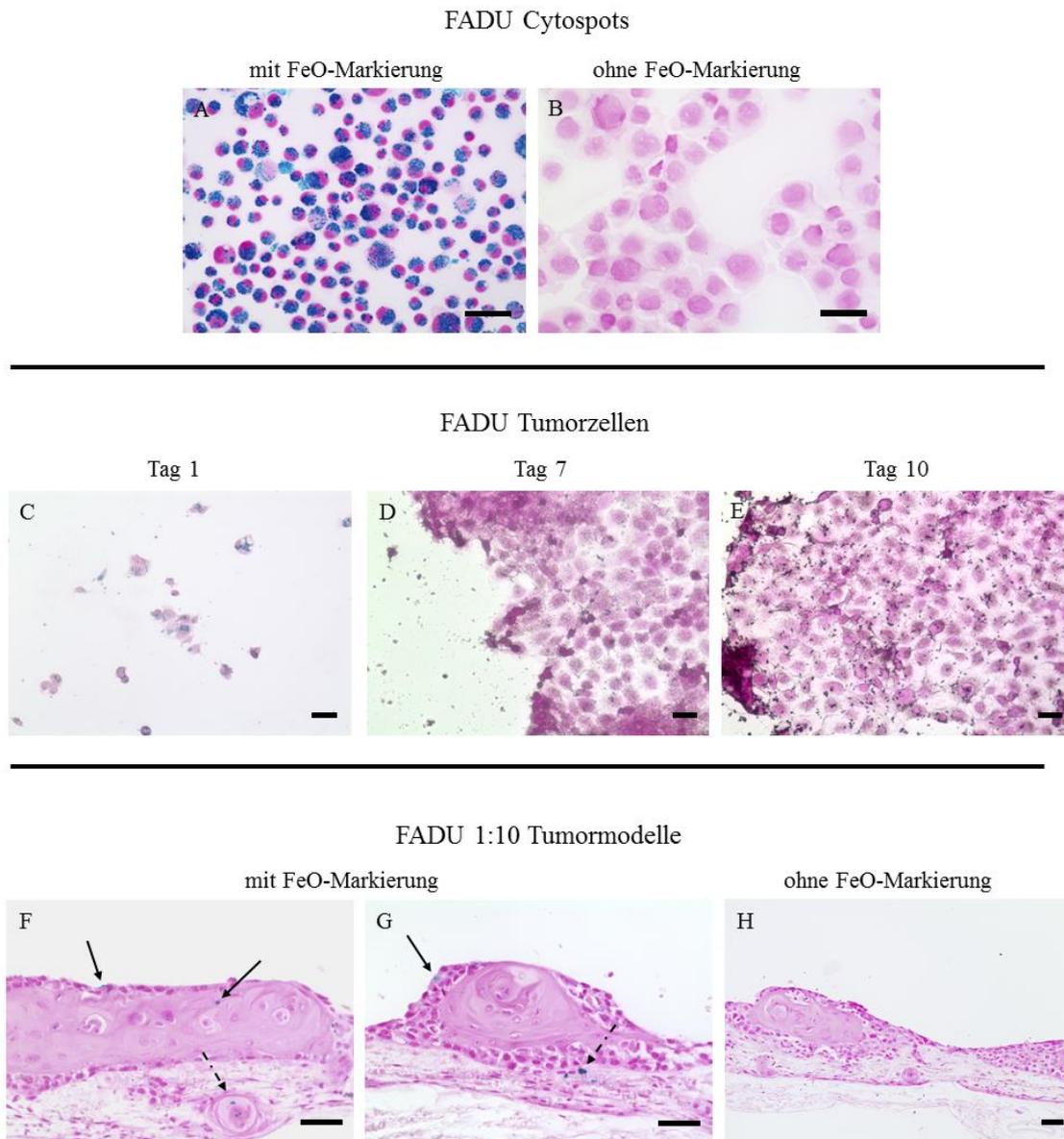


Abbildung 9:

Histologische Bilder von FaDu-Tumorzellen nach Durchführung der Berliner-Blau-Färbung mit vorheriger FeO-Markierung (1000 µg / ml) über 48 Stunden. A zeigt einen Cytospot mit FeO-Markierung. B zeigt einen Cytospot ohne FeO-Markierung. C-E zeigen den zeitlichen Verlauf von markierten FaDu an Tag 1, 7 und 10 mit direkter Färbung in Wells in 20-facher Vergrößerung. F+G zeigen FaDu-Tumormodelle (Konzentration FaDu-Tumorzellen zu gesunden Keratinozyten = 1:10) mit vorheriger FeO-Markierung in 40-facher Vergrößerung. H zeigt ein FaDu-Tumormodell ohne vorherige FeO-Markierung in 20-facher Vergrößerung. Größenbalken entsprechen 50 µm.

4.3 Tumormodelle mit Zellen der HLaC79-Tumorzelllinie und der HLaC79 Clone 1-Tumorzelllinie

Das Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit war eine Etablierung von *in vitro* hergestellten Plattenepithelkarzinomen mit den Tumorzelllinien HLaC79 und HLaC79 Clone 1. Letztere ist eine modifizierte Zelllinie der HLaC79-Zelllinie, die eine Resistenz gegenüber des Chemotherapeutikums Paclitaxel aufweist. Die Modellaufbauten mit HLaC79 und HLaC79 Clone 1 Tumorzellen entsprachen denen der FaDU-Tumormodelle, wobei am achten Tag nach Applikation der Fibroblasten jeweils ein Gemisch aus primär oralen Keratinozyten und HLaC79 oder HLaC79 Clone 1 in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen auf die Fibroblasten appliziert wurde. Diese Modelle wurden sowohl histologisch als auch immunhistologisch begutachtet und charakterisiert. Um die Entstehung einer Diffusionsbarriere zu dokumentieren, wurde der transepitheliale Widerstand mit Hilfe der Impedanzspektroskopie an mehreren Tagen gemessen. Für die Einstufung der Malignität der HLaC79-Tumormodelle wurden stets orale Mukosaäquivalente für einen Vergleich hinzugezogen. Ein zusätzlicher Versuch war der Aufbau eines weiteren HLaC79-Tumormodells, welches mit Hilfe eines Zylinders aus Polylactidfilament (PLA) aufgebaut wurde. Dabei war das Ziel eine direkte Grenzfläche zwischen physiologischer und kanzeröser Mundschleimhaut zu erschaffen.

4.3.1 Histologie der Tumormodelle mit Zellen der HLaC79- und der HLaC79 Clone 1-Zelllinie

Nach der Gesamtkultivierungsdauer von 17 Tagen durchliefen die Modelle mit den HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Tumorzellen eine H.E.-Färbung, um die Möglichkeit zu schaffen, die Morphologie und Architektur mit der eines OMÄ zu vergleichen. Das Konzentrationsverhältnis zwischen primär oralen Keratinozyten und Tumorzellen betrug hier 1:10. In Abbildung 10 fällt zunächst das unregelmäßige Erscheinungsbild der Epithelschichten auf. Obwohl das Stratum corneum zwar morphologische Gemeinsamkeiten mit dem des OMÄ aufweist und Keratinozyten mit abgeflachten Zellkernen beinhaltet, ist dieses hier deutlich dünner. In den tieferliegenden Schichten sind deutliche Atypien und Malignitätsmerkmale erkennbar. So gibt es im Stratum basale keine palisadenförmige Anordnung der basalen Keratinozyten, sondern eher eine unstrukturelle Anordnung mit unterschiedlichen Differenzierungsstadien, die sich bis in

Ergebnisse

das Stratum granulosum ausbreiten. Abbildung 10D zeigt ein amorphes und keratinozytenfreies Gewebe im Epithel (gestrichelter Pfeil), welches ein pathologisches Merkmal ist und auf eine Malignität hinweist. Des Weiteren ist eine pathologische Invasion der Keratinozyten in die Lamina propria erkennbar, die dort abgrenzbare Verhornungsknospen entstehen lassen und der Trägermatrix SISmuc aufsitzen (schwarze Pfeile). Im Gegensatz zu dem OMÄ treten hier sogenannte interzelluläre Brücken auf (schwarzer Kreis), die ebenfalls durch die Tumorzellen induziert wurden. Die Lamina propria, welche durch die Fibroblasten gebildet wird, weist die gleiche Schichtdicke und Struktur wie bei den OMÄ auf. Lediglich die unregelmäßig angeordneten Verhornungsknospen unterbrechen diese Architektur. Ein Unterschied hinsichtlich des Aufbaus und der Zellmorphologie ist zwischen den HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Tumormodellen histologisch nicht erkennbar. Aus diesem Grund wurden lediglich die HLaC79-Tumorzellen zur weiteren Charakterisierung herangezogen.

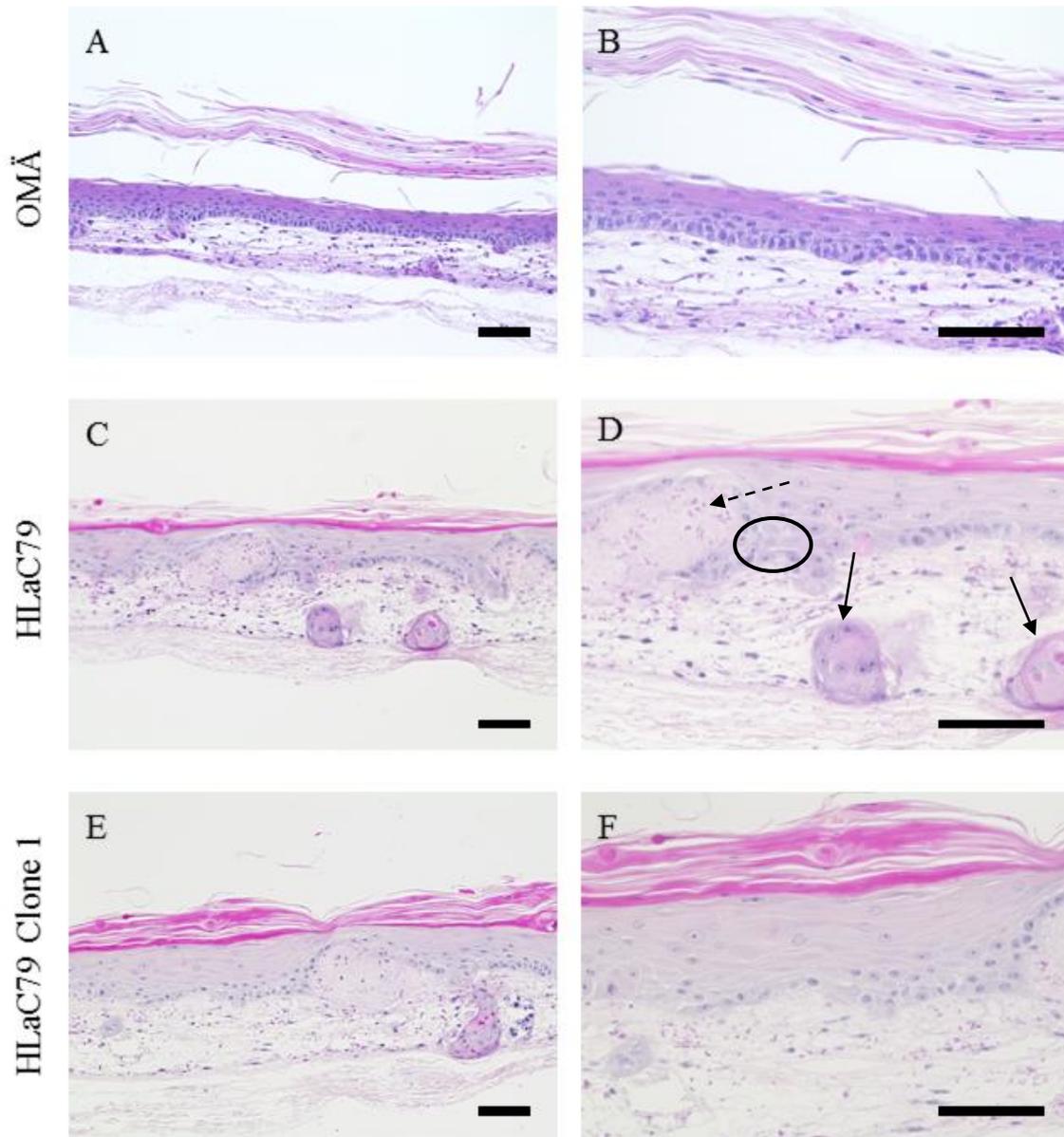


Abbildung 10: **Histologische Charakterisierung durch H.E.-Färbung von HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Tumormodellen und eines OMÄ.**
 Konzentrationsverhältnis primär oraler Keratinozyten und Tumorzellen entspricht 1:10. A+B zeigen ein OMÄ, C+D ein HLaC79-Tumormodell und E+F ein HLaC79 Clone 1-Tumormodell jeweils in 20-facher und 40-facher Vergrößerung. Schwarze Pfeile sind Verhornungsknospen, der gestrichelte Pfeil zeigt ein amorphes Gebiet und der Kreis zeigt interzelluläre Brücken. Größenbalken entsprechen 100 μm .

4.3.2 Histologie der Tumormodelle mit Zellen der HLaC79-Zelllinie in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen

Während Abbildung 10 HLaC79-Tumormodelle in nur einer Konzentration zeigt, stellt Abbildung 11 Tumormodelle mit verschiedenen Konzentrationsverhältnissen zwischen HLaC79-Tumorzellen und primär oralen Keratinozyten gegenüber. Die unterschiedlichen Konzentrationen lagen bei 1:10, 1:25 und 1:50. Nach der Gesamtkultivierungsdauer von 17 Tagen erfolgte ebenfalls die Anfertigung von histologischen Schnitten und die Durchführung einer H.E.-Färbung. Die Architektur und die Morphologie der 1:10 HLaC79-Tumormodelle wurde bereits detailliert in Kapitel 4.3.1 beschrieben. Deutlich erkennbar sind hier die zahlreichen interzellulären Brücken im Stratum basale, die Unterbrechung der Basalmembran durch das amorphe Gewebe in dem Epithel und die große Verhornungsknospe, die der SISmuc aufsitzt und für eine Invasion der HLaC79-Tumorzellen sprechen (A+B). Die Tumormodelle mit der weniger malignen Konzentration von 1:25 (C+D) zeigen diese Beobachtungen nicht. Besonders eine eindeutige Trennung der dermalen und epithelialen Komponente ist erkennbar. Durch das Fehlen der Verhornungsknospen ist histologisch von einer ausgebliebenen Invasion von Tumorzellen außerhalb des Epithels auszugehen. Die Dicke des Epithels ist hier mit der des OMÄ vergleichbar. Lediglich die basalen Keratinozyten weisen durch ihre Größenvarianz einen hohen Grad der Unordnung und Differenzierung auf. Bei den Tumormodellen mit dem Konzentrationsverhältnis 1:50 (E+F) können gewisse Parallelen zu den 1:25-Tumormodellen gezogen werden. Der Aufbau des Epithels bezüglich Architektur und Dicke ist auch hier mit dem des OMÄ vergleichbar und die oben genannten Malignitätskriterien in A+B fehlen ebenfalls. Die basalen Zellen im Stratum basale haben jedoch eine gleichmäßigere Anordnung als in den höher konzentrierten Tumormodellen und sind mit denen in dem OMÄ vergleichbar.

Ergebnisse

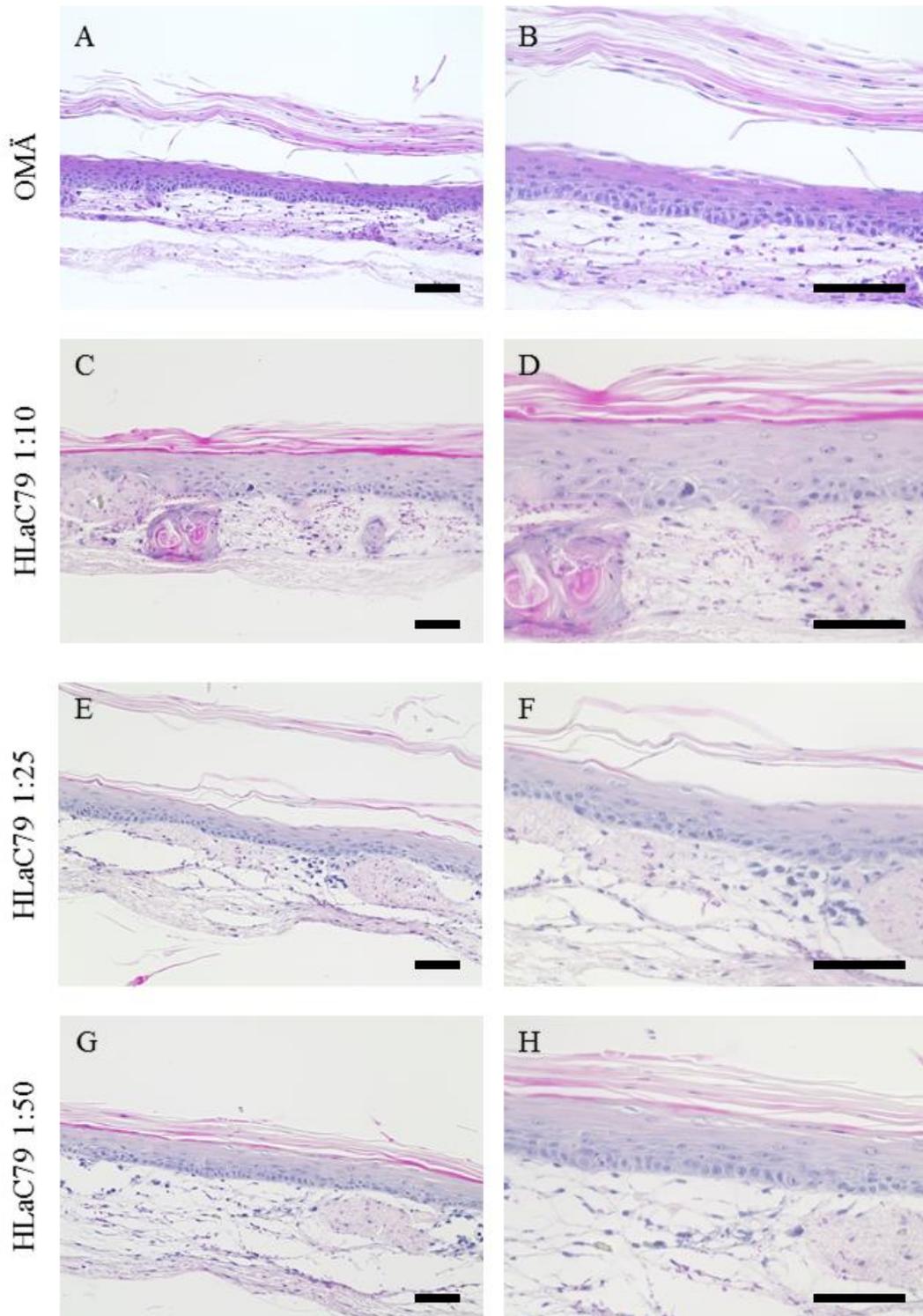


Abbildung 11:

Histologische Charakterisierung durch H.E.-Färbung eines oralen Mukosaäquivalents sowie drei Tumormodellen mit verschiedenen Konzentrationen zwischen primär oralen Keratinozyten und HLaC79-Tumorzellen. A+B zeigen ein OMA, C+D zeigen die Modelle bei einer Konzentration von 1:10, E+F bei 1:25 und G+H bei 1:50 jeweils in 20-facher und 40-facher Vergrößerung. Größenbalken entsprechen 100 µm.

4.3.3 Immunhistologie der Tumormodelle mit Zellen der HLaC79-Zelllinie

Um die *in vitro* aufgebauten physiologischen und kanzerösen Modelle auch auf immunhistologischer Basis zu charakterisieren und miteinander vergleichen zu können, fand ein HRP-basiertes Nachweissystem statt. Die speziell angefärbten Bereiche der Modelle stellen sich braun da, während die nur mit Hämatoxylin gefärbten Strukturen blau erschienen. Damit die Modelle in ihren einzelnen Strukturen und Bestandteilen charakterisiert und untersucht werden konnten, wurden folgende Marker verwendet: Cytokeratin 10 färbt suprabasale Zellen im Stratum corneum an, während Cytokeratin 14 ein Marker für basale Keratinozyten ist. Ki67 ist ein Proliferationsmarker und p53 ein Tumorsuppressorprotein. Mithilfe von Vimentin sollten die Fibroblasten in der Lamina propria und mit Kollagentyp IV die Basalmembran angefärbt werden.

Nach einer Gesamtkultivierungsdauer von 17 Tagen erfolgte nach der Paraffineinbettung und der Schnittherstellung die spezifische Markierung der Antigene mit Hilfe der oben genannten Antikörper und anschließender DAB-Färbung.

Abbildung 12 stellt die Schnitte des HLaC79-Tumormodells mit einer Konzentration von einer Tumorzelle auf 10 apathologische Keratinozyten und des OMÄ nach immunhistochemischer Färbung dar. Die epithelialen Strukturen wurden mit Hilfe der Epithelmarker Cytokeratin 10 und Cytokeratin 14 dargestellt. Abbildung 12A+B zeigen die erfolgreichen Färbungen nach Markierung mit Cytokeratin 10. Bei dem OMÄ färbt CK 10 hier die Keratinozyten im Stratum corneum an, wobei die obersten Schichten lediglich leicht braun gefärbt wurden, was auf eine Abscherung dieser Schichten bei der Herstellung des Paraffinschnittes und somit einen ungenügenden Halt auf dem Objektträger zurückzuführen ist. In dem histologischen Bild des Tumormodells zeigt sich eine vollständige Anfärbung des Stratum corneum, wobei eine Anfärbung der tiefergelegenen epithelialen Schichten ausbleibt. Die durch Zellinfiltration durch die Basalmembran hindurch entstandenen Verhornungsknospen in der Lamina propria werden lediglich durch die Blaufärbung des Hämatoxylins dargestellt. Im Gegensatz dazu sind diese nach Markierung mit Cytokeratin 14 in den Tumormodellen deutlich erkennbar (vgl. Abbildung 12D). Dieser Marker färbt auch bei dem OMÄ alle basalen Zellen, also diejenigen, die der Basalmembran aufsitzen (Stratum basale) und ebenfalls solche, die sich im Stratum spinosum befinden. Bei dem HLaC79-Tumormodell lassen sich dadurch die interzellulären Brücken zwischen den Zellen und die Varianz in Zellmorphologie und

Ergebnisse

Differenzierungsstadium charakterisieren. Bei den hier angefärbten Verhornungsknospen handelt es sich demnach um eine Zellinfiltration von basalen Zellen. Die Markierung mit dem Proliferationsmarker Ki67 ist in Abbildung 12E+F dargestellt. Eine Braunfärbung der oralen Keratinozyten im Stratum basale und zum Teil auch im Stratum spinosum in dem OMÄ wird hier verdeutlicht. Der Marker bleibt im Stratum granulosum, Stratum corneum und in der Lamina propria vollständig aus. In dem Tumormodell ist die intensive Braunfärbung der basalen Keratinozyten deutlich erkennbar. Auch das nächst oberflächlich gelegene Stratum spinosum weist markierte Zellen auf. Die Anfärbung verdeutlicht in dieser Abbildung die Größenvarianz der Keratinozyten, die schon in Abbildung 10 beschrieben worden ist. Die DAB-angefärbten Strukturen nach Markierung mit dem Tumorsuppressorgen p53 zeigt Abbildung 12G+H. Die topologische Anordnung der Marker Ki67 und p53 in dem OMÄ gleicht sich hinsichtlich der Lokalisation. In dem Tumormodell sind angefärbte Zellen vor allem im Stratum basale, aber auch im Stratum spinosum und in den Verhornungsknospen in der Lamina propria ersichtlich. Kollagen IV (vgl. Abbildung 12I+J) färbt in dem OMÄ sowohl die gesamte Lamina propria als auch einen Teil des epithelialen Stratum basale und Stratum spinosum an, wobei jedoch durch den intensiven Brauntön deutlich die dazwischenliegende Basalmembran zu erkennen ist. In dem HLaC79-Tumormodell färbt Kollagen IV ebenfalls die komplette Lamina propria an, wobei auch hier vor allem die intensiver gefärbte Basalmembran deutlich erkennbar ist. Somit fehlt in den Epithelschichten eine Braunfärbung, da diese lediglich durch das Hämatoxylin blau gefärbt worden sind. In Abbildung 12K+L wurde der Marker Vimentin zur Darstellung der Lamina propria verwendet. In dem OMÄ wird durch den Marker Vimentin unverkennbar die Lamina propria mit ihren gleichmäßig angesiedelten Fibroblasten dargestellt. Das Fehlen der primären oralen Fibroblasten im Epithel und in der Trägermatrix SISmuc wird hierdurch bestätigt. In dem Tumormodell ist ebenfalls eine verstärkte Braunfärbung erkennbar, die vor allem an den Grenzflächen zum Epithel nach oben und zur SISmuc nach unten lokalisiert ist. Des Weiteren sind Keratinozyten in den Epithelschichten und Verhornungsknospen zusätzlich braun angefärbt.

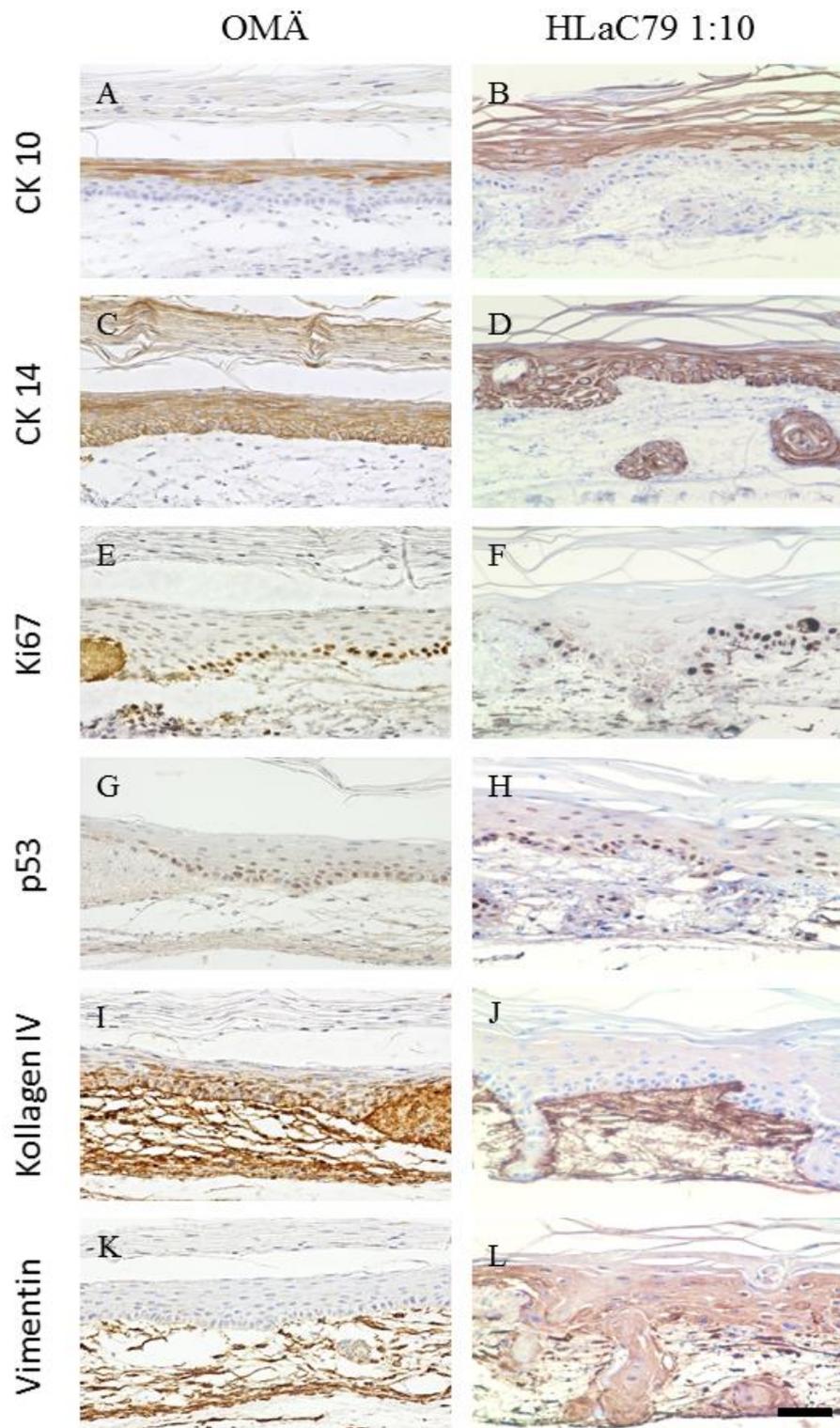


Abbildung 12:

Immunhistochemische Charakterisierung eines HLaC79-Tumormodells und eines oralen Mukosaäquivalents. Folgende Marker wurden verwendet: CK 10 (A+B), CK 14 (C+D), Ki67 (E+F), p53 (G+H), Kollagen IV (I+J) und Vimentin (K+L). Alle Aufnahmen bei 40-facher Vergrößerung. Größenbalken entspricht 50 µm.

4.3.4 Transepithelialer Widerstand der HLaC79-Tumormodelle

Um einen Unterschied in der Ausbildung von Diffusionsbarrieren zwischen den oralen Mukosaäquivalenten und den HLaC79-Tumormodellen zu erfassen, wurde auch bei diesen Tumormodellen der TEER-Wert mit Hilfe der Impedanzspektroskopie an insgesamt 5 Tagen gemessen und ausgewertet. Die Konzentration von Tumorzellen zu gesunden Keratinozyten betrug hier 1:10.

Abbildung 13 zeigt den zeitlichen Verlauf der TEER-Werte der Tumormodelle und der OMÄ abzüglich der Leerwerte. Die jeweilige Modellanzahl betrug hier $n=16$. Der zeitliche Verlauf des transepithelialen Widerstandes der OMÄ wurde bereits in Kapitel 4.2.2 beschrieben. Der Mittelwert an Tag 2 nach der ALI-Phase liegt bei den Tumormodellen mit $20 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$ deutlich niedriger als der der OMÄ. Obwohl der Wert ebenfalls einen kontinuierlichen Anstieg aufweist, ist auch hier ein stärkerer Anstieg zwischen Tag 4 und Tag 6 zu sehen als zwischen Tag 8 und Tag 10. Insgesamt steigt der TEER-Wert an Tag 10 um den Faktor 26,8 auf $537,09 \text{ Ohm} \times \text{cm}^2$ und lässt ebenfalls auf eine Ausbildung der Diffusionsbarriere schließen.

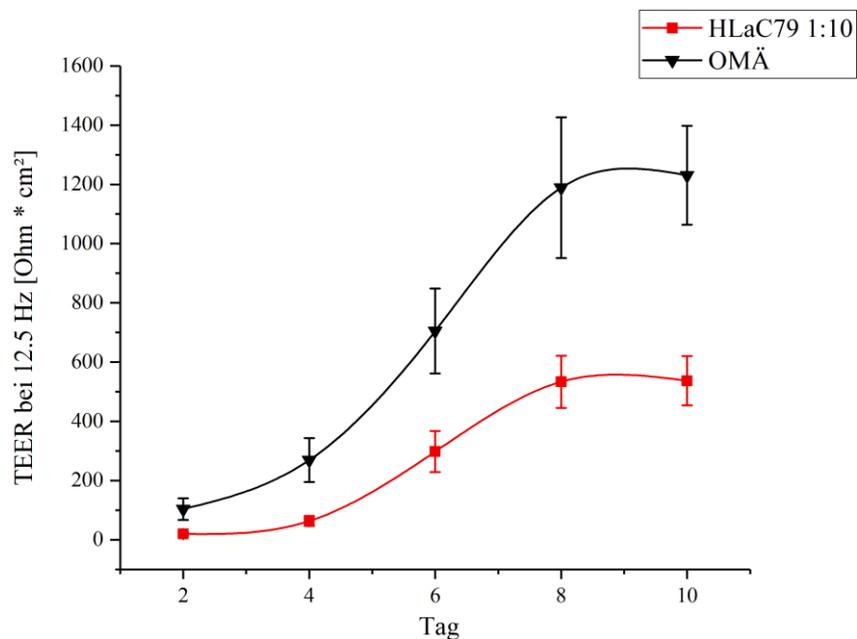


Abbildung 13:

Darstellung des transepithelialen Widerstands des HLaC79-Tumormodells und des oralen Mukosaäquivalents.

TEER-Werte bei 12.5 Hz an den Tagen 2, 4, 6, 8 und 10 nach der ALI-Phase von HLaC79-Tumormodellen mit einem Konzentrationsverhältnis von 1:10 und OMÄ. Werte nach Abzug des Leerwertes. $n=16$.

4.3.5 Markierung der HLaC79-Tumorzellen mit Eisenoxid

Parallel zu den FaDu-Tumorzellen wurden auch die HLaC79-Tumorzellen mit Eisenoxid markiert, indem perimag[®] Partikeln in einer Konzentration von 1000 µg/ml für 48 Stunden der zweidimensionalen Kultivierung hinzugegeben wurden. Das Ziel dieses Versuches war eine Charakterisierung der möglichen Eisenoxidmarkierung der HLaC79-Zellen mit der Berliner-Blau-Färbung. Nach der Entfernung des Eisenoxids wurden anfangs Cytospots der HLaC79-Zellen angefertigt (vgl. Abbildung 14A). Das histologische Bild zeigt, dass lediglich vereinzelte HLaC79 Zellen das Eisenoxid zum Teil aufgenommen haben, da eine Blaufärbung des Zytoplasmas aller Zellen hier ausbleibt. Die Mehrheit dieser Zellen zeigen eine komplette Rotfärbung des Zytoplasmas durch das Kernechtrot. Die Tumorzellen, die das Eisenoxid aufnehmen konnten, werden nur durch eine leichte blaue Färbung dargestellt. Eine intensive Färbung wie der der markierten FaDu-Tumorzellen bleibt hier gänzlich aus (vgl. Abbildung 9). Nicht markierte HLaC79-Tumorzellen werden ausschließlich durch das Kernechtrot angefärbt und erscheinen rot (vgl. Abbildung 14 B). Um ein etwaiges verfrühtes Abgeben von Eisenoxid der HLaC79-Zellen zu vermerken, wurden diese ebenfalls direkt in Wells von Zellkulturplatten für 48 Stunden markiert und an Tag 1, 7 und 10 durch die Berliner-Blau-Färbung dargestellt (C-E). Während an Tag 1 noch ein paar wenige HLaC79-Zellen blau erscheinen, sind solche an Tag 7 kaum mehr auffindbar und fehlen an Tag 10 gänzlich. Eine Toxizität des Eisenoxids kann hier ebenso ausgeschlossen werden, da keine abgekugelten avitalen Zellen beobachtet wurden. Da sich die HLaC79-Tumorzellen 10 Tage in Kokultivierung mit primär oralen Keratinozyten nach der ALI-Phase auf der SISmuc befinden, die vorliegende Abbildung aber veranschaulicht, dass an Tag 10 kein Eisenoxid mehr nachgewiesen werden konnte, wurde an dieser Stelle auf eine Markierung mit anschließender Berliner-Blau-Färbung von dreidimensionalen HLaC79-Tumormodellen verzichtet.

Ergebnisse

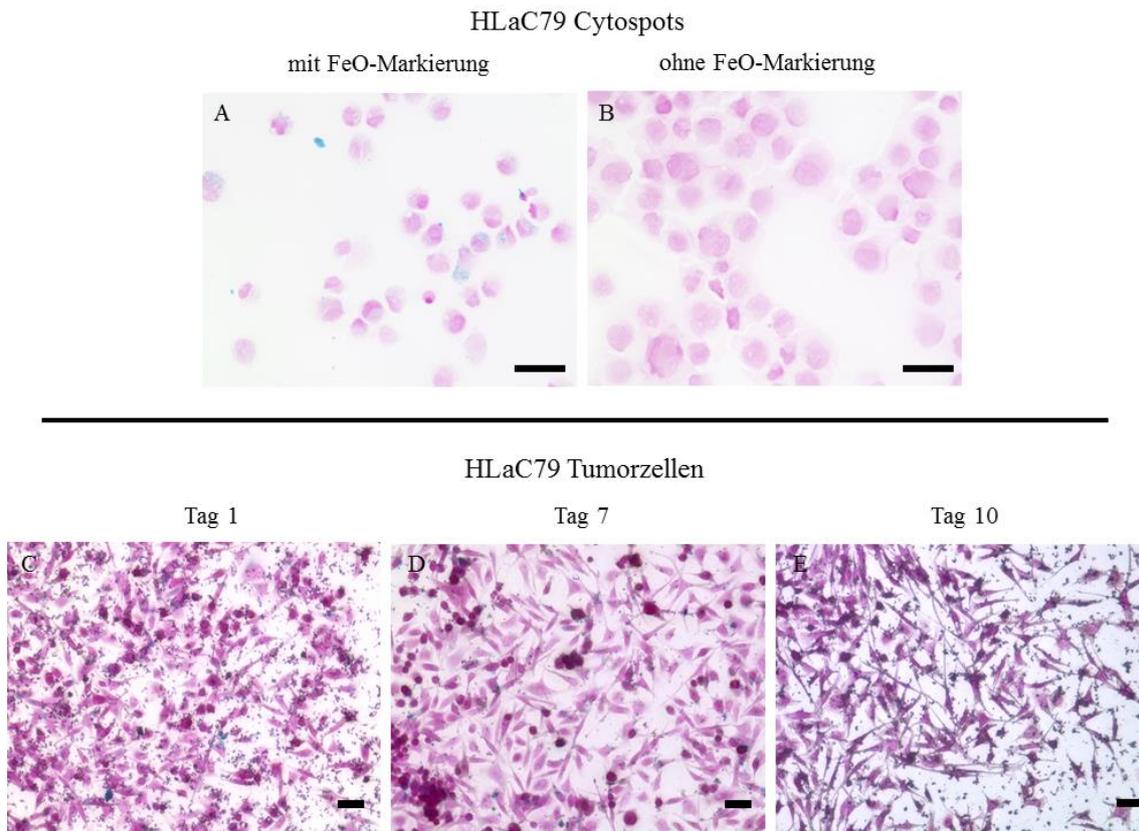


Abbildung 14: **Histologische Bilder von HLaC79-Tumorzellen nach Durchführung der Berliner-Blau-Färbung mit vorheriger FeO-Markierung (1000 µg / ml) über 48 Stunden.** A zeigt einen Cytospot mit FeO-Markierung in 40-facher Vergrößerung. B zeigt einen Cytospot ohne FeO-Markierung in 40-facher Vergrößerung. C-E zeigen den zeitlichen Verlauf von markierten HLaC79 an Tag 1, 7 und 10 mit direkter Färbung in Wells in 20-facher Vergrößerung. Größenbalken entsprechen 50 µm.

4.3.6 Histologie des HLaC79-Tumormodells nach Aufbau mit einem Zylinder aus PLA-Filament

Da alle bisher gezeigten Schnitte der dreidimensionalen Tumormodelle eine Veränderung der Morphologie auf der gesamten Schnittfläche aufweisen, war es ein weiterer Versuch, ein Modell herzustellen, das gesunde orale Mundschleimhaut *in vitro* nachbildet, welche direkt an eine kanzeröse Dysplasie angrenzt. Hierfür wurden eigens angefertigte Zylinder aus Polylactidfilament (PLA-Filament) gedruckt, die ein separates Pipettieren von HLaC79 Tumorzellen und apathologischen oralen Keratinozyten ermöglichten vgl. Kapitel 3.1.6.5). Nach einer Kultivierungsdauer von 17 Tagen wurden auch diese

Ergebnisse

Tumormodelle mit einer H.E.-Färbung dargestellt. In Abbildung 15 ist ein Schnitt eines solchen Modells sichtbar, bei dem die unterschiedlichen Morphologien auf der Schnittlänge erkennbar sind (A). Bei einer Vergrößerung der entsprechenden Abschnitte ist zum einen die Ausbildung einer regelhaften Mundschleimhaut erkennbar: Die undifferenzierten Keratinozyten sitzen der Basalmembran auf und differenzieren sich auf ihrem Weg nach superfizial, die Keratinozyten mit abgeflachten Zellkernen befinden sich im Stratum corneum, welches eine ordnungsgemäße Schichtdicke aufweist (B). Abbildung 15C zeigt die erschaffene Grenzfläche zwischen gesunder oraler Schleimhaut und dem Tumor, die lediglich die von den oralen Fibroblasten ausgebildete Lamina propria veranschaulicht. Es fehlen jegliche orale Keratinozyten oder HLaC79-Tumorzellen, sodass eine seitliche Zellinvasion unwahrscheinlich ist. Dieser Bereich entspricht der Wandstärke des Zylinders, der dort während des Modellaufbaus für 2 Stunden der SISmuc auflag, um ein verfrühtes Vermischen der Zellen zu verhindern. Die in das Zylinderinnere applizierten HLaC79-Tumorzellen zeigen sich in der Histologie in Abbildung 15D: Die Kerne mit unterschiedlicher Größenvarianz der Tumorzellen stellen sich als dunkelblau dar und bilden einen scheinbar exophytisch wachsenden Tumor mit ungleichmäßiger Zellanordnung, der auch in die basal liegende Lamina propria infiltriert. Außerdem ist von einer leichten Verhornung auszugehen (siehe schwarzer Pfeil).

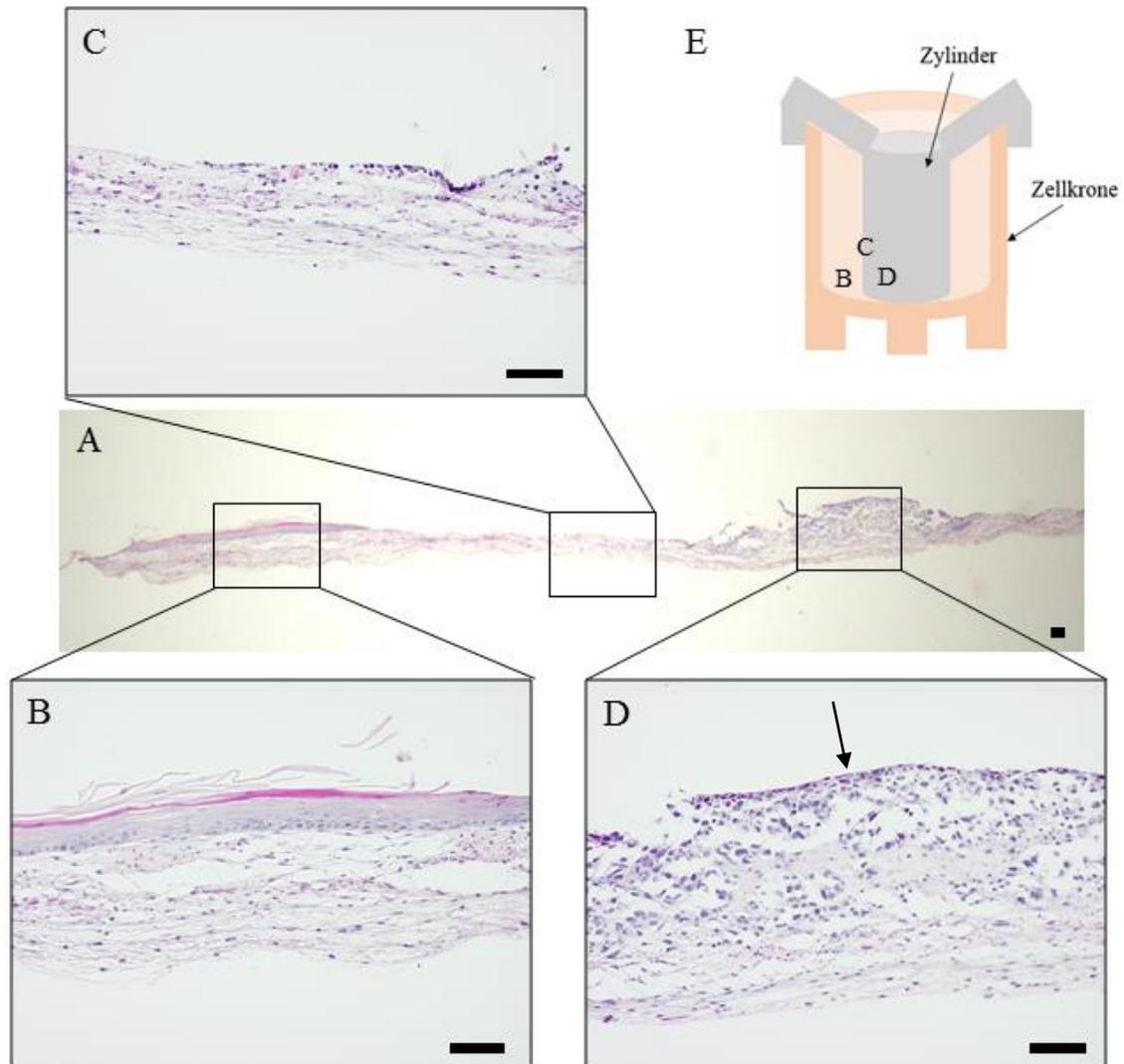


Abbildung 15: **Histologische Charakterisierung durch H.E.-Färbung eines Tumormodells welches mit Hilfe eines PLA-Zylinders aufgebaut wurde.** A zeigt die gesamte Länge eines Schnittes in 2-facher Vergrößerung. B, C und D zeigen die jeweiligen Ausschnitte in 20-facher Vergrößerung. E dient zur Veranschaulichung der Ausschnitte. Größenbalken entsprechen 500 μm .

4.4 Behandlung der HLaC79-Tumorzellen und der HLaC79-Tumormodelle mit den Medikamenten Salinomycin und Paclitaxel

Nach mehrfachem Aufbau von HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Tumormodellen war ein weiterer Teil der Arbeit die nach der Kultivierungsdauer anschließende Behandlung mit zwei Medikamenten. Dafür wurde zum einen Paclitaxel eingesetzt. Paclitaxel ist ein

Zytostatikum, welches seine Anwendung in der Behandlung von oralen Plattenepithelkarzinomen findet. Dabei greift es als Spindelgift in die Mitose ein und unterdrückt somit die Tumorzellproliferation, sodass es zu einem Teilungsstopp der Tumorzellen kommen sollte. Da die Tumorzellen der HLaC79 Clone 1-Zelllinie als paclitaxelresistent gelten, war es hier sowohl das Ziel, diese Resistenz nachzuweisen, als auch ein weiteres Medikament, Salinomycin, anzuwenden. Dies ist ein neuartiges Polyether-Antibiotikum und führt die Zelle durch eine induzierte Stoffwechsellage in die Apoptose.

Zum einen wurden beide Medikamente in zweidimensionaler Kultivierung von HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Zellen angewandt. Im Anschluss daran wurden zwei Testverfahren zur Bestimmung der Zellviabilität durchgeführt. Des Weiteren wurde Paclitaxel in verschiedenen Konzentrationen in allen Versuchen für 24 Stunden dem Medium außerhalb der Zellkronen mit den HLaC79 Tumormodellen hinzugefügt. Danach wurden verschiedene Tests zur Zellviabilität und zur Diffusionsbarriere durchgeführt. Ferner wurden die Modelle anhand einer H.E.-Färbung histologisch charakterisiert und miteinander verglichen.

4.4.1 Behandlung von HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Tumorzellen mit Salinomycin in zweidimensionaler Kultivierung

In den folgenden zwei Kapiteln werden der MTT-Test und die Lebend-Tot-Färbung mit FD/PI von HLaC79-Tumorzellen in zweidimensionaler Kultivierung nach Behandlung mit Salinomycin für 24 Stunden beschrieben.

4.4.1.1 MTT-Test zur Zellviabilitätsbestimmung nach Behandlung in zweidimensionaler Kultivierung

Der MTT-Test dient zur Bestimmung der Zellviabilität, indem das gelbe, wasserlösliche 3-(4,5-Dimethyl-2-Thiazolyl)-2,5-Diphenyl-2H-Tetrazoliumbromid von vitalen Zellen aufgenommen wird und in das violette, wasserunlösliche (E,Z)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan umschlägt. 2-Isopropanol löst den Farbstoff aus den Zellen, nimmt die violette Farbe an und die Lichtabsorption wird bei 570 nm gemessen. Das Ergebnis wird in der optischen Dichte (Extinktion) angezeigt, welches als Maß für die Transmission von Licht durch ein Medium dient.

Abbildung 16 stellt die Auswertung des MTT-Testes nach 24-stündiger Behandlung mit

Ergebnisse

Salinomycin bei Keratinozyten, HLaC79 und HLaC79 Clone 1 in zweidimensionaler Kultivierung dar. Von jeder Zellart wurden jeweils drei Kultivierungen für die Testungen herangezogen (n=3). Die getesteten Konzentrationen des Salinomycins lagen bei 1 μM , 5 μM und 10 μM . Deutlich erkennbar ist hier das Herabsinken der Viabilität mit steigender Salinomycinkonzentration sowohl bei den Keratinozyten und den HLaC79-Tumorzellen als auch bei den HLaC79 Clone 1-Tumorzellen. Bei einer Konzentration von 1 μM Salinomycin beträgt der Mittelwert der Keratinozytenviabilität 78 %, der der HLaC79 93 % und der des HLaC79 Clone 1 101 % und weist somit vor allem bei den Tumorzellen keine signifikante toxische Wirkungsweise auf.

Eine Erhöhung der Konzentration auf 5 μM lässt sprunghaft die Viabilität der HLaC79 um 70 % und der HLaC79 Clone 1 um 71 % sinken und hat schlussfolgernd eine große toxische Wirkung auf die Tumorzellen, während viele gesunde orale Keratinozyten resistent gegenüber dieser Salinomycinkonzentration sind. Die mittlere Zellviabilität der Keratinozyten liegt hier bei 64 %.

Bei 10 μM Salinomycin, die höchste Konzentration in dieser Versuchsreihe, ist zwar auf der einen Seite ein weiterer Viabilitätsverlust der Tumorzellen erkennbar, jedoch haben andererseits nur 53 % der Keratinozyten diese Behandlung überlebt.

Ergebnisse

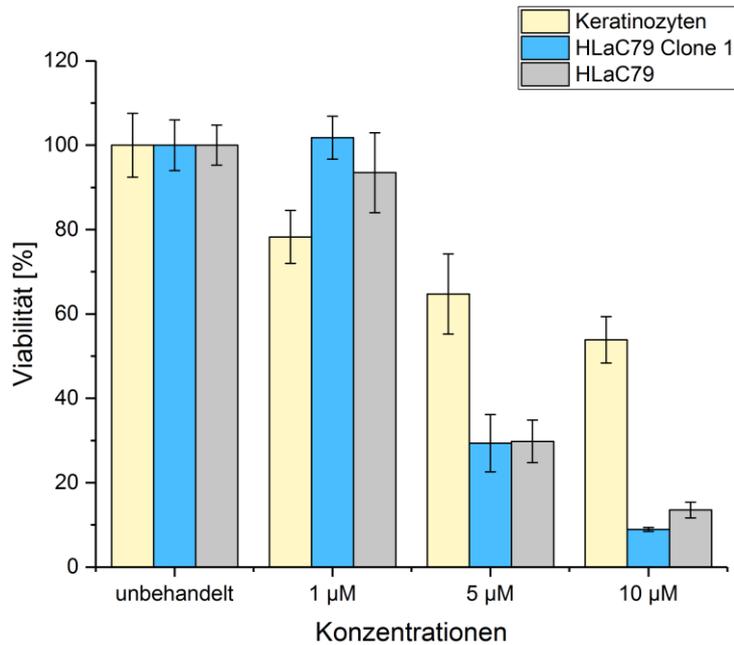


Abbildung 16: **MTT-Test für die Zellviabilität bei vorheriger 24-stündiger Salinomycin-Behandlung mit Konzentrationen von 1 µM, 5 µM und 10 µM in zweidimensionaler Kultivierung.** Getestete Zellen: Keratinozyten, HLaC79 und HLaC79 Clone 1. Die optische Dichte der unbehandelten Zellen wurde einer Viabilität von 100 % gleichgesetzt. n=3.

4.4.1.2 Lebend-Tot-Färbung mit FDA/PI nach Behandlung in zweidimensionaler Kultivierung

Mit Hilfe der Lebend-Tot-Färbung mit FDA und PI können unter einem Fluoreszenzmikroskop lebende Zellen von toten Zellen unterschieden werden. Vitale Zellen nehmen das nicht fluoreszierende Fluoresceindiacetat auf und wandeln es in das grün leuchtende Fluorescein um, während die Enzyme von avitalen Zellen diese Reaktion nicht mehr katalysieren können und die Zellen somit rot leuchten.

Gefärbt wurden Objektträger mit sowohl gesunden oralen Keratinozyten als auch mit HLaC79 und HLaC79 Clone 1 Tumorzellen je einmal unbehandelt und einmal nach 24-stündiger Behandlung mit 5 µM Salinomycin. In Abbildung 17 ist die Gegenüberstellung der Ergebnisse sichtbar. Die einzelnen Bilder weisen eine deutliche Varianz in der Zellzahl auf, da die Färbung direkt auf Chamberslides erfolgte und durch das mehrmalige Waschen mit PBS⁻ ein Abwaschen der Zellen nicht ausreichend verhindern werden konnte. Bilder A-C zeigen die unbehandelten Zellen, während D-F die mit Salinomycin behandelten Zellen darstellt. Weiterhin sind auf den Bildern deutlich

Ergebnisse

die Zellmorphologien der einzelnen Zelltypen in zweidimensionaler Kultivierung erkennbar: Gesunde orale Keratinozyten weisen eine pflastersteinartige Ansammlung auf, während die Zellen der beiden Tumorzelllinien eher stäbchenförmig sind. Des Weiteren zeigt sich die gewünschte nicht toxische Wirkung von Salinomycin auf die Keratinozyten, da diese stark grün leuchten (A). Rot leuchtende und somit avitale Zellen treten bei den beiden Tumorzelllinien HLaC79 (E) und HLaC79 Clone 1 (F) auf und verdeutlichen die Toxizität des Salinomycins.

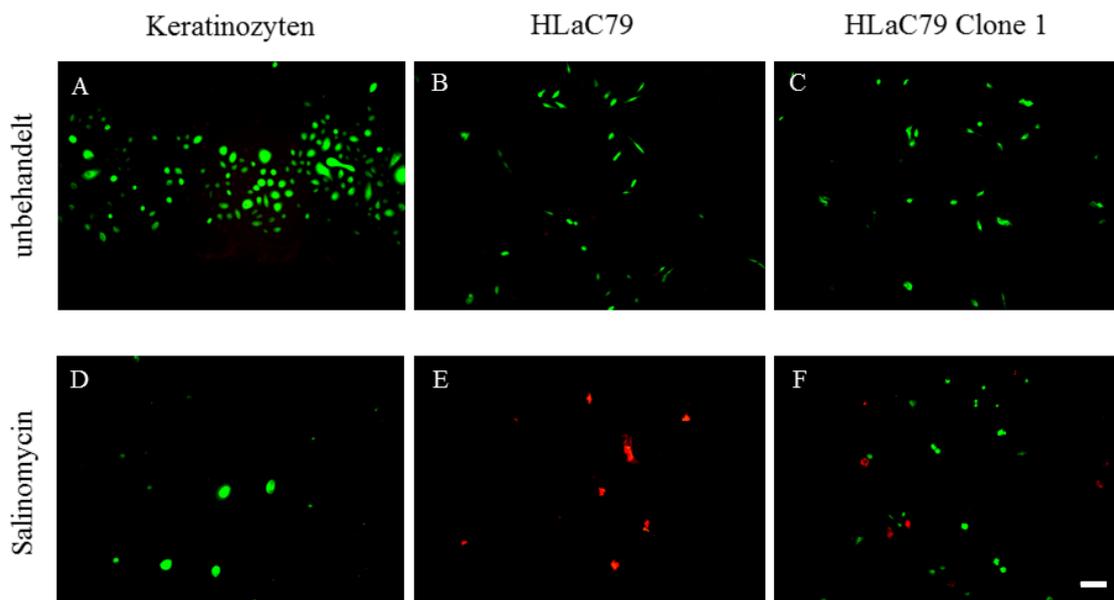


Abbildung 17: **Lebend-Tot-Färbung von primär oralen Keratinozyten, HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Tumorzellen nach 24-stündiger Behandlung mit 5 μ M Salinomycin in zweidimensionaler Kultivierung.** A-C zeigen unbehandelte Keratinozyten und Tumorzellen, D-F zeigen behandelte Keratinozyten und Tumorzellen mit Salinomycin. Alle Bilder in 10-facher Vergrößerung. Größenbalken entspricht 100 μ m.

4.4.2 Behandlung von HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Tumorzellen mit Paclitaxel in zweidimensionaler Kultivierung

In den folgenden zwei Kapiteln werden der MTT-Test und die Lebend-Tot-Färbung mit FD/PI von HLaC79-Tumorzellen in zweidimensionaler Kultivierung nach Behandlung mit Paclitaxel für 24 Stunden beschrieben.

4.4.2.1 MTT-Test zur Zellviabilitätsbestimmung nach Behandlung in zweidimensionaler Kultivierung

Das Ziel des Versuches war es, eine geeignete Konzentration des Medikaments Paclitaxel zu finden, die in den getesteten Tumorzellen der Tumorzelllinie HLaC79 und der paclitaxelresistenten Tumorzelllinie HLaC79 Clone 1 ein signifikantes Herabsinken der Viabilität zeigt, aber auf die primär humanen apathogenen Keratinozyten nicht toxisch wirkt. Dies hat den Grund, dass die Tumormodelle ebenfalls mit gesunden Keratinozyten aufgebaut wurden und die Medikamente lediglich toxisch auf die Tumorzellen wirken sollen. Des Weiteren war es die Absicht, die Resistenz der HLaC79 Clone 1-Zellen gegenüber Paclitaxel zu beweisen und graphisch darzustellen.

Abbildung 18 zeigt die Auswertung des MTT-Testes nach 24-stündiger Behandlung mit Paclitaxel in verschiedenen Konzentrationen bei Keratinozyten, HLaC79 und HLaC79 Clone 1 in zweidimensionaler Kultivierung, bei der jeweils drei Kultivierungen für die Testungen herangezogen wurden ($n=3$). Dabei wurde die optische Dichte der unbehandelten Zellen mit einer Viabilität von 100 % gleichgesetzt. Deutlich zu erkennen ist ein stetiges Herabsinken der Viabilität bei den Keratinozyten und den HLaC79-Tumorzellen. Während der Mittelwert der Keratinozytenviabilität bei einer Paclitaxelkonzentration von 1 nM noch bei 88 % liegt, zeigt dieser bei Behandlung mit 5 nM nur noch 82 % und bei einer Konzentration von 10 nM lediglich 75 % Zellviabilität. Größere Unterschiede gibt es bei den HLaC79-Zellen, die bei einer Paclitaxelkonzentration von 10 nM bloß eine Viabilität von 26 % aufweisen. Bei den paclitaxelresistenten HLaC79 Clone 1-Tumorzellen ist selbst bei der höchsten Paclitaxelkonzentration kein ausschlaggebendes Sinken der Viabilität erkennbar: Diese übertrifft sogar bei den Konzentrationen von 1 nM und 5 nM die der unbehandelten Zellen und weist bei 10 nM einen Mittelwert von 82 % auf.

Ergebnisse

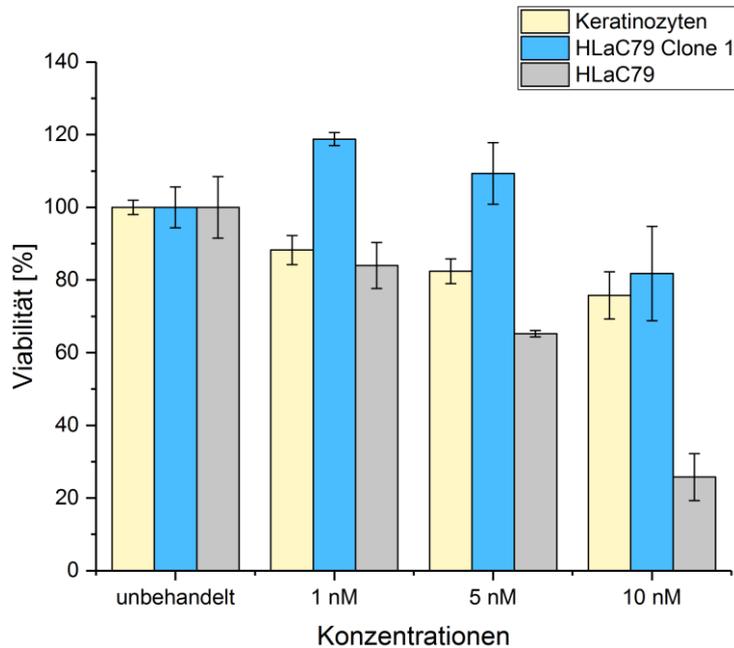


Abbildung 18: **MTT-Test für die Zellviabilität bei vorheriger 24-stündiger Paclitaxel-Behandlung mit Konzentrationen von 1 nM, 5 nM und 10 nM in zweidimensionaler Kultivierung.** Getestete Zellen: Keratinozyten, HLaC79 und HLaC79 Clone 1. Die optische Dichte der unbehandelten Zellen wurde einer Viabilität von 100 % gleichgesetzt. n=3.

4.4.2.2 Lebend-Tot-Färbung mit FDA/PI nach Behandlung in zweidimensionaler Kultivierung

Auch für diesen Test wurden Objektträger mit primär oralen Keratinozyten, HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Tumorzellen je einmal unbehandelt und einmal nach Behandlung mit 10 nM Paclitaxel gefärbt. Abbildung 19 stellt die Ergebnisse tabellarisch gegenüber. Rot leuchtende und somit avitale Zellen treten bei den HLaC79-Tumorzellen auf, die mit Paclitaxel behandelt worden sind. Die Behandlung der HLaC79 Clone 1-Zellen mit Paclitaxel zeigt eine nichttoxische Wirkung auf die Zellen und bestätigt damit die Resistenz gegenüber dieses Medikaments, da lediglich grün leuchtende und somit vitale Zellen erkennbar sind. Eine Behandlung von Keratinozyten mit Paclitaxel zeigt keinerlei zelltoxischen Auswirkungen.

Ergebnisse

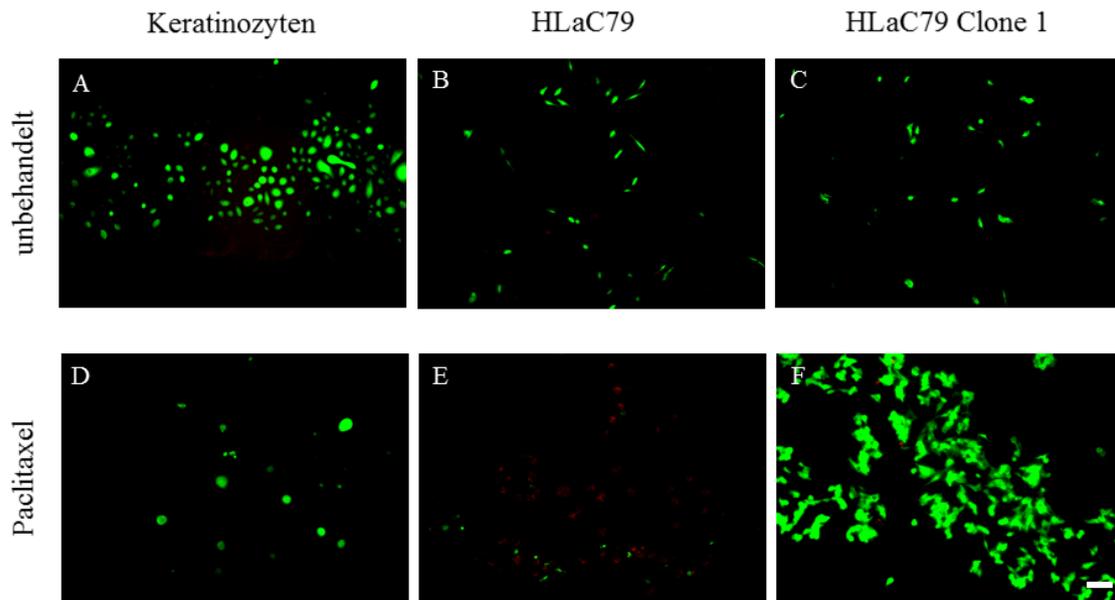


Abbildung 19: **Lebend-Tot-Färbung von primär oralen Keratinozyten, HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Tumorzellen nach 24-stündiger Behandlung mit 10 nM Paclitaxel in zweidimensionaler Kultivierung.** A-C zeigen unbehandelte Keratinozyten und Tumorzellen, D-F zeigen behandelte Keratinozyten und Tumorzellen mit Paclitaxel. Alle Bilder in 10-facher Vergrößerung. Größenbalken entspricht 100 μm .

4.4.3 Behandlung von HLaC79-Tumormodellen mit Paclitaxel in dreidimensionaler Kultivierung

Im Anschluss der Testverfahren in zweidimensionaler Kultivierung erfolgte die Behandlung von Tumormodellen in dreidimensionaler Kultivierung. Hierfür wurden lediglich die HLaC79-Tumormodelle erneut herangezogen, da die folgenden Ergebnisse keine Auswirkungen des Paclitaxels auf HLaC79-Tumormodelle präsentierten. Ebenso bewiesen die Testergebnisse in zweidimensionaler Kultivierung bereits die Paclitaxelresistenz von HLaC79 Clone 1 Tumorzellen (vgl. Kapitel 4.4.2), sodass auf eine Behandlung dieser Tumormodelle in dreidimensionaler Kultivierung verzichtet wurde.

Es erfolgte eine 24-stündige Behandlung mit Paclitaxel. Die aufsteigende Paclitaxelreihe umfasste Konzentrationen von 10 nM, 100 nM, 500 nM und 1000 nM Paclitaxel, wobei es sich hier um deutlich höhere Konzentrationen handelt als bei der Behandlung in zweidimensionaler Kultivierung. Ein Grund hierfür ist die Annahme, dass das Medikament nach Verabreichung in das Medium von basal durch die SISmuc und einen starken Zellverband diffundieren muss, um an den Wirkungsort, den Tumorzellen, zu gelangen. Im Anschluss an die Behandlung erfolgte eine histologische Charakterisierung durch H.E.-Färbung der Tumormodelle sowie eine Bestimmung der Zellviabilität mit Hilfe des MTT-Tests. Des Weiteren wurde der transepitheliale Widerstand der HLaC79-Tumormodelle vor und nach Behandlung mit Paclitaxel bestimmt, um Veränderungen der Diffusionsbarriere zu registrieren.

4.4.3.1 Histologie der HLaC79-Tumormodelle nach Behandlung

Um Auswirkungen der Behandlung mit Paclitaxel auch histologisch charakterisieren und auswerten zu können, wurden von den HLaC79-Tumormodellen nach einer Gesamtkultivierungsdauer von 17 Tagen und anschließender 24-stündiger Behandlung standardmäßig Paraffinschnitte angefertigt, die dann einer H.E.-Färbung unterzogen wurden. Die Paclitaxelkonzentrationen entsprachen auch hier 10 nM, 100 nM, 500 nM und 1000 nM. Als Referenzkontrolle wurde ein unbehandeltes HLaC79-Tumormodell herangezogen, welches ebenfalls am 17. Tag in Paraffin eingebettet wurde.

Abbildung 20 zeigt diese fünf histologischen Schnitte in identischer Vergrößerung. Dabei entspricht das unbehandelte Tumormodell dem, welches in Kapitel 4.3.1 beschrieben

Ergebnisse

wurde. Abbildung 20B-E stellen die Tumormodelle nach Behandlung mit Paclitaxel in aufsteigenden Konzentrationen dar. Bei Betrachtung des oberflächlichen Stratum corneums in allen fünf Abbildungen sind keine Unterschiede festzustellen: sowohl die Dicke dieser Schicht als auch das Vorhandensein von Keratinozyten mit abgeflachten Zellkernen variieren nicht. Bei Betrachtung des Stratum basale sind in den Abbildung 20B-D deutliche Unordnungen der basalen Keratinozyten erkennbar, die nicht palisadenförmig der Basalmembran aufsitzen. Dieses Merkmal lässt sich auch in gleichem Umfang bei dem unbehandelten Tumormodell beobachten und ist ein Malignitätszeichen dieser Modelle. Bei der histologischen Darstellung nach Behandlung mit 1000 nM Paclitaxel (E) sieht es danach aus, dass die basalen Keratinozyten der Basalmembran geordneter aufsitzen und eine Differenzierung in Richtung Oberfläche gemäß der Keratinozyten in einem OMÄ vollziehen. Des Weiteren sind jedoch in allen histologischen Schnitten Invasionen von primären oralen Keratinozyten in die Lamina propria mit Zell- und Kernpleomorphismen erkennbar, die dort zum Teil auch Verhornungsknospen entstehen lassen. Eine histologische Unterscheidung zwischen unbehandeltem Tumormodell und in verschiedenen Konzentrationen behandelten Tumormodellen ist somit nicht möglich.

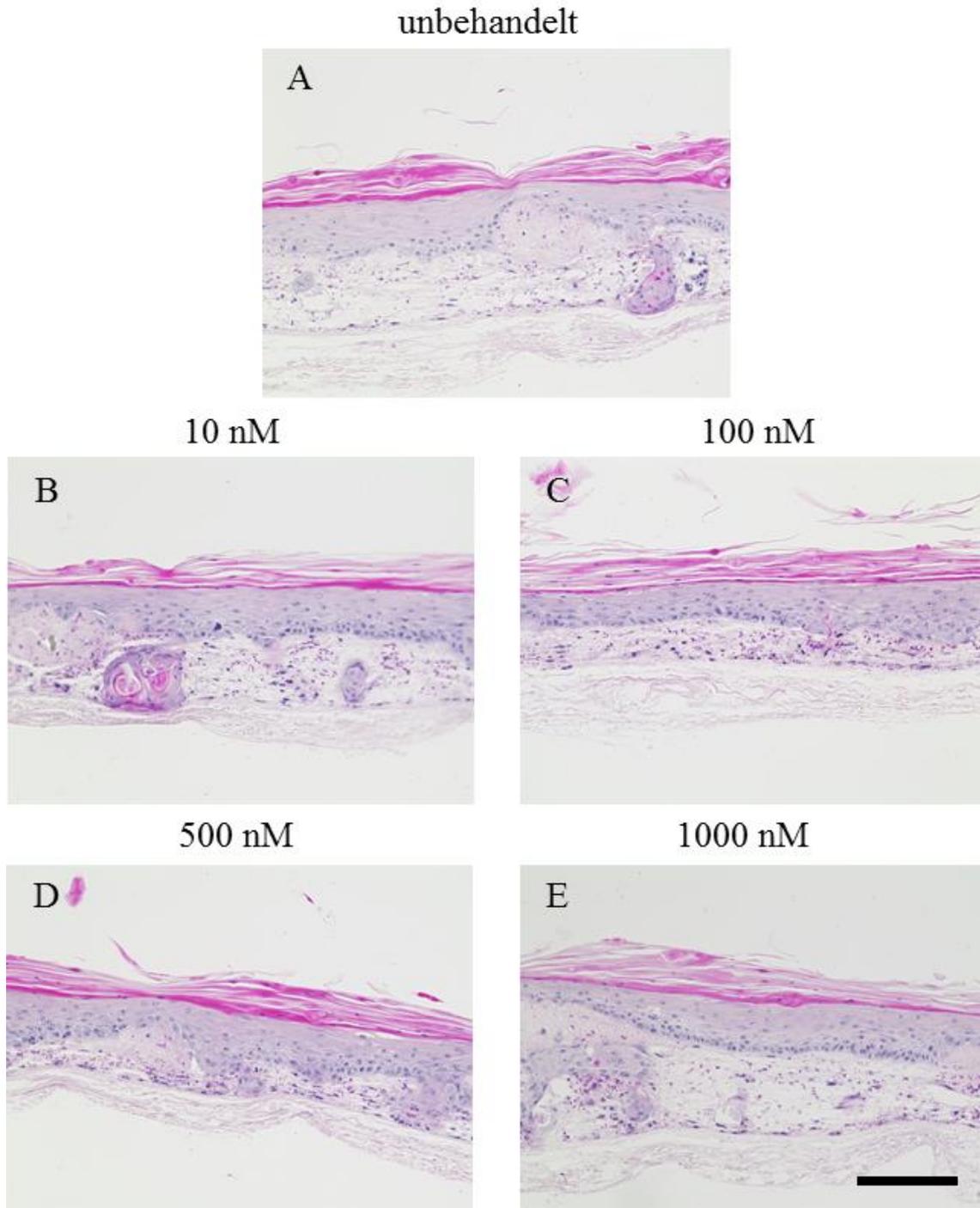


Abbildung 20:

Histologische Charakterisierung durch H.E.-Färbung der HLaC79-Tumormodelle nach der 24-stündigen Behandlung mit Paclitaxel mit den Konzentrationen von 10 nM, 100 nM, 500 nM und 1000 nM in dreidimensionaler Kultivierung. Alle Tumormodelle entsprechen einem Konzentrationsverhältnis von 1:10. Alle Aufnahmen entsprechen einer 20-fachen Vergrößerung. Größenbalken entspricht 200 μm.

4.4.3.2 Transepithelialer Widerstand nach Behandlung in dreidimensionaler Kultivierung

Um Veränderungen der Diffusionsbarriere nach der 24-stündigen Behandlung bei den HLaC79-Tumormodellen festzustellen, wurde jeweils nach der Gesamtkultivierungsdauer am 10. Tag nach ALI, also vor der Behandlung, und nach der Behandlung mit 10 nM, 100 nM, 500 nM oder 1000 nM Paclitaxel der TEER-Wert mit Hilfe der Impedanzspektroskopie gemessen und die Änderungen graphisch dargestellt. Dafür wurden Tumormodelle aufgebaut, die eine Konzentration von einer HLaC79-Tumorzelle zu 10 gesunden Keratinozyten aufwiesen (Konzentrationsverhältnis 1:10) und nach einer Gesamtkultivierungsdauer von 17 Tagen behandelt wurden. Da die Ausgangs-TEER-Werte der Modelle aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus und Verhaltens der SISmuc eine große Varianz aufwiesen, wurden die beiden gemessenen Werte eines Modells direkt miteinander verglichen (vgl. Abbildung 21). Zur Messung wurden jeweils drei Modelle je Medikamentenkonzentration herangezogen (n=3).

Aus den Graphen abzuleiten ist die Erhöhung der Diffusionsbarriere, welche besonders bei den Konzentrationen 10 nM (A), 100 nM (B) und 1000 nM (D) ausgeprägt ist. Vor allem bei der Paclitaxelkonzentration von 100 nM ist der Mittelwert der gemessenen TEER-Werte um 12 % gestiegen, während dieser bei 10 nM um 4,5 % und bei 1000 nM um 10 % gestiegen ist. Diese Veränderungen nach 24-stündigen Paclitaxelbehandlung lassen auf eine Verstärkung der Diffusionsbarriere schließen. Lediglich bei der Behandlung mit 500 nM Paclitaxel liegt der Mittelwert bei 99 %, was für einen leichten Verlust der zuvor aufgebauten Barriere spricht. Die genannten Werte weisen jedoch große Standardabweichungen auf, sodass hier keine signifikanten Ergebnisse vorliegen.

Ergebnisse

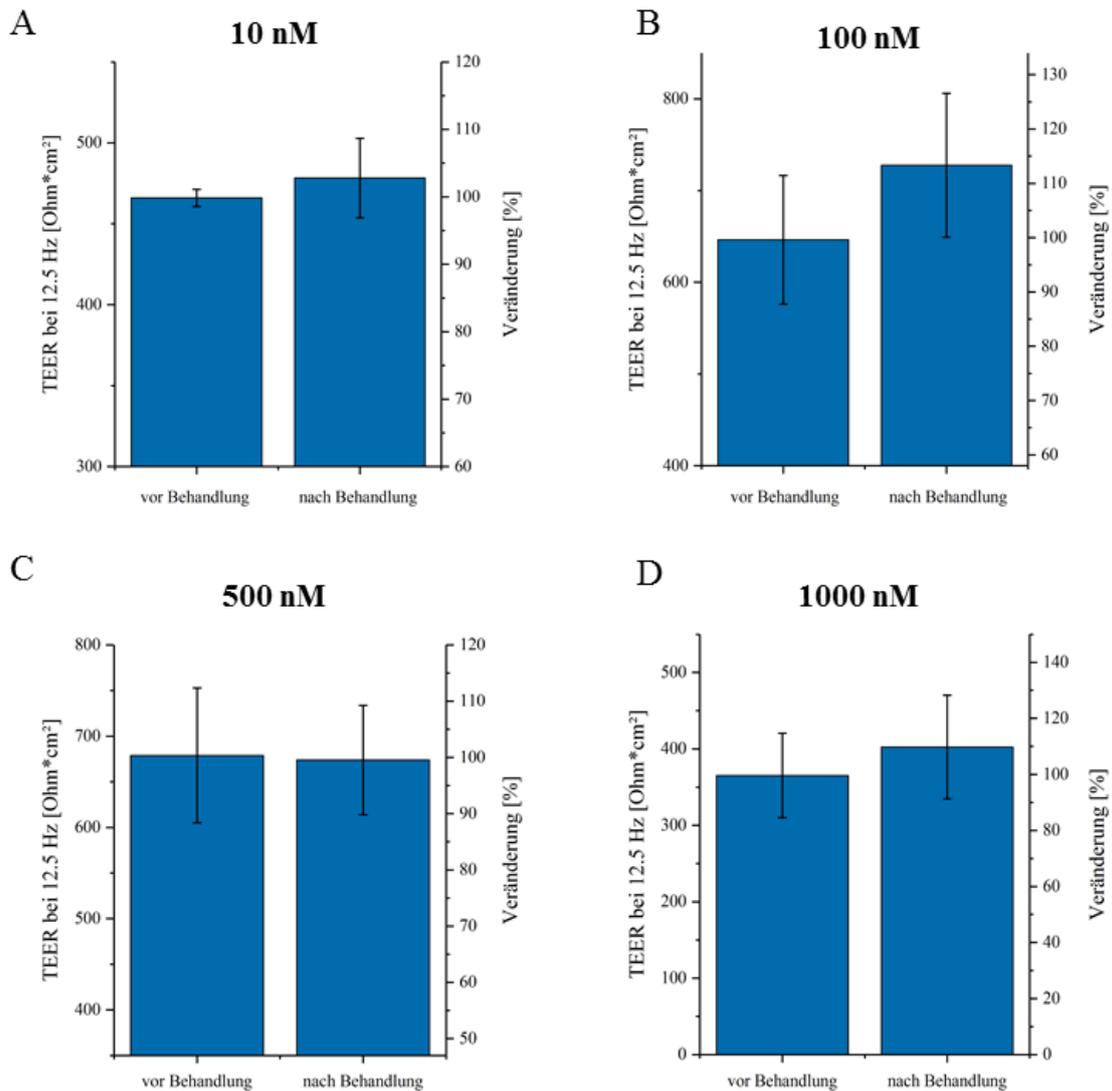


Abbildung 21: **Darstellung des transepithelialen Widerstands der HLaC79-Tumormodelle nach 24-stündiger Behandlung mit Paclitaxel mit den Konzentrationen von 10 nM, 100 nM, 500 nM und 1000 nM in dreidimensionaler Kultivierung.** Der Ausgangswert wurde jeweils gleich 100 % gesetzt. n=3.

4.4.3.3 MTT-Test zur Zellviabilitätsbestimmung nach Behandlung in dreidimensionaler Kultivierung

Um Informationen heranzuziehen, wie sich die Viabilität dreidimensionaler Tumormodelle nach einer 24-stündigen Behandlung mit unterschiedlichen Paclitaxelkonzentrationen im Vergleich zu unbehandelten Modellen verändert und ob das Zytostatikum durch Diffusion von apikal an den Wirkort gelangt, fand der MTT-Test ebenfalls Anwendung. Abbildung 22 veranschaulicht die MTT-Auswertung dieser

Ergebnisse

Versuchsreihe. Dabei wurden jeweils drei Modelle einer unterschiedlichen Konzentration ausgesetzt (n=3). Die optische Dichte der unbehandelten HLaC79-Tumormodelle wurde einer Viabilität von 100 % gleichgesetzt. Die aufsteigenden Paclitaxelkonzentrationen entsprechen auch hier 10 nM, 100 nM, 500 nM und 1000 nM. Es ist zu beobachten, dass der Mittelwert der Viabilität bei einer Paclitaxelkonzentration von 10 nM lediglich 80 % beträgt, während dieser bei 100 nM, also einer höheren Konzentration, auf 91 % steigt und bei einer Konzentration von 500 nM mit 106 % Viabilität sogar über dem Wert der unbehandelten Modelle liegt. Erst bei 1000 nM Paclitaxelkonzentration sinkt die Viabilität wieder auf 80 %.

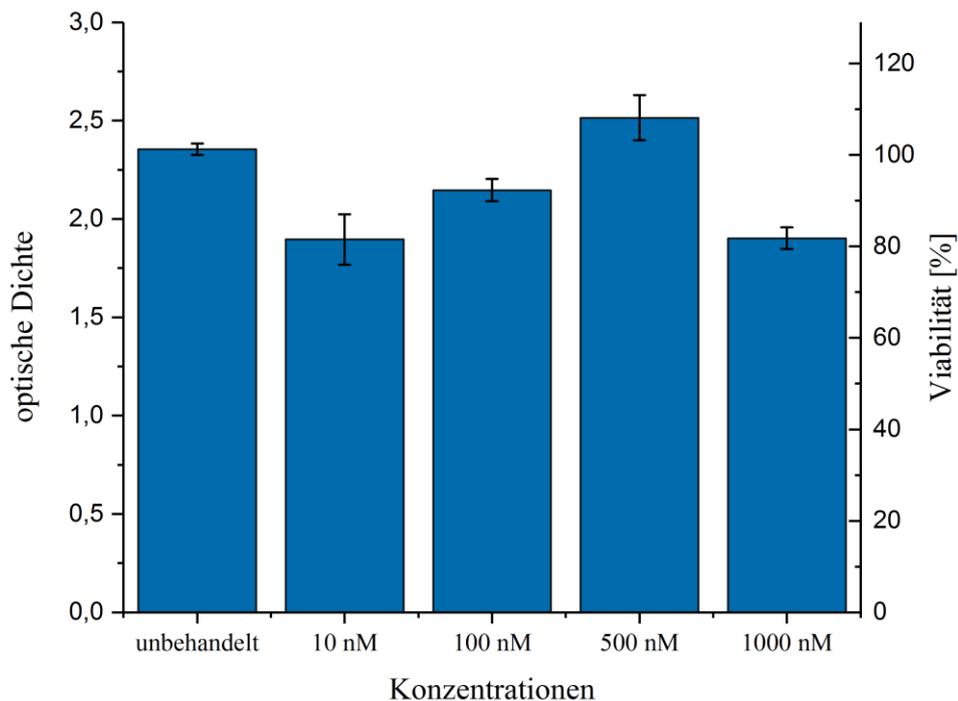


Abbildung 22: **MTT-Test von HLaC79-Tumormodellen nach 24-stündiger Behandlung mit Paclitaxel mit den Konzentrationen von 10 nM, 100 nM, 500 nM und 1000 nM in dreidimensionaler Kultivierung.** Die optische Dichte der unbehandelten Modelle wurden einer Viabilität von 100 % gleichgesetzt. n=3.

5 Diskussion

Ziel der Arbeit war es, dreidimensionale *in vitro* Tumormodelle herzustellen, die das orale Plattenepithelkarzinom nachahmen. Es galt, geeignete Methoden zu etablieren, um ein Modell bestehend aus gesundem und kanzerogenem Gewebe möglichst nahe den *in vivo* Bedingungen nachzustellen, um diese Modelle effektiv für Testungen von Medikamenten oder für die Erforschung der Karzinogenese auf molekularer Ebene zukünftig heranziehen zu können. Hier wurden die beiden Medikamente Paclitaxel und Salinomycin getestet, die bereits für die Tumorthapie *in vivo* eingesetzt werden. Zusätzlich war die Absicht dieser Arbeit geeignete Methoden für eine Isolation von Tumorzellen aus primärem Tumorgewebe zu etablieren.

5.1 Diskussion der Methoden

Für eine hohe Reliabilität der Testergebnisse ist eine geringe Varianz der Primärgewebe ausschlaggebend. Schon allein die Auswahl des Spenders spielt eine entscheidende Rolle. Dabei tritt die große Anforderung hinsichtlich des Spenderalters, der Ethnie, der intraoralen Entnahmeregion und der möglichen histologischen Dysplasie des Biopsates in den Vordergrund. Ein enges Kriterienfenster bezüglich der eingewilligten Spender wurde in dieser Arbeit zwangsläufig nur bedingt erfüllt: Die Biopsate dieser Arbeit, deren Zellen nach der Isolation kultiviert und für den Modellaufbau herangezogen wurden, stammten aus verschiedenen Regionen der Mundhöhle. So entnahmen die Zahnärzte und Chirurgen der Universitätsklinik in Würzburg sowohl mastikatorische Schleimhaut als auch Schleimhaut aus den auskleidenden Regionen bis dorsal zu dem Hypopharynx, sodass keine einheitliche Keratinisierung des Primärgewebes vorlag. Auch das Alter der Spender variierte zwischen 16 Jahren und 78 Jahren. Da bekannt ist, dass sämtliches Gewebe im Laufe des Alterungsprozesses Veränderungen unterliegt, kann davon ausgegangen werden, dass in den Biopsaten und in der anschließenden Zellkultivierung vermehrt differenzierte Zellen vorkamen. Diese irreversiblen differenzierten Zellen weisen ab dem Zeitpunkt ihres spezialisierten Zustandes eine verringerte Zellteilungsrate auf und bilden weniger Zell-Zell-Kontakte aus^[108]. Im Hinblick auf die dreidimensionale *in vitro* Herstellung der Mundschleimhautmodelle können Zellen in diesem spezialisierten Zustand nicht mehr für den Aufbau herangezogen werden, da sich die

Keratinocyten bei der Epithelbildung erst innerhalb des Modells vom Stratum basale bis zum Stratum granulosum oder Stratum corneum differenzieren^[103]. Dongari-Bagtzoglou *et al.* fanden 2006 heraus, dass gravierende Unterschiede zwischen dreidimensionalen *in vitro* Modellen bezüglich ihres Wachstums und Anzahl der Zelllagen entstehen, wenn die primären Zellen von Biopsaten unterschiedlicher Spender stammen^[109]. In dieser Arbeit wurde stets darauf geachtet, dass die primären Zellen von demselben Spender zu Modellaufbauten herangezogen wurden. Hinsichtlich dieser Aspekte weisen Biopsate von Spendern einer kleinen Altersspanne und von der gleichen Entnahmestelle in der Mundhöhle mit analoger Keratinisierung einen Vorteil auf. Costea *et al.* verwendeten in ihrer Arbeit nur isolierte Zellen aus Biopsaten, die im Rahmen einer Extraktion der dritten Molaren aus dem retromolaren Bereich der mastikatorischen Schleimhaut entnommen wurden^[103]. Einerseits limitieren diese Einschränkungen zusätzlich die ohnehin schon begrenzte Verfügbarkeit an intraoralen Biopsaten^[108], sodass es schwierig ist, zahlreiche Biopsate mit den gleichen Anforderungen für Forschungen heranzuziehen. Besonders bei der Testung neuer Substanzen, bei denen eine eventuelle Toxizität oder eine spezielle Auswirkung vorrangig ist, werden Biopsate benötigt, die untereinander eine geringe Varianz aufweisen. Andererseits rückt der Aspekt in den Vordergrund, Substanzen, Medikamente und Therapien vor der klinischen Anwendung an patienteneigenen *in vitro* Modellen testen zu können. Aus diesem Grund spiegelt die große Varianz an Biopsaten auch die *in vivo* Situation wider und ermöglicht es, ein individuelles Therapiekonzept aufzustellen.

Der oben beschriebene Punkt der Varianz betraf auch die Entnahme der Tumorbiopsate. Wie in Tabelle 2 erkennbar ist, werden die oralen Plattenepithelkarzinome abhängig von der Größe und möglichen Lymphknotenmetastasen mit Hilfe der UICC-Einteilung in verschiedene Stadien eingeteilt^[30]. Eine weitere Möglichkeit, die vor allem nach der histologischen Begutachtung verwendet wird, ist das histologische Grading nach Differenzierungsgraden. Abhängig von der Zellanzahl, der Mitoserate, der Pleomorphologie und dem Verhalten der Zellen mit umliegenden Strukturen, wird zwischen G1 -gut differenziert-, über G2 -mäßig differenziert- bis hin zu G3 -schlecht differenziert- unterschieden. Da der Grad der Dysplasie mit dem Verlust der Differenzierung steigt, weisen G3-Tumore auch die höchste Dysplasie auf^[30]. In dieser Arbeit wurde keine Rücksicht auf den Dysplasiegrad genommen. Die Isolation der

Tumoren begann, parallel wie die der gesunden Mundschleimhaut, ohne Abwarten auf das histopathologisch zugeteilte TNM-Stadium und Grading am Resektionstag. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Tatsache, dass sich eine *in vivo* Dysplasie aus einem heterogenen Gemisch aus Keratinozyten in verschiedenen Differenzierungsgraden zusammensetzt. Diese atypischen Zellen weisen einen Überlebensvorteil gegenüber nicht differenzierten Zellen auf und überwiegen in einer zweidimensionalen Kultivierung. Dadurch können *in vitro* hergestellte Tumormodelle einen anderen Dysplasiegrad zeigen, als das primäre Tumorgewebe ^[102]. Colley *et al.* nutzten 2011 diese unterschiedlichen Dysplasiegrade aus, um *in vitro* Plattenepithelkarzinome in drei unterschiedlichen Malignitätsstadien aufzubauen. Abhängig von dem gewünschten Grad der Dysplasie zogen sie die Tumorzelllinien Cal27 und FaDu sowie die dysplastischen Zelllinien DOK und D20 für ihre Modelle heran. Die Forscher kamen zu dem Entschluss, dass aufgrund der unterschiedlichen Differenzierungsgrade kein *in vitro* Modell einer oralen *in vivo* Dysplasie gänzlich gleicht und somit beispielsweise zukünftige Medikamententestungen nicht exakt mit einer *in vivo* Situation vergleichbar sind ^[98]. Für zukünftige Versuche, die die Anwesenheit von primärem Tumorgewebe voraussetzen, wäre ein Warten auf das histopathologische Ergebnis denkbar. Da diese Auswertung jedoch bis zu einigen Tagen postoperativ andauern kann, wäre die tagelange Lagerung des Biopsates ein neu auftretendes Problem. Möglich wäre ein vorheriges Konsil mit den behandelnden Onkologen und Chirurgen, um das klinische TNM-Stadium des Tumors zu erfahren und eine Entnahme abzuwägen.

Zu evaluieren ist weiterhin der Ablauf der Entnahme und Isolation von Tumorgewebe. Alle Mundschleimhaut- und Tumorbiopsate wurden den Patienten im Rahmen einer Intubationsnarkose entnommen, unverzüglich von dem medizinischen Personal in ein Falcon[®] mit Epilife[®] Medium E1 überführt und bis zu dem Isolationsbeginn bei 4 °C gelagert. Zur bakteriellen Kontaminationsvermeidung befanden sich in diesem Medium die Antibiotika Penicillin und Streptomycin (vgl. Kapitel 3.1.1 und 3.1.7). Dieses Verfahren gleicht weitgehend dem von Lee *et al.* in ihrer Veröffentlichung zur Etablierung einer neuen Tumorzelllinie CNUH-HNSCC-1 aus einem laryngealen Plattenepithelkarzinom ^[110]. Als Transportmedium benutzten sie jedoch Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) mit Antibiotika wie Gentamicin, Penicillin und Streptomycin und dem Antimykotikum Amphotericin B, um eine anfängliche bakterielle

und fungale Kontamination möglichst zu vermeiden. Die Wichtigkeit eines geeigneten Transportmediums wird in Kapitel 5.2 näher erläutert. Die Zeit des Biopsataufenthaltes im Transportmedium bis zum Start der Isolation wurde von Neugebauer *et al.* explizit auf höchstens 3 Stunden bei 4 °C begrenzt, um das Risiko einer bakteriellen Verseuchung zu umgehen ^[111]. In dieser Arbeit gab es kein einheitliches Zeitprotokoll. Bei einer Spenderentnahme am Vormittag wurde das Biopsat zwar auch bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt, jedoch erfolgte der nächste Schritt, bei dem das Biopsat in Dispase oder Kollagenase gelegt wurde, oft erst nach 6 bis 8 Stunden. In Zukunft muss somit das Einhalten eines strikten zeitlichen Protokolls an oberster Stelle stehen, um eine Kontamination vorzubeugen. Ebenfalls muss bei zukünftigen Versuchen eine geeignete Kühlkette zwischen der Entnahme und der Lagerung im Kühlschrank eingehalten werden, welche gewährleistet, dass die Biopsate keinen Temperaturschwankungen ausgesetzt werden. Auch dies konnte im Rahmen dieser Arbeit aufgrund der längeren Transportwege nicht eingehalten werden.

Die etablierte Methode, die auch bei der Isolation von gesundem Gewebe erfolgreich verwendet wird, wurde mit verschiedenen anderen Methoden verglichen (vgl. Abbildung 5). So wurde beispielsweise das Transportmedium oder die Enzymlösung mit Trypsin und EDTA zur Isolation zusätzlich in Zellkulturflaschen ausgesät, da angenommen wurde, dass sich durch den grundsätzlich lockereren Zellverband von Tumorgewebe bereits Zellen aus dem Biopsat in die Lösung gesetzt haben. Dieser geringe Verbund zwischen Tumorzellen untereinander und das spontane Ablösen einzelner Zellen ist bekannterweise ausschlaggebend für die lymphogene und hämatogene Metastasierung bei erkrankten Patienten ^[112]. Eine andere Idee war es, das Gewebe zusätzlich in Kollagenase einzulegen, welches für eine Spaltung der Peptidbindungen und somit für ein Herauslösen der einzelnen Zellen sorgt. Auch Lee *et al.* verwendeten für den Isolationsvorgang ein Gemisch aus Kollagenase und Trypsin bei anschließender Inkubation für 2 Stunden ^[110], während andere Autoren auf die Isolation durch Trypsinierung mit einem Gemisch aus Trypsin und EDTA zurückgriffen ^[111]. Da sich Trypsin bei dem Isolationsvorgang von apathologischer Mundschleimhaut bereits mit Erfolg bewährt hat, wäre es für die nächsten Isolationsversuche von Tumorgewebe wichtig, das Hauptaugenmerk auf die Optimierung der Trypsinanwendung zu legen. Der erste Schritt der Isolation war fortwährend das Zerlegen des Biopsates in maximal

3 Millimeter kleine Stücke. Daraus ergab sich jedoch die am nächsten Tag, nachdem sie über Nacht in Dispase oder Kollagenase gelegen haben, die Schwierigkeit das Epithel von der Mukosa zu unterscheiden. Anders als die Biopsate aus Regionen apathologischer Mundschleimhaut waren die Schichten der Tumorbiopsate aufgrund ihrer teils starken Dysplasie und ihres lockeren Zellverbandes schwer identifizierbar. Demzufolge konnten zwei der sechs Tumorbiopsate nicht für den kompletten Isolationsvorgang herangezogen werden. Um dieses Problem zu lösen, ist zukünftig die enge Zusammenarbeit mit den Chirurgen essentiell, die unmittelbar nach der Entnahme die Oberfläche des Biopsates mit einer herkömmlichen Naht markieren könnten. Damit wäre das Epithel von der Mukosa auch extraoral eindeutig abgrenzbar.

Die primären oralen Epithelzellen, die aus dem *in vivo* Plattenepithelkarzinom stammen, wurden in dieser Arbeit im Anschluss an die Isolation in Epilife[®] Medium E1 kultiviert, welches zusätzlich zu den Antibiotika noch HKGS enthielt und jeden zweiten Tag ausgetauscht wurde (vgl. Kapitel 2.6). Das gleiche Medium wurde erfolgreich zur Kultivierung der primären oralen apathologischen Keratinozyten verwendet. Kritisch zu betrachten ist hierbei jedoch der Punkt, dass die anderen Tumorzelllinien FaDu, HLaC79 und HLaC79 Clone 1, die in der vorliegenden Arbeit für diverse Versuche ebenfalls hinzugezogen wurden, in RPMI 1640 Medium kultiviert wurden, die primären isolierten Tumorzellen jedoch nicht. Die Literaturrecherche zeigt, dass es eine große Varianz und keine Standardisierung zu einem geeigneten Kulturmedium für Tumorzellen gibt, welche eine erfolgreiche Kultivierung vorhersagt. Sowohl RPMI 1640 Medium mit FCS ^[110], Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und eine Mischung aus DMEM und Ham's F 12 ^[108, 111] wurden in der Vergangenheit für eine erfolgreiche Kultivierung von Tumorzellen hinzugezogen. In dieser Arbeit wurde lediglich das Epilife[®] Medium E1 verwendet, da anfangs vor allem der Isolationsvorgang und die Trennung von tumorösem Epithel und Mukosa im Vordergrund standen. Damit sollte der Unterschied zur erfolgreichen Isolation und Kultivierung von primären apathogenen Keratinozyten verdeutlicht werden. Moharamzadeh *et al.* erwähnt in seinem Review das Medium Dulbeccos's modified Eagle medium (DMEM)/Ham's F 12 als das häufigste Medium der bisherigen Publikationen ^[4]. Neugebauer *et al.* begründet seine DMEM/Ham's F 12 Mediumwahl mit einem damit verbundenen vermehrten Wachstum von Fibroblasten, die auch in dieser Arbeit mit Hilfe von DMEM kultiviert wurden. Er sah ein deutlich

vermehrtes Wachstum der Tumorzellen bei der Anwesenheit von ausreichend Fibroblasten, während er bei einem Fehlen der Fibroblasten eine bemerkenswerte verminderte Adhäsion der Tumorzellen am Boden der Zellkulturflasche registrierte ^[111]. Diese Verankerung der Tumorzellen und die Unterstützung von primären Fibroblasten oder Fibroblasten aus Zelllinien ^[113] wurde ebenfalls von Costea *et al.* mit einer sichtbaren gesteigerten Tumorzellproliferation bestätigt ^[103]. Im Rahmen dieser Arbeit lag der Fokus auf der erfolgreichen Etablierung einer Monokultur aus Tumorzellen. Lohnenswert für weitere Forschungsarbeit hinsichtlich der Isolierung primären Tumorgewebes wäre sicherlich eine Kokultivierung mit Fibroblasten, bei der das oben genannte DMEM/Ham's F 12 Medium herangezogen werden könnte. Erst bei Erfolg wäre die weitere Überlegung, eine geeignete Methode zu finden, um die zwei Zellarten voneinander trennen und diese separat für den Modellaufbau heranziehen zu können. Da die Isolation von primären Tumorzellen aus Tumorgewebe in dieser Arbeit scheiterte (vgl. Kapitel 5.2), wurden für nachfolgende Versuche Tumorzellen aus den etablierten Tumorzelllinien FaDu, HLaC79 und HLaC79 Clone 1 herangezogen. Diese Zelllinien gehören zu den immortalisierten Zelllinien. Die Zellen aus diesen Zelllinien sind durch bestimmte Modifizierungsmaßnahmen in ihrer Zellteilungsfähigkeit nicht eingeschränkt und können sich somit beliebig oft vermehren ^[114]. Außerdem liegen sie in den Zelldatenbanken in einer Monokultur vor, sodass ein Vorkommen einer Kokultivierung mit anderen Zellarten bei diesen Zelllinien ausgeschlossen werden kann. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde eine zweidimensionale Kokultivierung in den Zellkulturflaschen nicht registriert. Ein weiterer Vorteil von Zelllinien, welcher sich dadurch ergibt, ist die Möglichkeit der guten Reproduzierbarkeit, um größere Experimente mit einer größeren Anzahl an biologischen und technischen Replikaten durchführen zu können. Auch die stark eingeschränkten Kriterien, die auch Tumorbiosate hinsichtlich ihres Spenderalters, ihrer Spendergewohnheiten, ihres Entnahmeortes und ihrer histologischen Einteilung für eine Versuchsreihe erfüllen müssen, stellen die immortalisierten pathologischen Zelllinien klar in den Vordergrund ^[115]. Auch andere Arbeitsgruppen zogen für ihre Forschung Tumorzellen aus immortalisierten Zelllinien heran: Costea *et al.* beispielsweise griffen auf die neoplastische Zelllinie PE/CA-PJ 15 und die dysplastische Zelllinie DOK zurück ^[103], Schmalz *et al.* zogen die pathologische Zelllinie TR 146 heran ^[70] und

Dongari-Bagtzoglou verwendeten die apathologische und orale Keratinozytenzelllinie OKF6/TERT-2 ^[72].

Im Gegensatz zu den misslungenen Versuchen, Tumorzellen aus primärem Gewebe zu isolieren und für Modellaufbauten zu verwenden, erzielten die Methoden der Isolation und der Modellherstellungen für apathologische *in vitro* Mundschleimhautmodelle, die im Lehrstuhl Tissue Engineering und Regenerative Medizin der Universität Würzburg bereits etabliert wurden, große Erfolge ^[116]. Hinsichtlich der Information von Takeda *et al.*, die herausfanden, in welcher Zellpassage sowohl primäre Fibroblasten als auch primäre Keratinozyten optimal für den *in vitro* Modellaufbau von Mundschleimhaut geeignet sind ^[68], wurden auch in dieser Arbeit die beiden Zellarten in möglichst frühen Passagen abgelöst und verwendet. So war der Hintergedanke, ein mögliches Risiko viele entartete und differenzierte Zellen ausgesät zu haben mit der Folge eines *in vitro* Mundschleimhautmodells, welches nicht der *in vivo* Situation entspricht, aus dem Raum zu schaffen. Die nach der Isolation kultivierten Fibroblasten wiesen stets eine höhere Population Doubling Time auf als die isolierten oralen Keratinozyten, die ebenfalls zeitgleich in Zellkulturflaschen kultiviert wurden, sodass die Fibroblasten konstant in höheren Passagen für den Modellaufbau herangezogen wurden. Aus diesem Grund wurden die oralen Fibroblasten erst in der vierten oder fünften Passage für weitere Versuche verwendet. Da für einen Modellaufbau sowohl Keratinozyten als auch Fibroblasten von dem gleichen Spender eingesetzt wurden, war das Zeitmanagement in dieser Arbeit eine Hürde. Um die Zellen, wie bereits beschrieben, in den besten Passagen aussäen zu können, wurden diese oft kryokonserviert und nach einigen Tagen erneut aufgetaut. Aufgrund dieser Vorgänge war, neben dem Verlust dieser Zellen durch Zelltod, ein weiteres Problem der entstandene Zellstress. Dies zeigt sich an den darauffolgenden Tagen durch vermehrt differenzierte Zellen und der verringerten Proliferationsrate in den Zellkulturflaschen. Hier wäre die Überlegung das Protokoll der Isolation bezüglich der anfänglichen Aussaatdichte nochmals zu überarbeiten, um diese Probleme aus dem Weg zu schaffen. Die Fibroblasten sollten dann weniger dicht in den Zellkulturflaschen ausgesät werden, um eine zeitlich spätere 80 prozentige Konfluenz zu erzielen. Auch mit steigender Passage steigt das Risiko von vermehrten differenzierten Zellen ^[108] und sinkt die Produktion von extrazellulärer Matrix ^[68]. Aus diesem Grund sollten die Passagen

von apathologischen Zellen im Gegensatz zu den Tumorzellen nicht bis in das Unendliche ausgeschöpft werden. Auch Southgate *et al.* fanden schon 1987 heraus, dass primäre isolierte Zellen nach der vierten Passage eine geringe Population Doubling Time aufweisen und es bei weiterem Passagieren zu einer Stagnation des Zellwachstums kommt ^[117].

Die Gesamtkultivierungszeit betrug sowohl bei den OMÄ als auch bei allen Tumormodellen 17 Tage. Nach der Fibroblastenkultivierung auf der Trägermatrix SISmuc von 7 Tagen erfolgte im Anschluss für eine 24-stündige Submergekultivierung die Hinzugabe von reinen Keratinozyten oder einer Mischung aus Keratinozyten und Tumorzellen in bestimmten Konzentrationsverhältnissen. Danach folgte die ALI-Phase von 10 Tagen (vgl. Kapitel 3.1.6). Diese Dauer wurde ebenfalls von dem Lehrstuhl Tissue Engineering und Regenerative Medizin etabliert und gewährleistet einen vollständigen physiologischen Epithelaufbau von Mundschleimhaut und einen pathologischen Aufbau von Plattenepithelkarzinomen *in vitro*. Verglichen mit anderen publizierten Arbeiten ist diese Gesamtkultivierungsdauer als moderat zu bewerten. Die Spannweite der Kultivierungszeiten reicht von 10 Tagen ^[103] bis 25 Tagen mit einer ALI-Phase von bis zu 15 Tagen ^[72]. Dongari-Bagtzoglou *et al.* offenbarten die Tatsache, dass je länger die Kultivierung dauerte, desto mehr Zellschichten ihre *in vitro* Modelle aufwiesen. Da die histologischen Auswertungen der OMÄ und der Tumormodelle ein Epithel mit einer ausreichenden Anzahl an Zellschichten aufwiesen, wurde die Kultivierungsdauer in dieser Arbeit nicht verändert (vgl. Kapitel 4.2.1 und 4.3.1) und bedarf auch zukünftig keinen Anpassungen. Wie bereits bei den Tumormodellen beschrieben, war es von Vorteil, die primären oralen gesunden Keratinozyten auf die bereits vorher applizierten Fibroblasten auf der SISmuc auszusäen, um eine Interaktion zwischen diesen beiden Zellarten mit optimaler Zellproliferation und Differenzierung der Keratinozyten zu erzielen ^[103, 111, 113, 118]. Die SISmuc, die in dieser Arbeit für alle Modellaufbauten herangezogen wurde, hat sich bereits in der Vergangenheit als gute Matrix bewährt. Durch ihre furchige Oberflächenstruktur sind die ausgesäten Fibroblasten in der Lage, an die SISmuc zu adhären und sogar in diese zu invadieren. Dadurch kann eine starke Verflechtung von Fibroblasten untereinander entstehen, welche für eine große Anhäufung von Extrazellulärmatrix verantwortlich ist und ein großer Vorteil gegenüber anderen Gelen und Membranen bietet, die in der Vergangenheit als

Matrizes hinzugezogen worden sind. ^[119]. Ein Nachteil, den die SISmuc mit sich bringt, ist ihr porciner Ursprung. Diese Dünndarmschleimhaut des Schweines wird zwar in einem aufwendigen Verfahren dezellularisiert, eine Kontaminationsgefahr kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Ein weiterer Punkt ist die individuelle Herkunft der SISmuc, welche sich in einer Variabilität bezüglich ihrer Beschaffenheit in Dicke und Struktur zeigt und somit den Aufbau der Modelle beeinträchtigen könnte. Diese Tatsache wird in der Auswertung der Ergebnisse oft nicht berücksichtigt. An dieser Stelle wäre zukünftig eine Anfertigung von zusätzlichen Modellen, die lediglich SISmuc und Fibroblasten enthalten, sinnvoll. So kann bei einer Abweichung von Merkmalen zwischen den Modellen die SISmuc als mögliche Ursache herangezogen werden, bevor von einer Schuld der primären Zellen ausgegangen wird.

Bei der Behandlung der HLaC79- und HLaC79 Clone 1 Tumorzellen mit Paclitaxel und Salinomycin und der HLaC79 - Tumormodelle mit Paclitaxel wurden diese Medikamente in verschiedenen Konzentrationsverhältnissen dem Medium hinzugefügt. In dreidimensionaler Kultivierung wurde das Paclitaxel dem Medium außerhalb der Zellkronen in die Wells gegeben. Somit erfolgte bewusst eine systemische Medikamentengabe, da dieses Chemotherapeutikum klinisch ebenfalls systemisch verabreicht wird. Nach der intravenösen Injektion gelangt es durch den Blutkreislauf an den Ort des Tumorgeschehens. In der Vergangenheit befassten sich andere Autoren von Publikationen mit der Applikation von Medikamenten und diversen Materialien bei zwei- und dreidimensionalen Kultivierungen. Moharamzadeh *et al.* teilten die Möglichkeiten der Substanzen- und Medikamentenapplikation wie folgt ein: direkter Kontakt, indirekter Kontakt und Kontakt durch Extrakte und Elution ^[120]. Dabei wird der direkte Kontakt als physikalischer Kontakt mit Zellen definiert und zeigt vor allem bei wasserlöslichen Materialien einen ausgesprochen guten Kontakt und eine hohe Sensitivität ^[121]. Bei nicht wasserlöslichen Materialien sollte ein möglichst naher Kontakt angestrebt werden ^[122], der durch die Applikation der Testsubstanz auf dem Zellmonolayer oder durch Zellapplikation auf die Substanz erzielt wird ^[123]. Bei dem zuletzt genannten Punkt spielt jedoch die Beschaffenheit der Materialoberfläche hinsichtlich der Adhäsionsfähigkeit eine wichtige Rolle, sodass diese Methode nicht standardisiert werden kann ^[124]. Der indirekte Kontakt zwischen Substanz und Zellen

kann durch eine permeable Membran, Agar ^[125] oder durch einen Millipore Filter ^[126] geschaffen werden, die anfangs eine räumliche Barriere aufweisen, aber dennoch für bestimmte Substanzbestandteile durchlässig sind. Die Verdünnungen von Substanzen mit Dimethylsulfoxid, Ethanol oder Kulturmedium und anschließender Applikation auf die Zellkulturen entsprechen einem Kontakt durch Extrakte und Elution ^[127] und können bei kompletter flüssiger Auflösung als gängige Methode eingestuft werden ^[120]. Letztere Möglichkeit der Applikation nutzten auch Schmalz *et al.*, um Metalle wie Nickel, Zink und Kupfer, welche in der Zahnmedizin Gebrauch finden, und deren mögliche Reizung an *in vitro* hergestellten Mundschleimhautmodellen zu testen ^[70]. Dafür wurden mit Hilfe von Kulturmedium oder Aceton verschiedene Stocklösungen hergestellt und anschließend für 48 Stunden direkt auf die Epitheloberfläche appliziert. Auch in der Arbeit von Borenfreund *et al.*, die verschiedene Metalllegierungen in zweidimensionaler Kultivierung an Keratinozyten testeten, wurden diese in Kulturmedium gelöst und somit ein Kontakt zu den Zellen hergestellt ^[128]. Browne *et al.* kamen schon im Jahr 1979 zu dem Entschluss, dass der Vorteil von Extrakten und Elution der sei, dass auf einfachster Weise ein Kontakt und auf Wunsch eine Abstufung der Konzentrationsverhältnisse hergestellt werden kann ^[129]. Diskutiert wurde in diesen Publikationen jedoch das Risiko von nicht replizierbaren und verfälschten Ergebnissen bei nicht konsequenter Einhaltung des genauen Konzentrationsverhältnisses bei jeder Versuchsreihe. Von den beiden Medikamenten Paclitaxel und Salinomycin wurden jeweils Stocklösungen mit RPMI 1640 Medium hergestellt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Medikamente in diesen Lösungen und bei der systemischen Applikation vollständig verdünnt in den Flüssigkeiten vorlagen. Ein weiterer Punkt, der in dieser Arbeit nicht beachtet wurde, ist der mögliche Wirkverlust bei zu langer Lagerung als Stocklösung. Die Stocklösungen von Paclitaxel und Salinomycin wurden im Durchschnitt für 3 Wochen kühl gelagert und an den Tagen der Medikamentenapplikation auf Raumtemperatur aufgewärmt. Bei dieser längeren Lagerung ist fraglich, ob das jeweilige Medikament bei Applikation noch das volle Wirkspektrum besitzt. Vor allem bei dem Kontakt mit RPMI 1640 Medium mit seinen zusätzlichen Komponenten kann eine unerwünschte Wechselwirkung nicht ausnahmslos ausgeschlossen werden. Bei so einem direkten Kontakt mit den Zellen, der durch gelöste Substanzen in Kulturmedien zustande kommen soll, beobachteten Moharamzadeh *et al.* gewissermaßen einen abgeschwächten

Wirkeffekt durch die Bestandteile des vorliegenden Mediums ^[120]. Das Medikament Salinomycin, welches als Pulver bestellt wird, wurde in Aceton gelöst und dann mit Zellkulturmedium zu einer Stocklösung hergestellt. Die Frage nach einer Verflüchtigung des Wirkstoffes durch das Aceton bleibt ebenfalls in dieser Arbeit unbeantwortet. Für zukünftige Versuche sollten stets neu angesetzte Stocklösungen unmittelbar vor der systemischen Applikation Verwendung finden, um die zuvor thematisierten Punkte zu umgehen. Um in dieser Arbeit die Auswirkungen von Paclitaxel und Salinomycin beurteilen und diese Modelle histologisch und mit diversen Tests mit unbehandelten Tumormodellen und OMÄ vergleichen zu können, die alle erforderlichen Substanzen ausschließlich durch Diffusion durch die semipermeable Matrix aus den Medien erhalten haben, wurde sich gegen eine direkte topische Applikation auf das Epithel entschieden. Zukünftig wäre jedoch auch diese Applikationsform und Testung der Viabilität beispielsweise mittels eines MTT-Testes mit anschließendem histologischen Vergleich ein spannender Gegenstand der Forschung. Bei Erfolg wäre eine topische Anwendung von Chemotherapeutika auch im klinischen Alltag in Form von Salben oder Gelen denkbar.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

Wie schon im vorherigen Kapitel angesprochen, gestaltete sich die erfolgreiche Isolation von malignen Keratinozyten aus Plattenepithelkarzinomen äußerst schwierig. Es zeigten sich deutliche Kontaminationen nach dem Isolationsversuch in den Zellkulturflaschen, somit muss eine bakterielle und fungizide Besiedlung innerhalb der ersten Tage nach der Resektion stattgefunden haben (vgl. Abbildung 6). Die Gründe dafür können von dem Operateur, der nicht ausreichend steril gearbeitet hat, über das medizinische Personal und der Doktorandin bis hin zu einem kontaminierten Medium reichen. Aber vor allem das tumoröse Gewebe, welches noch nicht reseziert wurde, weist oft eine bakterielle Besiedlung auf, die durch die Antibiotika in den Medien nicht eliminiert werden kann. Das Epilife[®] Medium E1, welches hier als Transportflüssigkeit und zur Zellkultur verwendet wurde, enthielt stets die Antibiotika Penicillin und Streptomycin, um einer bakteriellen Kontamination vorzubeugen. Da diese beiden Wirkstoffe jedoch nur auf eine begrenzte Bandbreite an Bakterien abzielen, wäre es sicherlich hilfreich, Antibiogramme heranzuziehen, um multiresistenten Erregern vorzubeugen. Diese Antibiogramme

könnten mit Hilfe eines Abstriches oder einer Probeexzision vor der Entnahme des Biopsates angefertigt werden, um die Antibiose des Transport- und Zellkulturmediums entsprechend zu adaptieren. Auch die Anfertigung eines Antimykogramms und die damit entsprechende Antimykotikumgabe in das Medium könnte bei weiteren Versuchen hilfreich sein, um fungizide Kontaminationen vorzubeugen. Während in einer Publikation von 36 Tumorbiopsaten 7 Proben kontaminiert waren und daraufhin verworfen wurden ^[130], versuchten andere Autoren bei einer fungiziden Kontamination der kompletten Zellkulturflasche eine antimykotische Behandlung mit Amphotericin B ^[131]. Die alleinige Gabe von Amphotericin B könnte durch weitere Antimykotika wie Azole, Echinocandine oder andere Polyen-Therapeutika wie Nystatin ergänzt werden. Eine weitere Frage, die sich nach Auswertung der Isolationsversuche stellt, ist die Wirkungsdauer der Antibiotika. Möglicherweise wäre in der Anfangszeit ein täglicher Mediumwechsel in den Zellkulturflaschen notwendig, um anfängliche Keime unverzüglich zu eliminieren. Auch könnte das Aussäen der Zellen in zu große Zellkulturflaschen der Grund für ein langsames Zellwachstum und einer Kontamination sein. Zu dieser Erkenntnis kamen auch Lee *et al.*, die von einer größeren Infektionsrate bei zunehmender Kultivierungsdauer sprechen ^[110]. Durch die große räumliche Distanz von Zellkolonien in einer Zellkulturflasche kommt es zu einer verringerten Zellproliferation, damit zu einer langen Kultivierungszeit in einer Flasche und damit wiederum zu einer Kontamination des verbliebenen Mediums, da es unmöglich ist, das gesamte alte Medium im Rahmen eines Mediumwechsels zu entfernen. Während zuletzt genannte Autoren in ihrer Publikation zu 30 Prozent eine Zelllinie aus laryngealen Plattenepithelkarzinomen erfolgreich etablieren konnten ^[110], verzeichneten Giard *et al.* in ihrer Veröffentlichung zur Etablierung von Tumorzelllinien aus diversen humanen Tumoren lediglich einen Erfolg von 6 Prozent ^[132]. Der Grund für dieses Ergebnis war die Erkenntnis der langsam wachsenden und leicht zu kontaminierenden Proliferation der Tumorzellen aus nekrotischem primärem Tumorgewebe, wohingegen das Zellwachstum bei nicht-nekrotischem Gewebe sehr stark war. Für kommende Versuche wäre hier ein genaues Zählen der primären Tumorzellen mithilfe der Neubauer Zählkammer notwendig, um die Größe der Zellkulturflasche an die Zellanzahl anzupassen. Die Ergebnisse (vgl. Kapitel 4.1) zeigen einen Verlust von zahlreichen Zellen an Tag 7. Das Problem liegt in den vielen abgekugelten Zellen, die bereits an Tag 1 sichtbar waren,

da diese nicht fähig sind, an dem Boden der Zellkulturflasche zu adhäreren. Durch ihre Anwesenheit in dem Medium und der regelmäßig durchgeführten Mediumwechsel konnte ein Absaugen dieser Zellen nicht verhindert werden. Deshalb wäre eine Idee für weitere Versuche die Verwendung von Zellkulturflaschen ohne beschichteten Boden, die ein Adhäreren der Zellen abhält, um ein mögliches Wachstum dieser Zellen im Medium zu begünstigen. Kritisch wäre dann jedoch der Ablauf des stetigen Mediumwechsels, da das Medium mit den Zellen entnommen werden müsste, um ein Zellpellet durch Zentrifugation herzustellen. Dieses müsste erneut mit Medium resuspendiert und dieses wiederum ausgesät werden. Besonders die Zentrifugation bedeutet für die Zellen sehr viel Stress und kann zum vermehrten Zelltod führen. Weiterhin spielt der pH-Wert in der Zellkulturflasche eine entscheidende Rolle. In dem hier herangezogenen Medium befindet sich jedoch ein pH-Indikator, der bei Abweichungen des pH-Wertes für einen deutlich sichtbaren Farbumschlag des Mediums sorgt. Dieser Farbumschlag war im Rahmen der Versuche zu keiner Zeit sichtbar und zusätzlich wurde das Medium regelmäßig gewechselt, sodass die Kippung des pH-Wertes nicht als Ursache des Misserfolges genannt werden kann. Giard *et al.* bemerkten vermehrt mukosale Fibroblasten, die sich zunächst am Rand des Primärtumors adhärerten und dort stark proliferierten. Wie schon durch andere Autoren beschrieben, wurde ebenfalls in ihrer Arbeit eine überschaubare Anzahl an Fibroblasten mit einem zunehmenden Wachstum der primären Tumorzellen registriert, während ein Übermaß dieser Zellen für eine Stagnation des Wachstums für maligne Zellen und für eine Kontamination sorgten ^[132]. Um das Wachstum der Tumorzellen zu unterstützen, wurde in mehreren Veröffentlichungen die Anzahl der Fibroblasten strikt überwacht und diese bei einem übermäßigen Wachstum mechanisch entfernt ^[131, 132]. Auch Klonierungringe für die Isolation von Tumorzellen zu anderen Zellarten in der Kulturflasche und, um somit das maligne Zellwachstum gezielt zu steuern, fanden in der Vergangenheit Verwendung ^[131]. Eine Überlegung ist es wert, Klonierungringe auch für spätere Versuche heranzuziehen, um diese räumliche Trennung zwischen Tumorzellen und anderen Zellarten zu ermöglichen. Das Problem der Kontamination und der Etablierung einer Tumorzelllinie, ob von oralen Plattenepithelkarzinomen oder diversen anderen Karzinomen, zeigte sich demnach nicht nur in dieser Arbeit. Jegliches bakteriell oder fungizid kontaminiertes Tumorbiopsat wurde unverzüglich verworfen, sodass der Grund der Verunreinigung

bewusst nicht aufgeklärt wurde. Da selbst bei diesen Maßnahmen eine gänzliche Kontamination nicht gestoppt werden konnte, sollte neben den genannten Aspekten zur Verbesserung des Outcomes zukünftig die Anzahl an Primärbiopsaten aufgestockt werden, um die Wahrscheinlichkeit eines Erfolges zu erhöhen.

Nachdem die Zellen gesunder Mundschleimhautbiopsate erfolgreich durch das etablierte Isolationskonzept des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin Würzburg isoliert und kultiviert wurden, konnten diese für den Modellaufbau von oralen Mukosaäquivalenten (OMÄ) hinzugezogen werden. Die OMÄ sollten in dieser Arbeit die physiologische orale Mundschleimhaut nachbilden und die Ergebnisse zeigen erfreulicherweise eine geringe histologische Devianz. Es lässt sich daraus schließen, dass trotz unterschiedlicher Spender hinsichtlich Entnahmeortes und Spenderalters ein sehr ähnliches histologisches Erscheinungsbild entsteht. Kritisch sahen diesen Aspekt Izumi *et al.*, die in ihrer Arbeit eine abweichende metabolische und proliferative Zellaktivität zwischen ihren *in vitro* hergestellten Mundschleimhautmodellen registrierten ^[133]. Da in der vorliegenden Arbeit diese Aktivität mit Hilfe diversen Assays nicht dargelegt wurde, konnte lediglich die histologische Charakterisierung untereinander ausgewertet werden. In allen OMÄ lag ein insgesamt ca. 200 µm dickes parakeratinisiertes Epithel mit 15 bis 20 Zelllagen vor (vgl. Kapitel 4.2.1 und 4.3.1), sodass diese eine große Ähnlichkeit mit anderen *in vitro* hergestellten oralen Schleimhautmodellen aufwiesen, bei denen die Anzahl der Zelllagen zwischen 7 und 12 Schichten lag ^[72, 108]. Während einige Autoren die exakten histologischen Merkmale an Tag 4, 11 und 18 untersuchten und eine zunehmende Differenzierung der Keratinozyten auf einer intakten Basalmembran beobachteten ^[133], legten andere das Augenmerk auf die histologische Auswertung am Ende der Gesamtkultivierungsdauer ^[72, 108]. Dabei ist vor allem Buskermolen *et al.* aufgefallen, dass die dreidimensionalen *in vitro* Modelle keine Reteleisten, also keine auffällige Verzahnung des Epithels mit der Mukosa aufweisen, welche aber im nativen Gewebe vorhanden sind. Diese Eigenschaft der oralen Mukosa fanden Xiong *et al.* heraus, die die Reteleisten als Ergebnis von mechanischen Ereignissen begründeten, die *in vivo* durch das Sprechen und Zerkleinern von Mahlzeiten regelmäßig vorkommen ^[134]. In den OMÄ der vorliegenden Arbeiten fehlen ebenfalls die Reteleisten. Derartige *in vitro* Ausübungen von mechanischen Kräften an den OMÄ könnte Bestandteil zukünftiger Versuche sein. Alle bisher genannten Autoren erkannten in ihren *in vitro* Modellen die

entstandene Basalmembran mit anfangs kubischen und zur Oberfläche hin zunehmend abgeflachten Keratinozyten, die auch noch in der obersten Schicht einen Zellkern enthielten, sodass ein mehrschichtiges Plattenepithel mit Parakeratinisierung vorlag. Lediglich das Stratum corneum war von unterschiedlichen Dicken geprägt, was auf die unterschiedliche Kultivierungsdauer schließen lässt ^[103]. Als Erfolgsgrund der einheitlichen OMÄ kann hier die Kokultivierung mit oralen Fibroblasten angegeben werden, die nun, wie bereits erläutert, für eine vermehrte Keratinozytenadhäsion mit Ausbildung von epidermal-dermalen Zell-Zell-Kontakten und einer gesteigerten Zelldifferenzierung sorgt ^[72, 135].

Um die erschaffenen OMÄ auch immunhistochemisch zu charakterisieren, wurden die Epithelmarker Zytokeratin 10 (CK 10) und 14 (CK 14), der Zellproliferationsmarker Ki 67, das Tumorsuppressorprotein p53, der Marker für Intermediärfilamente Vimentin und Kollagentyp IV, welches als Bestandteil der Basalmembran gilt, herangezogen (vgl. Tabelle 9). Die nachzuweisenden Proteine wurden bei vorhandenem Dasein mit Hilfe der DAB-Färbung braun dargestellt (vgl. Kapitel 4.3.3). Die Darstellung von suprabasalen und basalen Zellen des Epithels der OMÄ, die durch CK 10 und CK 14 erfolgte, ist vergleichbar mit weiteren *in vitro* hergestellten oralen Schleimhautmodellen: Costea *et al.* verzeichneten in ihrer Arbeit, in der sie die Auswirkung von zusätzlichen Fibroblasten und den Gebrauch von Keratinocyte Growth Factor (KGF) auf die Mundschleimhautmodelle untersuchten, eine gleichmäßige Expression von CK 14 in allen Zelllagen des Epithels bei Abwesenheit von Fibroblasten und eine Expression lediglich in den basalen Zellschichten bei einer Kokultivierung mit Fibroblasten ^[136]. In der vorliegenden Arbeit, in denen Fibroblasten für den Modellaufbau herangezogen wurden, exprimieren die basalen Keratinozyten mehr CK 14, welches sich in einer Intensivierung der Braunfärbung zeigt. Die suprabasalen Keratinozyten wurden erfolgreich mit CK 10 dargestellt und die OMÄ weisen Parallelen zu nativem Gewebe und zu Modellen anderer Autoren auf, sodass hier von einer Keratinozytendifferenzierung und einer daraus entstandenen mechanischen Stabilität und Schaffung einer funktionalen Barriere ausgegangen werden kann ^[108, 133, 137]. Durch den Proliferationsmarker Ki 67 wurden in den OMÄ basale proliferative Zellen angefärbt, die auch in den histologischen Bildern von Buskermolen *et al.* und Costea *et al.* nachweisbar waren ^[108, 136]. Da hier nur der Nachweis am Ende der

Kultivierung nach 17 Tagen erbracht wurde und davon auszugehen ist, dass es bei einer weiteren Kultivierung aufgrund der Zelldifferenzierung annäherungsweise zu einer Stagnation des Epithelwachstums kommt, ist an dieser Stelle die Erkenntnis von Izumi *et al.* wichtig, die ihre Mundschleimhautmodelle an drei unterschiedlichen Tagen histologisch untersuchten: während Ki 67 an Tag 4 annähernd alle basalen Zellen immunopositiv sind, ist Ki 67 an Tag 18 zwar noch präsent, aber lediglich in einzelnen Keratinozyten nachweisbar ^[133]. Das Tumorsuppressorgen p53 sorgt für die Aufrechterhaltung des proliferativen Potenzials der Keratinozyten und soll eine Enddifferenzierung dieser Zellen verhindern. Das Vorkommen von diesem Protein in den basalen Zellschichten der OMÄ kann mit den histologischen Auswertungen von Izumi *et al.* verglichen werden ^[133]. So sind vereinzelt vergrößerte Zellen sichtbar, die der Basalmembran aufsitzen. So lässt sich schlussfolgernd herleiten, dass das Epithel des nativen Gewebes genauso wie das des *in vitro* hergestellten Mundschleimhautmodells hochproliferative Stammzellen aufweist. Da Kollagentyp IV ausschließlich in der Basalmembran von OMÄ nachzuweisen ist, wenn eine Kokultivierung mit Fibroblasten erfolgte ^[136, 138], waren die Bestandteile der Basalmembran in dieser Arbeit immunopositiv gegenüber diesem Marker. Dies spricht für stark ausgeprägte Zell-Zell-Kontakte zwischen den epithelialen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten ^[108]. Abbildung 12 zeigt ebenfalls ein Vorkommen von Kollagentyp IV in der Lamina propria. Dies lässt auf einen Anwendungsfehler der immunhistologischen Färbung schließen, bei dem das DAB zu lange einwirkte.

Bei den mit Hilfe von FaDu-, HLaC79- und HLaC79 Clone 1- Tumorzellen *in vitro* aufgebauten Modellen, die ein *in vivo* orales Plattenepithelkarzinom nachbilden sollten, erfolgte ebenfalls eine histologische und immunhistochemische Charakterisierung (vgl. Kapitel 4.2.1, 4.3.1, 4.3.2 und 4.3.3). Besonders auffällig ist die, im Vergleich zu den OMÄ, geringere Epitheldicke der Modelle. Bei dem Betrachten der Epithelschichten herrscht ein Anschein der Desorganisation, welches auch andere Autoren mit einer Ansammlung von abgeflachten differenzierten Zellen begründen, die kein regelrechtes Epithel mit teils fehlendem Stratum corneum ausbilden ^[108]. Des Weiteren ist ein heterogenes Epithel mit spongiösen, vakuolisierten und pleomorphen Zellen erkennbar, welches die Malignität dieser Modelle hervorhebt ^[103]. Buskermolen *et al.* beschäftigten sich in ihrer Arbeit mit der Entwicklung eines HPV-assoziierten oralen

Plattenepithelkarzinoms. Humane Papillomviren, vor allem HPV 16 und 18, sind verantwortlich für diese Karzinogenese ^[35, 139]. Dabei ist den Forschern vor allem die Invasion der HPV-immortalisierten Keratinozyten in die fibroblastenhaltige Submukosa und in die Kollagenmatrix aufgefallen ^[108]. Parallelen können auch zu den Ergebnissen dieser Arbeit gezogen werden, da auch hier ein deutlich sichtbares Eindringen der Tumorzellen in tieferliegende Strukturen sichtbar ist (vgl. Abbildung 7 und Abbildung 10). An dieser Stelle ist es jedoch von großer Bedeutung, zu erwähnen, dass die vorliegenden FaDu-Tumormodelle rein histologisch einen höheren Grad an Malignität aufweisen als die HLaC79-Tumormodelle. Das Epithel fehlt bei diesen Modellen fast gänzlich und eine Basallamina ist nicht identifizierbar, sodass eine vollständige Unordnung herrscht. Dabei ist es nicht verwunderlich, dass das Epithel der FaDu-Tumormodelle mit der Konzentration 1:10 gegenüber den Konzentrationen 1:17 und 1:25 die größte Desorganisation mit den meisten Malignitätskriterien aufweist. Die Frage nach diesen gravierenden Unterschieden zwischen zwei *in vitro* Tumormodellen mit zwei unterschiedlichen Tumorzelllinien bleibt jedoch unbeantwortet. Möglicherweise liefert ein Blick auf die Herkunft dieser beiden Zelllinien eine Antwort: Während die FaDu-Zelllinie aus einem Hypopharynxkarzinom etabliert wurde, stammt die HLaC79-Zelllinie aus einer zervikalen Lymphknotenmetastase eines Larynxkarzinoms ^[99, 140]. Da die FaDu-Zellen somit folglich direkt aus einem Karzinom stammen, lässt sich dadurch eine größere Malignität vermuten. Colley *et al.* schildern bei ihren dysplastischen und invasiv karzinösen Modellen, bei denen die Zelllinien FaDu und Cal27 hinzugezogen wurden, das Phänomen des Eindringens von Tumorzellen als Verlust der normalen Zellreifung und unterbrochener Keratinozytendifferenzierung bei gleichzeitiger Infiltration der Tumorzellen durch die Basalmembran ^[98]. Die in Abbildung 7 sichtbaren Verhornungsknospen in der Submukosa wurden ebenfalls von Colley *et al.* als sogenannte Tumorinseln ersichtlich, die das gefährliche invasive Vorgehen der malignen Keratinozyten hervorheben ^[98]. Die ausgefallenen gravierenden Architekturstörungen lassen sich zugleich durch eine immunhistochemische Charakterisierung darstellen, um Informationen zu dem Proliferationsgrad oder der Keratinexprimierung zu erhalten (vgl. Abbildung 12). Da hier lediglich die Immunhistochemie der HLaC79-Tumormodelle durchgeführt wurde und diese schon in der H.E.-Färbung eine geringere Invasivität der Tumorzellen und dadurch eine niedrigere Malignität gegenüber den

FaDu-Tumormodellen aufzuweisen scheinen, ist es an dieser Stelle von großer Bedeutung, diese Ergebnisse mit Resultaten anderer Autoren zu vergleichen. In den HPV-assoziierten Modellen von Buskermolen *et al.* wurde eine gänzlich fehlende Basalmembran zwischen Epithel und Matrix mit gleichzeitiger Ansammlung der Membranproteine Kollagentyp IV und Laminin 5 an atypischen Lokalisationen beschrieben. Ebenfalls zeigte sich in ihren Modellen im Zusammenhang mit einer geringeren Zelldifferenzierung eine reduzierte Zytokeratinexprimierung^[108, 141]. Bei der vorliegenden Arbeit konnten in den HLaC79-Tumormodellen jedoch keine Unterbrechungen im Aufbau der Basalmembran festgestellt werden, welche sich in einer kontinuierlichen Braunfärbung durch den Marker Kollagentyp IV darstellt. Lediglich die Geradlinigkeit der Basalmembran ist in diesen Tumormodellen durch die malignen Keratinozyten zerstört. In Bezug nehmend auf den Proliferationsmarker Ki 67 erkannten Colley *et al.* einen erhöhten Proliferationsindex der basalen, aber auch suprabasalen Zellen, sowohl in ihren Dysplasiemodellen als auch in den invasiven Karzinommodellen, wobei in Letzteren sogar in den submukösen Tumorinseln Ki 67 immunopositive Zellen gefunden wurden^[98], welches sich in den HLaC79-Modellen ebenfalls darstellt. Es erschließt sich folglich die Erkenntnis, dass die *in vitro* hergestellten Tumormodelle Desquamationen des Epithels aufweisen^[96], die für eine funktionslose Einheit mit wenigen Zell-Zell-Kontakten zwischen epithelialen Zellen und Bestandteilen der Basalmembran sorgen^[95]. Diese dadurch verminderte Barriere der Tumormodelle wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der Impedanzspektroskopie und des daraus errechneten TEER-Wertes veranschaulicht (vgl. Kapitel 4.2.2 und 4.3.4). Orale epitheliale Zellen sorgen für eine Bewahrung und Vorbeugung der mikrobiellen und toxischen Invasion in die Blutbahn eines Organismus^[142, 143]. Die dafür verantwortlichen Zell-Zell-Kontakte, Tight junctions, kommen in allen epithelialen Zellen vor^[144] und weisen ihre höchste Dichte in den oberflächlichen Schichten auf^[145]. Meyle *et al.* kultivierten in ihrer Arbeit Millipore-Inserts mit humanen gingivalen Keratinozyten und führten mit einer Silber/Silberchlorid-Elektrode die Impedanzspektroskopie nach 2 Stunden, 4 Stunden und an Tag 1, 2, 3, 9 und 13 durch. Ihre Ergebnisse zeigen gewisse Parallelen zu den gemessenen TEER-Werten der OMÄ in der vorliegenden Arbeit: Ab Tag 4 steigt der transepitheliale elektrische Widerstand, um dann an Tag 13 erneut zu sinken. Die Autoren der Publikation begründen die Abnahme des Widerstandes mit einer Ablösung der

epithelialen Schichten von der Oberfläche der Inserts ^[145]. Auch bei den vorliegenden OMÄ wurde die größte Steigung an Tag 4 nach der ALI-Phase und eine leichte Stagnation des Barriereaufbaus nach Tag 8 registriert. Ob auch bei den OMÄ nach diesem Tag eine Ablösung der basalen epithelialen Schicht von der Lamina propria oder die Ablösung der Lamina propria von der SISmuc vorliegt, bleibt ungewiss. Für die zuletzt genannte Möglichkeit sprechen die Beobachtungen, die bei der Impedanzspektroskopie der HLaC79- und FaDu-Tumormodelle datiert wurden (vgl. Abbildung 8 und Abbildung 13). Diese weisen zwar aufgrund der oben genannten histologischen und immunhistochemischen Beobachtungen mit einem diskontinuierlichen Epithel, fehlenden Tight junctions und zahlreichen Architekturstörungen im Gegensatz zu den OMÄ einen allgemein sehr niedrigen Widerstand auf, dieser stagniert oder sinkt aber auch hier ab Tag 8 nach der ALI-Phase. Zu diesem Entschluss kamen ebenfalls Meyle *et al.*, die die hohe Affinität der Tight junctions zu der Membran oder Matrix zusammen mit der Komplexität der Kontakte untereinander verdeutlichten ^[145]. Mit dem Wissen, dass die FaDu-Tumormodelle histologisch aufgrund ihres teils fehlendem Epithels eine höhere Malignität aufweisen als die HLaC79-Modelle, lassen sich auch die Beobachtungen erklären, dass die Messdaten der FaDu-Modelle einen insgesamt geringeren Widerstand demonstrieren.

Da es in dieser Arbeit von Interesse war, die Ausbreitung und Invasion der Tumorzellen genauestens zu untersuchen, fand eine Markierung mit perimag[®]-Eisenoxidpartikeln und anschließend eine Berliner-Blau-Färbung statt. Erste Erfolge verzeichneten darin Kilian *et al.*, die mesenchymale Stammzellen mit diesem Eisenoxid markierten, dieses über 3 Wochen in den Zellen nachweisen konnten und diese Methode als eine geeignete nichtinvasive Zellidentifizierung einstufen ^[146]. Nachdem die histologische Auswertung der Tumormodelle in dieser Arbeit enttäuschende Ergebnisse lieferte, da lediglich vereinzelte Zellen das Eisenoxid die 10 Tage nach Markierung aufwiesen, wurden Vorversuche in zweidimensionaler Kultivierung unternommen, welche die schnelle Auswaschung des Eisenoxids nur bestätigten (vgl. Kapitel 4.2.3 und 4.3.5). Aus diesem Grund wurden weitere Versuche, die Invasion der Tumorzellen mit vorherigen Zellmarkierungen zu belegen, nicht durchgeführt.

Colley *et al.* schufen mit Hilfe von multizellulären Tumorsphäroiden aus FaDu-Tumorzellen ein Carcinoma in situ. Dieses Tumormodell weist eine hohe

Desorganisation des Epithels auf, besitzt aber dennoch eine intakte Basalmembran ^[98]. Um ein solches dreidimensionales Tumormodell zu schaffen, welches ebenfalls eine Invasion von malignen Zellen darstellt, erfolgte ein Modellaufbau mit PLA-Zylindern aus dem 3D-Drucker (vgl. Kapitel 4.3.6). Ziel war es hierbei, eine Grenzfläche zwischen *in vitro* hergestellter apathologischer Mundschleimhaut und invasivem Plattenepithelkarzinom zu schaffen. Kritisch zu betrachten ist in der vorliegenden Arbeit die zeitliche Trennung der beiden Zellsuspensionen durch den Zylinder. Es kann angenommen werden, dass die hier angesetzten 2 Stunden, in denen der Zylinder die beiden Kompartimente in dem Insert trennte, zeitlich zu lang waren. Die Adhäsion der Zellen an die SISmuc erfolgte dementsprechend bereits nach kurzer Zeit, sodass die Bereiche, in denen der Zylinder in seinem Umfang der Matrix auflag, weder benigne noch maligne Zellen nachweisen. In Zukunft sollte diese Methode optimiert werden. Eine Idee wäre es, den Kontakt zwischen Zylinder und Matrix auf weniger als 2 Stunden zu reduzieren. Falls das Material dieser Zylinder eine reduzierte Schichtdicke akzeptieren würde, wären auch Zylinder mit dünneren Wänden denkbar, um Bereiche ohne Zellen auf der SISmuc verkleinern zu können.

Ein weiterer Bestandteil dieser Arbeit war die Applikation der Medikamente Paclitaxel und Salinomycin in zwei- und dreidimensionaler Kultivierung. Zunächst wurden Monolayer mit jeweils oralen apathologischen Keratinozyten, sowie HLaC79 und HLaC79 Clone 1 Tumorzellen herangezogen, um geeignete Konzentrationen der beiden Medikamente zu finden. Der nächste Schritt war die systemische Applikation des gelösten Paclitaxels in das Medium außerhalb der Zellkronen, um eine Aufnahme durch Diffusion durch die semipermeable SISmuc zu ermöglichen (vgl. Kapitel 4.4). Paclitaxel ist ein Naturprodukt, welches im Jahre 1971 von der Rinde und den Nadeln der Pazifischen Eiche entdeckt wurde ^[147]. Es gehört zu den antimikrotubulären Medikamenten und sorgt in der G2/M-Phase des Zellzyklus für eine Hemmung des Mikrotubuliabbaus und folglich für eine Verminderung der Zellproliferation ^[148]. Die Akkumulation in dieser Zellzyklusphase ist die Phase mit der höchsten Radiosensitivität ^[149, 150], sodass die Behandlung mit Paclitaxel in Kombination mit einer Radiotherapie von diversen Karzinomen bereits an erkrankten Patienten etabliert ist. Anwendung findet das sogenannte Spindelgift bisher in der Therapie beispielsweise von Ovarialkarzinomen ^[151], Mammakarzinomen ^[152] und Zervixkarzinomen ^[153]. Leonard *et al.* applizierten

Paclitaxel in verschiedenen Konzentrationen für 24 bis 48 Stunden auf Monolayer der Plattenepithelkarzinom-Zelllinien SCC-9 und HEP-2 und führten anschließend eine Strahlentherapie durch. Sie kamen zu dem Entschluss, dass die 48-stündige Exposition eine größere Zelltoxizität aufwies, ein synergistischer Effekt zwischen Paclitaxel und anschließender Bestrahlung vorlag und die beste klinische Behandlung von erkrankten Patienten eine Kombination aus täglicher Bestrahlung und täglicher oder wöchentlicher Paclitaxelgabe wäre ^[154]. Elomaa *et al.* registrierten in ihrer Arbeit eine eindeutige Akkumulation der Tumorzellen in der G2/M-Phase nach einer 24-stündige Exposition. Die Wirkung des Chemotherapeutikums Paclitaxel zur Behandlung von Plattenepithelkarzinomen im Kopf- und Halsbereich wurde also hinreichend untersucht und bestätigt. Auch hier erfolgte die Applikation in zweidimensionaler Kultivierung direkt auf die kultivierten Monolayer. Dabei wurde eine Konzentration des Paclitaxels herangezogen, die 100-mal niedriger ist, als jene, die im Blutserum eines behandelnden Patienten nach einer intravenösen Einmalgabe nachgewiesen wird ^[147]. Zusätzlich sollte, im Vergleich zu anderen Autoren, die Auswirkung des Paclitaxels auf apathologische orale Keratinozyten in zweidimensionaler und auf OMÄ sowie auf Tumormodelle in dreidimensionaler Kultivierung getestet werden. Mit Hilfe des MTT-Tests wurde die Zellviabilität nach einer 24-stündigen Exposition mit Paclitaxel dargestellt (vgl. Kapitel 4.4.1.1). Je aggressiver die Konzentration ist, desto stärker ist die Reduzierung der Zellviabilität ^[155]. Diese Hypothese wird durch die vorliegenden Ergebnisse in Abbildung 18 bestätigt, die die starke Abnahme der Viabilität der HLaC79-Tumorzellen in zweidimensionaler Kultivierung veranschaulicht. Das nicht toxische Verhalten gegenüber gesunden Keratinozyten und der paclitaxelresistenten Tumorzelllinie HLaC79 Clone 1 wurde hier ebenfalls veranschaulicht. Auch in dreidimensionaler Kultivierung spricht eine Verringerung der Viabilität im MTT-Test und gleichzeitiger Erhöhung der TEER-Werte nach Paclitaxelgabe für eine effektive Wirkung des Medikamentes (vgl. Kapitel 4.4.3). Dabei wurden weitaus höheren Konzentrationen des Paclitaxels verwendet, um sicherzustellen, dass der Wirkstoff durch den engen Zellverband an den Wirkungsort gelangen kann. Die widersprüchlichen Ergebnisse, die nach der Behandlung mit 500 nM Paclitaxel aufgezeichnet wurden, lassen auf einen Anwendungsfehler schließen. Da in dieser Arbeit lediglich drei biologische Replikate für die Messungen herangezogen wurden, sollten diese für zukünftige Versuche gesteigert werden, um

zusätzlich eventuelle Standardabweichungen zu minimieren. Die histologische Auswertung (vgl. Abbildung 20) der behandelten HLaC79-Tumormodelle zeigt leider keine eindeutigen Unterschiede zu unbehandelten Modellen. Auch ein Vergleich zwischen den unterschiedlich angewendeten Konzentrationen ist nicht möglich. Eine mögliche Erklärung ist die, dass das Paclitaxel mehr als 24 Stunden für die Diffusion durch die SISmuc und den engen Zellverband benötigen könnte. Auch eine mögliche Neuordnung der Zellen und eine Heilung und Regeneration des Gewebes bedarf einer gewissen Zeit. Dies konnte in bisherigen Publikationen bestätigt werden, die sich mit der Wundheilung der Haut befassten ^[156]. Aus diesem Grund sind weitere Versuche mit längerer Medikamentenexposition und anschließender Auswertung notwendig.

Das zweite getestete Medikament, Salinomycin, ist ein aus dem *Streptomyces albus* isoliertes Polyether-Antibiotikum und sorgt durch eine Entgleisung des Elektrolythaushaltes für eine Apoptose der Zelle ^[157, 158]. Gupta *et al.* brachten im Jahr 2009 Salinomycin erstmals mit der möglichen Therapie von Mammakarzinomen in Verbindung. Sie stellten eine 100-mal höhere Wirksamkeit von Salinomycin gegenüber Paclitaxel fest und schufen den Reiz, dieses neue Medikament auch an anderen Tumorzelllinien oder Tumoren *in vitro* zu untersuchen ^[159]. Wang *et al.* entdeckten beispielsweise einen synergistischen Effekt zwischen Salinomycin und 5-Fluoruracil, einem weiteren Zytostatikum, bei der Behandlung von hepatozellulären Karzinomen, indem Salinomycin für eine effektive Hemmung des Zellwachstums sorgt ^[160]. Nach der Behandlung von Zelllinien, die aus nasopharyngealen Karzinomen etabliert wurden, bemerkten Wu *et al.* eine signifikante Reduzierung der Invasion der Tumorzellen bis zur Membran, eine Abnahme der totalen Zellanzahl und eine Architekturstörung mit verringerten Zellschichten in den histologischen Auswertungen ^[107]. Der MTT-Test in der vorliegenden Arbeit lieferte das Ergebnis, dass die Viabilität der Tumorzelllinien HLaC79 und HLaC79 Clone 1 ab einer Konzentration von 5 μM Salinomycin nur noch 30 % beträgt. Ein ähnliches Ergebnis zeigen Kuo *et al.* in ihrer Arbeit zur Anwendung von Salinomycin bei Tumorstammzellen des Plattenepithelkarzinoms im Kopf- und Halsbereich. Bei der 48-stündigen Applikation von 8 μM Salinomycin auf den Monolayer mit JLO-1, einer Tumorzelllinie aus einem Larynxkarzinom, und anschließender Viabilitätsmessung mit Hilfe des MTT-Tests sind lediglich 20 % der Zellen noch vital. Während Kuo *et al.* einen synergistischen zytotoxischen Effekt

zwischen Salinomycin und Cisplatin, sowie Salinomycin und Paclitaxel registrierten ^[161], kamen andere Autoren, wie Basu *et al.* nicht zu dieser Beobachtung. Die zuletzt genannten Autoren begründen die fehlende Synergistik mit einer möglichen Überlagerung der Wirkmechanismen ^[162]. Da hinsichtlich der Medikamentenapplikation in dieser Arbeit das Augenmerk auf den Vergleich von Paclitaxel und Salinomycin gerichtet und keine Kombination beider Medikamente auf die Monolayer und Tumormodelle appliziert wurde, bleibt die Frage nach dem synergistischen Effekt bei HLaC79 und HLaC79 Clone 1 Zellen offen. Da hier jedoch auch wegen der Limitierung an Versuchen, die Applikation von Salinomycin auf die dreidimensionalen Tumormodelle ausblieb, sollte in zukünftigen Versuchen zunächst die Medikamentenwirkung auf histologischer Basis und mit MTT- und TEER-Werten ausgewertet werden, sowie weitere Viabilitätstests durch enzymatische und proliferative Nachweise herangezogen werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die etablierten Methoden der Isolation und Kultivierung von primären oralen Keratinozyten und Fibroblasten und der Modellaufbau von OMÄ durch den Lehrstuhl Tissue Engineering und Regenerative Medizin Würzburg von größter Reproduzierbarkeit überzeugen. Die histologischen Auswertungen decken sich mit bisherigen Ergebnissen. Im Gegensatz dazu sollte die hier angewandte Methode der Isolation von Tumorzellen aus primären Plattenepithelkarzinomen noch einmal überdacht werden. Die mit Hilfe von Tumorzelllinien aufgebauten Tumormodelle müssten hinsichtlich ihrer Herstellung noch mehr etabliert werden, um den Ablauf routinierter zu gestalten. Vor allem die großen histologischen Unterschiede zwischen FaDu- und HLaC79-Modellen lassen noch einige Fragen offen. Die Medikamententestungen erzielten Ergebnisse, die zuvor hypothetisch aufgestellt wurden, jedoch sollte in Zukunft die Erhöhung der biologischen Replikate unabdingbar sein, um möglichst signifikante Ergebnisse zu erzielen.

6 Zusammenfassung

Gegenstand dieser Arbeit war die Etablierung eines dreidimensionalen *in vitro* Tumormodells, welches ein orales *in vivo* Plattenepithelkarzinom nachbilden sollte. Dabei standen Aufbau, Reproduzierbarkeit und Reliabilität an vorderster Stelle. Als Zellquelle sollten sowohl Tumorzellen aus den Zelllinien FaDu, HLaC79 und HLaC79 Clone 1 als auch primäre Zellen aus karzinogenem Primärgewebe dienen. Als Referenz wurden dabei stets Modelle aus primär isolierten Zellen herangezogen, die ein Äquivalent zur gesunden Mundschleimhaut bildeten.

Während der Isolationsvorgang von pathologischen Zellen primärer Plattenepithelkarzinomen aus der Mundhöhle und dem Pharynx aufgrund zahlreicher Kontaminationen und Stagnationen des Zellwachstums keinen Erfolg erzielte und der Versuch eingestellt wurde, war es mit den Tumorzelllinien FaDu und HLaC79 möglich, dreidimensionale *in vitro* Tumormodelle herzustellen. Ihre Malignität wurde durch die besonderen histologischen Architekturstörungen wie die geringere Epitheldicke, das Fehlen einer Parakeratinisierung im Stratum corneum und die Invasion von Tumorzellen in die Submukosa verdeutlicht. Um einen eindeutigen Vergleich zu den Mukosaäquivalenten zu ziehen, fand eine Immunhistochemie mit unterschiedlichen Markern statt, die vor allem den gestörten Epithelaufbau des Tumormodells verdeutlichte. Als Maß für die Zell-Zell-Kontakte, die im Laufe der Kultivierung entstanden, diente der transepitheliale elektrische Widerstand. Dieser stieg bei den Mukosaäquivalenten ab Tag 4 stetig an und gab Aufschluss über die entstandene epitheliale Barriere, die als mechanische und chemische Barriere *in vivo* als Schutz gegenüber traumatischen und toxischen Einflüssen essentiell ist. Im Gegensatz dazu zeigten alle Tumormodelle zwar ebenfalls bis Tag 8 ein Ansteigen des Widerstandes, dieser lag jedoch stets unter den Werten der oralen Mukosaäquivalenten. Dies deutete auf die fehlende Parakeratinisierung und den lockeren Zellverband eines Tumorgewebes hin. Der Grund des deutlichen histologischen Unterschiedes zwischen den FaDu-Modellen und den HLaC79-Modellen ist bis *dato* nicht bekannt. Ein Modell zu schaffen, in dem eine direkte Grenzfläche zwischen benigner und maligner oraler Schleimhaut entsteht, wurde nur zum Teil mit Hilfe eines Zylinders als Trennungskomponente erfolgreich gelöst.

Die Behandlung der Tumorzellen und Tumormodelle mit dem klinisch bewährten Zytostatikum Paclitaxel und dem neuen Polyether-Antibiotikum Salinomycin erzielte vor

Zusammenfassung

allem in der zweidimensionalen Kultivierung große Erfolge. Hier wurde verdeutlicht, dass Paclitaxel toxisch auf die HLaC79 Tumorzellen wirkt, während die paclitaxelresistenten HLaC79 Clone 1 Tumorzellen immun gegen dieses Medikament sind. Salinomycin hingegen sorgte für eine Verringerung der Zellviabilität bei beiden Zelllinien. Die histologischen Untersuchungen nach der 24-stündigen Medikamentenapplikation mit Paclitaxel bei den Tumormodellen zeigten keine signifikanten Unterschiede, während der transepitheliale elektrische Widerstand stieg und auf eine verstärkte Barriere nach Paclitaxelgabe schließen ließ.

Zukünftig ist es von großer Wichtigkeit, die Etablierung der Methode des Modellaufbaus von Tumormodellen aus Tumorzelllinien weiter zu intensivieren, um eine große Reliabilität aufzuweisen. Erst dann besteht die Möglichkeit Auswirkungen von unterschiedlichen Medikamenten *in vitro* zu evaluieren. Der nächste Schritt wäre der Aufbau von Tumormodellen aus individuellen primären Tumorzellen um patientenspezifische Behandlungen vorerst *in vitro* zu testen, damit diese in der klinischen Anwendung etabliert werden können.

Literaturverzeichnis

1. Barnes B., K. Kraywinkel, E. Nowossadeck, I. Schönfeld, A. Starker, A. Wienecke und U. Wolf: *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*; 2016
2. Liek E.: *Der Kampf gegen den Krebs*, J. F. Lehmanns, 1936
3. Orban B., Sicher, Harry: *The oral mucosa*; Journal of dental education V 10 S. P 163, 1946
4. Moharamzadeh K., I. Brook, R. Van Noort, A. Scutt und M. Thornhill: *Tissue-engineered oral mucosa: a review of the scientific literature*; Journal of dental research, 86 (2), S. 115-124, 2007
5. Listgarten M.A.: *The ultrastructure of human gingival epithelium*; Developmental Dynamics, 114 (1), S. 49-69, 1964
6. Nanci A.: *Ten Cate's Oral Histology - E-Book: Development, Structure, and Function*, Elsevier Health Sciences, 2017
7. Schroeder H.E. und J. Hormann: *Orale strukturbiologie*, 1976
8. Schroeder H.E.: *The periodontium*; Vol. 5. Springer Science & Business Media, 2012
9. Schroeder H.E., *2.0 Structure and Differentiation Pattern of Normal Stratified Epithelia*, In *Differentiation of human oral stratified epithelia*. 1981, Karger Publishers. S. 35-156.
10. Garant P.R. und P. Garant: *Oral cells and tissues*; 2003
11. Radlanski R.J.: *Orale Struktur- und Entwicklungsbiologie*, Quintessenz-Verlag, 2011
12. Meyer J. und H. Medak: *Keratinization of the oral mucosa*; Fundamentals of keratinization, (70), S. 81, 1962
13. Lange D.E. und H. Mühlemann: *Zellphysiologie und Funktion des menschlichen Gingivaepithels: morphologische, chemomorphologische und enzymchemische Untersuchungen zur Zytologie der Gingiva und der dentogingivalen Verbindung*, Hanser, 1972
14. Kefalides N.A.: *Basement membranes: structural and biosynthetic considerations*; Journal of Investigative Dermatology, 65 (1), S. 85-92, 1975
15. Karring T. und H. Løe: *The three-dimensional concept of the epithelium-connective tissue boundary of gingiva*; Acta Odontologica Scandinavica, 28 (6), S. 917-933, 1970
16. Becker J., D. Schuppan, E. Hahn, G. Albert und P. Reichart: *The immunohistochemical distribution of collagens type IV, V, VI and of laminin in the human oral mucosa*; Archives of oral biology, 31 (3), S. 179-186, 1986
17. Salonen J., L. Pelliniemi, J.-M. Foidart, L. Risteli und R. Santti: *Immunohistochemical characterization of the basement membranes of the human oral mucosa*; Archives of oral biology, 29 (5), S. 363-368, 1984
18. Berkowitz B., G. Holland und B. Moxham: *Early tooth development*; Oral anatomy, histology and embryology. 3rd edition. Edinburgh: New York Mosby, S. 290-303, 2002
19. Meyer J., C.A. Squier und S. Gerson: *The structure and function of oral mucosa*, Pergamon, 1984
20. Lüllmann-Rauch R.: *Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen*, Thieme, 2006

21. Krzywicki J. und A. Rokicka: *Morphological picture of the oral mucosa. Planimetric studies*; Polish medical journal, 6 (2), S. 520-527, 1967
22. Clausen H., P. Vedtofte, D. Moe und E. Dabelsteen: *Keratin pattern in human oral buccal and hard palate mucosa*; European Journal of Oral Sciences, 91 (5), S. 411-413, 1983
23. Klein-Szanto A. und H. Schroeder: *Architecture and density of the connective tissue papillae of the human oral mucosa*; Journal of anatomy, 123 (Pt 1), S. 93, 1977
24. Orban B.: *Clinical and histologic study of the surface characteristics of the gingiva*; Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, 1 (9), S. 827-841, 1948
25. Kullaa-Mikkonen A. und T. Sorvari: *A scanning electron microscopic study of the dorsal surface of the human tongue*; Cells Tissues Organs, 123 (2), S. 114-120, 1985
26. Barth J., G. Richter und P. Altmeyer: *Dermatologie*, Barth, 1991
27. Howaldt H., H. Vorast, J. Blecher, M. Reicherts und M. Kainz: *Ergebnisse aus dem DÖSAK-Tumorregister*; Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, 4 (1), S. S216-S225, 2000
28. Barnes B. und K. Kraywinkel: *Bericht zum Krebsgeschehen in Deutschland 2016*; 2017
29. Fleitmann S., B. Dohnke, K. Balke, C. Rustler und U. Sonntag: *Frauen und Rauchen*; Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 53 (2), S. 117-124, 2010
30. Schwenzer N. und M. Ehrenfeld: *Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie*, Thieme, 2010
31. Shah J.P. und Z. Gil: *Current concepts in management of oral cancer—surgery*; Oral oncology, 45 (4), S. 394-401, 2009
32. Blot W.J., J.K. McLaughlin, D.M. Winn, D.F. Austin, R.S. Greenberg, S. Preston-Martin, L. Bernstein, J.B. Schoenberg, A. Stemhagen und J.F. Fraumeni: *Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer*; Cancer research, 48 (11), S. 3282-3287, 1988
33. Rothman K. und A. Keller: *The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx*; Journal of chronic diseases, 25 (12), S. 711-716, 1972
34. Brennan J.A., J.O. Boyle, W.M. Koch, S.N. Goodman, R.H. Hruban, Y.J. Eby, M.J. Couch, A.A. Forastiere und D. Sidransky: *Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck*; New England Journal of Medicine, 332 (11), S. 712-717, 1995
35. Ang K.K., J. Harris, R. Wheeler, R. Weber, D.I. Rosenthal, P.F. Nguyen-Tân, W.H. Westra, C.H. Chung, R.C. Jordan und C. Lu: *Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer*; New England Journal of Medicine, 363 (1), S. 24-35, 2010
36. Dahlstrom K.R., K. Adler-Storthz, C.J. Etzel, Z. Liu, L. Dillon, A.K. El-Naggar, M.R. Spitz, J.T. Schiller, Q. Wei und E.M. Sturgis: *Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis*; Clinical Cancer Research, 9 (7), S. 2620-2626, 2003
37. Leemans C.R., B.J. Braakhuis und R.H. Brakenhoff: *The molecular biology of head and neck cancer*; Nature reviews cancer, 11 (1), S. 9, 2011

38. Neville B.W. und T.A. Day: *Oral cancer and precancerous lesions*; CA: a cancer journal for clinicians, 52 (4), S. 195-215, 2002
39. Pindborg J., O. Jølst, G. Renstrup und B. Roed-Petersen: *Studies in oral leukoplakia: a preliminary report on the period prevalence of malignant transformation in leukoplakia based on a follow-up study of 248 patients*; The Journal of the American Dental Association, 76 (4), S. 767-771, 1968
40. Waldron C.A. und W.G. Shafer: *Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias*; Cancer, 36 (4), S. 1386-1392, 1975
41. Casiglia J. und S. Woo: *A comprehensive review of oral cancer*; General dentistry, 49 (1), S. 72-82, 2001
42. Mashberg A. und A. Samit: *Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers*; CA: a cancer journal for clinicians, 45 (6), S. 328-351, 1995
43. Jones A.S., P. Morar, D.E. Phillips, J.K. Field, D. Husband und T.R. Helliwell: *Second primary tumors in patients with head and neck squamous cell carcinoma*; Cancer, 75 (6), S. 1343-1353, 1995
44. Maruccia M., M. Onesti, P. Parisi, E. Cigna, A. Troccola und N. Scuderi: *Lip cancer: a 10-year retrospective epidemiological study*; Anticancer research, 32 (4), S. 1543-1546, 2012
45. Remmerbach T., S. Mathes, H. Weidenbach, A. Hemprich und A. Böcking: *Nichtinvasive Bürstenbiopsie als innovative Methode in der Früherkennung des Mundhöhlenkarzinoms*; Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, 8 (4), S. 229-236, 2004
46. Vokes E.E., R.R. Weichselbaum, S.M. Lippman und W.K. Hong: *Head and neck cancer*; New England Journal of Medicine, 328 (3), S. 184-194, 1993
47. Leslie A., E. Fyfe, P. Guest, P. Goddard und J.E. Kabala: *Staging of squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a comparison of MRI and CT in T- and N-staging*; Journal of computer assisted tomography, 23 (1), S. 43-49, 1999
48. Ghosh S.K., N.J. Roland, A. Kumar, S. Tandon, J.L. Lancaster, S.R. Jackson, A. Jones, H. Lewis Jones, R. Hanlon und T.M. Jones: *Detection of synchronous lung tumors in patients presenting with squamous cell carcinoma of the head and neck*; Head & neck, 31 (12), S. 1563-1570, 2009
49. Denoix P.: *Nomenclature classification des cancers*; Bull. Inst. Nat. Hyg.(Paris), 7 S. 743-748, 1952
50. Uicc T.: *Classification of malignant tumours*; New York: Wiley-Liss, 2002
51. Wittekind C. und J. Bertolini: *TNM-system 2010*; Der Onkologe, 16 (2), S. 175-180, 2010
52. Rodgers L.W., S.P. Stringer, W.M. Mendenhall, J.T. Parsons, N.J. Cassisi und R.R. Million: *Management of squamous cell carcinoma of the floor of mouth*; Head & neck, 15 (1), S. 16-19, 1993
53. Bernier J., C. Domenge, M. Ozsahin, K. Matuszewska, J.-L. Lefèbvre, R.H. Greiner, J. Giralt, P. Maingon, F. Rolland und M. Bolla: *Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer*; New England Journal of Medicine, 350 (19), S. 1945-1952, 2004

54. Bernier J. und J.S. Cooper: *Chemoradiation after surgery for high-risk head and neck cancer patients: how strong is the evidence?*; *The Oncologist*, 10 (3), S. 215-224, 2005
55. Adelstein D.J., Y. Li, G.L. Adams, H. Wagner Jr, J.A. Kish, J.F. Ensley, D.E. Schuller und A.A. Forastiere: *An intergroup phase III comparison of standard radiation therapy and two schedules of concurrent chemoradiotherapy in patients with unresectable squamous cell head and neck cancer*; *Journal of clinical oncology*, 21 (1), S. 92-98, 2003
56. Calais G., M. Alfonsi, E. Bardet, C. Sire, T. Germain, P. Bergerot, B. Rhein, J. Tortochaux, P. Oudinot und P. Bertrand: *Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma*; *Journal of the National Cancer Institute*, 91 (24), S. 2081-2086, 1999
57. Hess V., B. Biedermann und R. Herrmann. *Prinzipien der Chemotherapie: Chemotherapie-Nebenwirkungen und deren Behandlung*. in *Swiss Medical Forum*. 2001. EMH Media.
58. Larkins E., G.M. Blumenthal, W. Yuan, K. He, R. Sridhara, S. Subramaniam, H. Zhao, C. Liu, J. Yu und K.B. Goldberg: *FDA approval summary: Pembrolizumab for the treatment of recurrent or metastatic head and neck squamous cell carcinoma with disease progression on or after platinum-containing chemotherapy*; *The oncologist*, 22 (7), S. 873, 2017
59. Burtneß B., K. Harrington, R. Greil, D. Soulières, M. Tahara, G. De Castro Jr, A. Psyrri, N. Baste Rotllan, P. Neupane und Å. Bratland: *LBA8_PR KEYNOTE-048: Phase III study of first-line pembrolizumab (P) for recurrent/metastatic head and neck squamous cell carcinoma (R/M HNSCC)*; *Annals of Oncology*, 29 (suppl_8), S. mdy424. 045, 2018
60. Kasper C.: *Ersatzteillager Mensch? Tissue Engineering*; *Chemie in unserer Zeit*, 39 (6), S. 394-401, 2005
61. Lindl T. und G. Gstraunthaler: *Zell-und Gewebekultur: von den Grundlagen zur Laborbank*, Spektrum Akad. Verlag, 2008
62. Skalak R. und C.F. Fox: *Tissue engineering: proceedings of a workshop, held at Granlibakken, Lake Tahoe, California, February 26-29, 1988*; Vol. 107. Alan R. Liss, 1988
63. Madden M.R., J.L. Finkelstein, L. Staiano-Coico, C.W. Goodwin, G.T. Shires, E.E. Nolan und J.M. Hefton: *Grafting of cultured allogeneic epidermis on second-and third-degree burn wounds on 26 patients*; *The Journal of trauma*, 26 (11), S. 955-962, 1986
64. Schaefer D., C. Klemt, X. Zhang und G. Stark: *Tissue Engineering mit mesenchymalen Stammzellen zur Knorpel-und Knochenneubildung*; *Der Chirurg*, 71 (9), S. 1001-1008, 2000
65. Noh S., N. Myung, M. Park, S. Kim, S.-U. Zhang und H.-W. Kang, *3D bioprinting for tissue engineering*, In *Clinical Regenerative Medicine in Urology*. 2018, Springer. S. 105-123.
66. Buser D., U. Brägger, N. Lang und S. Nyman: *Regeneration and enlargement of jaw bone using guided tissue regeneration*; *Clinical oral implants research*, 1 (1), S. 22-32, 1990

67. Hillerup S., *Grafting of skin and oral mucosa in the oral and maxillofacial regions*, In *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America, Autogenous Grafting in Oral and Maxillofacial Surgery*. 1994.
68. Takeda K., A. Gosiewska und B. Peterkofsky: *Similar, but not identical, modulation of expression of extracellular matrix components during in vitro and in vivo aging of human skin fibroblasts*; *Journal of cellular physiology*, 153 (3), S. 450-459, 1992
69. Boelsma E., M.C. Verhoeven und M. Ponec: *Reconstruction of a human skin equivalent using a spontaneously transformed keratinocyte cell line (HaCaT)*; *Journal of investigative dermatology*, 112 (4), S. 489-498, 1999
70. Schmalz G., D. Arenholt-Bindslev, K.A. Hiller und H. Schweikl: *Epithelium-fibroblast co-culture for assessing mucosal irritancy of metals used in dentistry*; *European journal of oral sciences*, 105 (1), S. 86-91, 1997
71. Moharamzadeh K., H. Colley, C. Murdoch, V. Hearnden, W. Chai, I. Brook, M. Thornhill und S. Macneil: *Tissue-engineered oral mucosa*; *Journal of dental research*, 91 (7), S. 642-650, 2012
72. Dongari-Bagtzoglou A. und H. Kashleva: *Development of a highly reproducible three-dimensional organotypic model of the oral mucosa*; *Nature protocols*, 1 (4), S. 2012, 2006
73. Izumi K., G. Takacs, H. Terashi und S.E. Feinberg: *Ex vivo development of a composite human oral mucosal equivalent*; *Journal of oral and maxillofacial surgery*, 57 (5), S. 571-577, 1999
74. Ophof R., R.E. Van Rheden, J.W. Von den Hoff, J. Schalkwijk und A.M. Kuijpers-Jagtman: *Oral keratinocytes cultured on dermal matrices form a mucosa-like tissue*; *Biomaterials*, 23 (17), S. 3741-3748, 2002
75. Heck E.L., P.R. Bergstresser und C.R. Baxter: *Composite skin graft: frozen dermal allografts support the engraftment and expansion of autologous epidermis*; *The Journal of trauma*, 25 (2), S. 106-112, 1985
76. Purdue G.F.: *Dermagraft-TC pivotal efficacy and safety study*; *The Journal of burn care & rehabilitation*, 18 (suppl_1_pt_2), S. S13-S14, 1997
77. Eaglstein W.H., M. Iriondo und K. Laszlo: *A composite skin substitute (graftskin) for surgical wounds: a clinical experience*; *Dermatologic Surgery*, 21 (10), S. 839-843, 1995
78. Masuda I.: *An in vitro oral mucosal model reconstructed from human normal gingival cells*; *Kokubyo Gakkai zasshi. The Journal of the Stomatological Society, Japan*, 63 (2), S. 334-353, 1996
79. Moriyama T., I. Asahina, M. Ishii, M. Oda, Y. Ishii und S. Enomoto: *Development of composite cultured oral mucosa utilizing collagen sponge matrix and contracted collagen gel: a preliminary study for clinical applications*; *Tissue engineering*, 7 (4), S. 415-427, 2001
80. Atkinson M.E. und F.H. White: *Principles of anatomy and oral anatomy for dental students*, Churchill Livingstone, 1992
81. Kaiser H., G. Stark, J. Kopp, A. Balcerkiewicz, G. Spilker und H. Kreysel: *Cultured autologous keratinocytes in fibrin glue suspension, exclusively and combined with STS-allograft (preliminary clinical and histological report of a new technique)*; *Burns*, 20 (1), S. 23-29, 1994
82. Schwenzer N. und M. Ehrenfeld: *Chirurgische Grundlagen*, Thieme, 2008

83. Schwenzer N. und U. Eckelt: *Zahn-Mund-Kiefer-Heilkunde: Zahnärztliche Chirurgie : 35 Tabellen / hrsg. von Norbert Schwenzer ; Michael Ehrenfeld. Mit Beitr. von Uwe Eckelt, Thieme, 2009*
84. Wang H.-L. und R.L. MacNeil: *Guided tissue regeneration. Absorbable barriers*; Dental Clinics of North America, 42 (3), S. 505-522, 1998
85. Melcher A.: *On the repair potential of periodontal tissues*; Journal of periodontology, 47 (5), S. 256-260, 1976
86. Patino M.G., M.E. Neiders, S. Andreana, B. Noble und R.E. Cohen: *Collagen as an implantable material in medicine and dentistry*; Journal of Oral Implantology, 28 (5), S. 220-225, 2002
87. Schlegel A., H. Möhler, F. Busch und A. Mehl: *Preclinical and clinical studies of a collagen membrane (Bio-Gide®)*; Biomaterials, 18 (7), S. 535-538, 1997
88. Izumi K., S. Feinberg, A. Iida und M. Yoshizawa: *Intraoral grafting of an ex vivo produced oral mucosa equivalent: a preliminary report*; International journal of oral and maxillofacial surgery, 32 (2), S. 188-197, 2003
89. Luitaud C., C. Laflamme, A. Semlali, S. Saidi, G. Grenier, A. Zakrzewski und M. Rouabhia: *Development of an engineering autologous palatal mucosa-like tissue for potential clinical applications*; Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 83 (2), S. 554-561, 2007
90. Moharamzadeh K., I. Brook, R. Van Noort, A. Scutt, K. Smith und M. Thornhill: *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, 19 (4), S. 1793-1801, 2008
91. Trombetta D., M.R. Mondello, F. Cimino, M. Cristani, S. Pergolizzi und A. Saija: *Toxic effect of nickel in an in vitro model of human oral epithelium*; Toxicology letters, 159 (3), S. 219-225, 2005
92. Vande Vannet B.M.R.A. und J.L. Hanssens: *Cytotoxicity of two bonding adhesives assessed by three-dimensional cell culture*; The Angle Orthodontist, 77 (4), S. 716-722, 2007
93. Vande Vannet B., J.-L. Hanssens und 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, 29 (1), S. 60-66, 2007
94. Fischbach C., R. Chen, T. Matsumoto, T. Schmelzle, J.S. Brugge, P.J. Polverini und D.J. Mooney: *Engineering tumors with 3D scaffolds*; Nature methods, 4 (10), S. 855, 2007
95. Gursoy U.K., M. Pöllänen, E. Könönen und V.J. Uitto: *Biofilm formation enhances the oxygen tolerance and invasiveness of Fusobacterium nucleatum in an oral mucosa culture model*; Journal of periodontology, 81 (7), S. 1084-1091, 2010
96. Andrian E., D. Grenier und M. Rouabhia: *In vitro models of tissue penetration and destruction by Porphyromonas gingivalis*; Infection and immunity, 72 (8), S. 4689-4698, 2004

97. Tobita T., K. Izumi und S.E. Feinberg: *Development of an in vitro model for radiation-induced effects on oral keratinocytes*; International journal of oral and maxillofacial surgery, 39 (4), S. 364-370, 2010
98. Colley H., V. Hearnden, A. Jones, P. Weinreb, S. Violette, S. Macneil, M. Thornhill und C. Murdoch: *Development of tissue-engineered models of oral dysplasia and early invasive oral squamous cell carcinoma*; British journal of cancer, 105 (10), S. 1582, 2011
99. Rangan S.: *A new human cell line (FaDu) from a hypopharyngeal carcinoma*; Cancer, 29 (1), S. 117-121, 1972
100. Chang S.E., S. Foster, D. Betts und W.E. Marnock: *DOK, a cell line established from human dysplastic oral mucosa, shows a partially transformed non-malignant phenotype*; International journal of cancer, 52 (6), S. 896-902, 1992
101. McGregor F., E. Wagner, D. Felix, D. Soutar, K. Parkinson und P.R. Harrison: *Inappropriate retinoic acid receptor- β expression in oral dysplasias: correlation with acquisition of the immortal phenotype*; Cancer research, 57 (18), S. 3886-3889, 1997
102. Gaballah K., D. Costea, A. Hills, S. Gollin, P. Harrison und M. Partridge: *Tissue engineering of oral dysplasia*; The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland, 215 (3), S. 280-289, 2008
103. Costea D.E., A.C. Johannessen und O.K. Vintermyr: *Fibroblast control on epithelial differentiation is gradually lost during in vitro tumor progression*; Differentiation, 73 (4), S. 134-141, 2005
104. Nyström M., G. Thomas, M. Stone, I. Mackenzie, I. Hart und J. Marshall: *Development of a quantitative method to analyse tumour cell invasion in organotypic culture*; The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland, 205 (4), S. 468-475, 2005
105. Scherzed A., S. Hackenberg, K. Froelich, K. Rak, A. Technau, A. Radeloff, U. Nöth, C. Koehler, R. Hagen und N. Kleinsasser: *Effects of salinomycin on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in vitro*; Toxicology letters, 218 (3), S. 207-214, 2013
106. Wang F., L. He, W.-Q. Dai, Y.-P. Xu, D. Wu, C.-L. Lin, S.-M. Wu, P. Cheng, Y. Zhang und M. Shen: *Salinomycin inhibits proliferation and induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo*; PloS one, 7 (12), S. e50638, 2012
107. Wu D., Y. Zhang, J. Huang, Z. Fan, F. Shi und S. Wang: *Salinomycin inhibits proliferation and induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cell in vitro and suppresses tumor growth in vivo*; Biochemical and biophysical research communications, 443 (2), S. 712-717, 2014
108. Buskermolen J.K., C.M. Reijnders, S.W. Spiekstra, T. Steinberg, C.J. Kleverlaan, A.J. Feilzer, A.D. Bakker und S. Gibbs: *Development of a full-thickness human gingiva equivalent constructed from immortalized keratinocytes and fibroblasts*; Tissue Engineering Part C: Methods, 22 (8), S. 781-791, 2016
109. Dongari-Bagtzoglou A. und H. Kashleva: *Development of a novel three-dimensional in vitro model of oral Candida infection*; Microbial pathogenesis, 40 (6), S. 271-278, 2006

110. Lee D.-H. und J.K. Lee: *Establishment of a Cell Line (CNUH-HNSCC-1) Derived from an Advanced Laryngeal Squamous Cell Carcinoma*; Chonnam medical journal, 47 (2), S. 85-89, 2011
111. Neugebauer P., B. Bonnekoh, A. Wevers, O. Michel, G. Mahrle, T. Krieg und E. Stennert: *Human keratinocyte culture from the peritonsillar mucosa*; European archives of oto-rhino-laryngology, 253 (4-5), S. 245-251, 1996
112. Mauch C. und P. Kurschat. *Tumorinvasion und Angiogenese*. 2001. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
113. Rheinwald J.G. und M.A. Beckett: *Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultured from human squamous cell carcinomas*; Cancer research, 41 (5), S. 1657-1663, 1981
114. Irfan Maqsood M., M.M. Matin, A.R. Bahrami und M.M. Ghasroldasht: *Immortality of cell lines: challenges and advantages of establishment*; Cell biology international, 37 (10), S. 1038-1045, 2013
115. Mohammadi M., M.A. Shokrgozar und 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, 78 (10), S. 1897-1903, 2007
116. Mineif A.T. *Entwicklung und Charakterisierung eines humanen oralen Plattenepithelkarzinomäquivalentes*. 2019. DOI: <https://doi.org/10.25972/OPUS-18551>.
117. Southgate J., H. Williams, L. Trejdosiewicz und G. Hodges: *Primary culture of human oral epithelial cells*; Lab Invest, 56 S. 211-223, 1987
118. Maruguchi T., Y. Maruguchi, S. Suzuki, K. Matsuda, K.-I. Toda und N. Isshiki: *A new skin equivalent: keratinocytes proliferated and differentiated on collagen sponge containing fibroblasts*; Plastic and reconstructive surgery, 93 (3), S. 537-544; discussion 545-536, 1994
119. Barreca A., M. De Luca, P.D. Monte, S. Bondanza, G. Damonte, G. Cariola, E. Di Marco, G. Giordano, R. Cancedda und F. Minuto: *In vitro paracrine regulation of human keratinocyte growth by fibroblast-derived insulin-like growth factors*; Journal of cellular physiology, 151 (2), S. 262-268, 1992
120. Moharamzadeh K., I. Brook und R. Van Noort: *Biocompatibility of resin-based dental materials*; Materials, 2 (2), S. 514-548, 2009
121. Polyzois G.: *In vitro evaluation of dental materials*; Clinical materials, 16 (1), S. 21-60, 1994
122. Sisca R., J. Thonard, D. Lower und W. George: *Responses of epithelial-like cells in tissue culture to implant materials*; Journal of dental research, 46 (1), S. 248-252, 1967
123. Kasten F.H., L.F.R. Pineda, P.E. Schneider, H.R. Rawls und T.A. Foster: *Biocompatibility testing of an experimental fluoride releasing resin using human gingival epithelial cells in vitro*; In vitro cellular & developmental biology, 25 (1), S. 57-62, 1989
124. Leirskar J. und K. Helgeland: *A methodologic study of the effect of dental materials on growth and adhesion of animal cells in vitro*; European Journal of Oral Sciences, 80 (2), S. 120-133, 1972
125. Guess W.L., S.A. Rosenbluth, B. Schmidt und J. Autian: *Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers*; Journal of Pharmaceutical Sciences, 54 (10), S. 1545-1547, 1965

126. Wennberg A., G. Hasselgren und L. Tronstad: *A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on millipore filters*; Journal of biomedical materials research, 13 (1), S. 109-120, 1979
127. Theilig C., Y. Tegtmeier, G. Leyhausen und W. Geurtsen: *Effects of BisGMA and TEGDMA on proliferation, migration, and tenascin expression of human fibroblasts and keratinocytes*; Journal of Biomedical Materials Research: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 53 (6), S. 632-639, 2000
128. Borenfreund E. und J. Puerner: *Cytotoxicity of metals, metal-metal and metal-chelator combinations assayed in vitro*; Toxicology, 39 (2), S. 121-134, 1986
129. Browne R. und M.J. TYAS: *Biological testing of dental restorative materials in vitro—a review*; Journal of oral rehabilitation, 6 (4), S. 365-374, 1979
130. Easty D., G. Easty, R. Carter, P. Monaghan und L. Butler: *Ten human carcinoma cell lines derived from squamous carcinomas of the head and neck*; British journal of cancer, 43 (6), S. 772, 1981
131. Rupniak H.T., C. Rowlatt, E.B. Lane, J.G. Steele, L.K. Trejdosiewicz, B. Laskiewicz, S. Povey und B.T. Hill: *Characteristics of four new human cell lines derived from squamous cell carcinomas of the head and neck*; Journal of the National Cancer Institute, 75 (4), S. 621-635, 1985
132. Giard D.J., S.A. Aaronson, G.J. Todaro, P. Arnstein, J.H. Kersey, H. Dosik und W.P. Parks: *In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors*; Journal of the National Cancer Institute, 51 (5), S. 1417-1423, 1973
133. Izumi K., J. Song und S.E. Feinberg: *Development of a tissue-engineered human oral mucosa: from the bench to the bed side*; Cells Tissues Organs, 176 (1-3), S. 134-152, 2004
134. Xiong X., T. Wu und S. He: *Physical forces make rete ridges in oral mucosa*; Medical hypotheses, 81 (5), S. 883-886, 2013
135. Bonnard G.S.M., O. Damour und C. Collombel: *Reconstruction of epidermis on a chitosan cross-linked collagen-GAG lattice: effect of fibroblasts*; Acta Derm Venereol (Stockh), 73 S. 175-180, 1993
136. Costea D.E., O.K. Vintermyr, L.L. Loro, E.A.O. Dimba und A.C. Johannessen: *Crucial effects of fibroblasts and keratinocyte growth factor on morphogenesis of reconstituted human oral epithelium*; Journal of investigative dermatology, 121 (6), S. 1479-1486, 2003
137. Moll R., M. Divo und L. Langbein: *The human keratins: biology and pathology*; Histochemistry and cell biology, 129 (6), S. 705, 2008
138. El Ghalbzouri A. und M. Ponec: *Diffusible factors released by fibroblasts support epidermal morphogenesis and deposition of basement membrane components*; Wound repair and regeneration, 12 (3), S. 359-367, 2004
139. Gillison M.L., A.K. Chaturvedi, W.F. Anderson und C. Fakhry: *Epidemiology of human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma*; Journal of Clinical Oncology, 33 (29), S. 3235, 2015
140. Bier H., W. Bergler, G. Mickisch, H. Wesch und U. Ganzer: *Establishment and characterization of cisplatin-resistant sublines of the human squamous carcinoma cell line HLac 79*; Acta oto-laryngologica, 110 (5-6), S. 466-473, 1990

141. Roesch-Ely M., T. Steinberg, F.X. Bosch, E. Müssig, N. Whitaker, T. Wiest, A. Kohl, G. Komposch und P. Tomakidi: *Organotypic co-cultures allow for immortalized human gingival keratinocytes to reconstitute a gingival epithelial phenotype in vitro*; *Differentiation*, 74 (9-10), S. 622-637, 2006
142. Anderson J. und C. Van Itallie: *Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability*; *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 269 (4), S. G467-G475, 1995
143. Eckert R.L.: *Structure, function, and differentiation of the keratinocyte*; *Physiological reviews*, 69 (4), S. 1316-1346, 1989
144. Schroeder H.: *Ultrastructure of the junctional epithelium of the human gingiva*; *Helv Odontol Acta*, 13 S. 65-83, 1969
145. Meyle J., K. Güttig, G. Rascher und H. Wolburg: *Transepithelial electrical resistance and tight junctions of human gingival keratinocytes*; *Journal of periodontal research*, 34 (4), S. 214-222, 1999
146. Kilian T., F. Fidler, A. Kasten, S. Nietzer, V. Landgraf, K. Weiß, H. Walles, F. Westphal, S. Hackenberg und C. Grütner: *Stem cell labeling with iron oxide nanoparticles: impact of 3D culture on cell labeling maintenance*; *Nanomedicine*, 11 (15), S. 1957-1970, 2016
147. Elomaa L., H. Joensuu, J. Kulmala, P. Klemi und R. Grénman: *Squamous cell carcinoma is highly sensitive to taxol, a possible new radiation sensitizer*; *Acta oto-laryngologica*, 115 (2), S. 340-344, 1995
148. Schiff P.B., J. Fant und S.B. Horwitz: *Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol*; *Nature*, 277 (5698), S. 665, 1979
149. Sinclair W.K.: *Cyclic x-ray responses in mammalian cells in vitro*; *Radiation research*, 33 (3), S. 620-643, 1968
150. Schiff P. und S.B. Horwitz: *Taxol stabilizes microtubules in mouse fibroblast cells*; *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77 (3), S. 1561-1565, 1980
151. McGuire W.P., E.K. Rowinsky, N.B. Rosenshein, F.C. Grumbine, D.S. Ettinger, D.K. Armstrong und R.C. Donehower: *Taxol: a unique antineoplastic agent with significant activity in advanced ovarian epithelial neoplasms*; *Annals of internal medicine*, 111 (4), S. 273-279, 1989
152. Holmes F.A., R.S. Walters, R.L. Theriault, A.U. Buzdar, D.K. Frye, G.N. Hortobagyi, A.D. Forman, L.K. Newton und M.N. Raber: *Phase II trial of taxol, an active drug in the treatment of metastatic breast cancer*; *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 83 (24), S. 1797-1805, 1991
153. Rodriguez M., B.-U. Sevin, J. Perras, H.N. Nguyen, C. Pham, A.J. Steren, O.R. Koechli und H.E. Averette: *Paclitaxel: a radiation sensitizer of human cervical cancer cells*; *Gynecologic oncology*, 57 (2), S. 165-169, 1995
154. Leonard C.E., D.C. Chan, T. Chou, R. Kumar und P.A. Bunn: *Paclitaxel enhances in vitro radiosensitivity of squamous carcinoma cell lines of the head and neck*; *Cancer research*, 56 (22), S. 5198-5204, 1996
155. Osborne R. und M. Perkins: *An approach for development of alternative test methods based on mechanisms of skin irritation*; *Food and Chemical Toxicology*, 32 (2), S. 133-142, 1994
156. Rütter L., L. Bolke, G.R. Schlippe und W.A. Voss: *Hyaluronan als Schlüssel zur schnelleren Wundheilung in humanen 3-D-Vollhautmodellen*; *Der Hautarzt*, 68 (12), S. 987-993, 2017

157. Kinashi H., N. Ōtake, H. Yonehara, S. Sato und Y. Saito: *The structure of salinomycin, a new member of the polyether antibiotics*; Tetrahedron Letters, 14 (49), S. 4955-4958, 1973
158. Miyazaki Y., M. SHIBUYA, H. SUGAWARA, O. KAWAGUCHI, C. HIROSE, J. NAGATSU und S. ESUMI: *Salinomycin, a new polyether antibiotic*; The Journal of antibiotics, 27 (11), S. 814-821, 1974
159. Gupta P.B., T.T. Onder, G. Jiang, K. Tao, C. Kuperwasser, R.A. Weinberg und E.S. Lander: *Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening*; Cell, 138 (4), S. 645-659, 2009
160. Wang F., W. Dai, Y. Wang, M. Shen, K. Chen, P. Cheng, Y. Zhang, C. Wang, J. Li und Y. Zheng: *The synergistic in vitro and in vivo antitumor effect of combination therapy with salinomycin and 5-fluorouracil against hepatocellular carcinoma*; PloS one, 9 (5), S. e97414, 2014
161. Kuo S.Z., K.J. Blair, E. Rahimy, A. Kiang, E. Abhold, J.-B. Fan, J. Wang-Rodriguez, X. Altuna und W.M. Ongkeko: *Salinomycin induces cell death and differentiation in head and neck squamous cell carcinoma stem cells despite activation of epithelial-mesenchymal transition and Akt*; BMC cancer, 12 (1), S. 556, 2012
162. Basu D., K.T. Montone, L.-P. Wang, P.A. Gimotty, R. Hammond, J.A. Diehl, A.K. Rustgi, J.T. Lee, K. Rasanen und G.S. Weinstein: *Detecting and targeting mesenchymal-like subpopulations within squamous cell carcinomas*; Cell Cycle, 10 (12), S. 2008-2016, 2011

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Native parakeratinisierte mastikatorische Schleimhaut.	3
Abbildung 2:	Schematische Darstellung eines parakeratinisierten mehrschichtigen Plattenepithels.	6
Abbildung 3:	Schematische Darstellung des Prinzips des Tissue Engineerings.	17
Abbildung 4:	Zeichnerische Darstellung des PLA-Zylinders zum Aufbau von Tumormodellen.	48
Abbildung 5:	Ablauf der Isolation von Plattenepithelkarzinomzellen aus primär humanem Gewebe.	49
Abbildung 6:	Lichtmikroskopische Aufnahmen der zweidimensionalen Kultivierung von Spender # 97, # 99, # 101 und # 103 nach Isolation der Biopsate von oralen Plattenepithelkarzinomen an Tag 1 und Tag 7.	61
Abbildung 7:	Histologische Charakterisierung durch H.E.-Färbung eines oralen Mukosaäquivalents sowie drei Tumormodellen mit verschiedenen Konzentrationen zwischen primär oralen Keratinozyten und FaDu-Tumorzellen.	65
Abbildung 8:	Darstellung des transepithelialen Widerstands der FaDU-Tumormodelle und des oralen Mukosaäquivalents.	67
Abbildung 9:	Histologische Bilder von FaDu-Tumorzellen nach Durchführung der Berliner-Blau-Färbung mit vorheriger FeO-Markierung (1000 µg / ml) über 48 Stunden.	69
Abbildung 10:	Histologische Charakterisierung durch H.E.-Färbung von HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Tumormodellen und eines OMÄ.	72
Abbildung 11:	Histologische Charakterisierung durch H.E.-Färbung eines oralen Mukosaäquivalents sowie drei Tumormodellen mit verschiedenen Konzentrationen zwischen primär oralen Keratinozyten und HLaC79-Tumorzellen.	74
Abbildung 12:	Immunhistochemische Charakterisierung eines HLaC79-Tumormodells und eines oralen Mukosaäquivalents.	77
Abbildung 13:	Darstellung des transepithelialen Widerstands des HLaC79-Tumormodells und des oralen Mukosaäquivalents.	78

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 14:	Histologische Bilder von HLaC79-Tumorzellen nach Durchführung der Berliner-Blau-Färbung mit vorheriger FeO-Markierung (1000 µg / ml) über 48 Stunden.	80
Abbildung 15:	Histologische Charakterisierung durch H.E.-Färbung eines Tumormodells welches mit Hilfe eines PLA-Zylinders aufgebaut wurde.	82
Abbildung 16:	MTT-Test für die Zellviabilität bei vorheriger 24-stündiger Salinomycin-Behandlung mit Konzentrationen von 1 µM, 5 µM und 10 µM in zweidimensionaler Kultivierung.	85
Abbildung 17:	Lebend-Tot-Färbung von primär oralen Keratinozyten, HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Tumorzellen nach 24-stündiger Behandlung mit 5 µM Salinomycin in zweidimensionaler Kultivierung.	86
Abbildung 18:	MTT-Test für die Zellviabilität bei vorheriger 24-stündiger Paclitaxel-Behandlung mit Konzentrationen von 1 nM, 5 nM und 10 nM in zweidimensionaler Kultivierung.	88
Abbildung 19:	Lebend-Tot-Färbung von primär oralen Keratinozyten, HLaC79- und HLaC79 Clone 1-Tumorzellen nach 24-stündiger Behandlung mit 10 nM Paclitaxel in zweidimensionaler Kultivierung.	89
Abbildung 20:	Histologische Charakterisierung durch H.E.-Färbung der HLaC79-Tumormodelle nach der 24-stündigen Behandlung mit Paclitaxel mit den Konzentrationen von 10 nM, 100 nM, 500 nM und 1000 nM in dreidimensionaler Kultivierung.	92
Abbildung 21:	Darstellung des transepithelialen Widerstands der HLaC79-Tumormodelle nach 24-stündiger Behandlung mit Paclitaxel mit den Konzentrationen von 10 nM, 100 nM, 500 nM und 1000 nM in dreidimensionaler Kultivierung.	94
Abbildung 22:	MTT-Test von HLaC79-Tumormodellen nach 24-stündiger Behandlung mit Paclitaxel mit den Konzentrationen von 10 nM, 100 nM, 500 nM und 1000 nM in dreidimensionaler Kultivierung.	95

Literaturverzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: **Mit Erlaubnis mittels des Rechteinhabers:** Moharamzadeh K., I. Brook, R. Van Noort, A. Scutt und M. Thornhill: *Tissue-engineered oral mucosa: a review of the scientific literature*; Journal of dental research, 86 (2), S. 115-124, 2007 (Abänderung mittels Beschriftung)

Abbildung 2: **Inhaltlich nach:** Lüllmann-Rauch R.: *Taschenlehrbuch Histologie: 10 Tabellen*, Thieme, 2006

Abbildung 3: **Inhaltlich nach:** Noh S., N. Myung, M. Park, S. Kim, S.-U. Zhang und H.-W. Kang, *3D bioprinting for tissue engineering*, In *Clinical Regenerative Medicine in Urology*. 2018, Springer. S. 105-123.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	TNM-Klassifikation eines oralen Plattenepithelkarzinoms	12
Tabelle 2:	UICC-Einteilung des oralen Plattenepithelkarzinoms mit Hilfe der TNM-Klassifikation	14
Tabelle 3:	Geräte	28
Tabelle 4:	Labormaterialien	31
Tabelle 5:	Verbrauchsmaterialien	32
Tabelle 6:	Chemikalien und Lösungen	33
Tabelle 7:	Medien für die Zellkultur	35
Tabelle 8:	Lösungen für die Histologie	37
Tabelle 9:	Primäre Antikörper	38
Tabelle 10:	Puffer und Lösungen für die Immunhistologie	39
Tabelle 11:	Medikamente	40
Tabelle 12:	Software	40
Tabelle 13:	Protokoll der H.E.-Färbung.	51
Tabelle 14:	Protokoll der Berliner-Blau-Färbung.	52
Tabelle 15:	Protokoll der immunhistologischen Färbung mit HRP-basiertem Nachweis.	54
Tabelle 16:	Tabellarische Zusammenfassung der Biopsate von oralen Plattenepithelkarzinomen nach Isolationsversuchen.	58

Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Erstbetreuerin Frau Prof. Dr. Heike Walles für die Überlassung des interessanten Promotionsthemas am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin des Universitätsklinikums Würzburg.

Ein herzlicher Dank geht an Priv.-Doz. Dr. Stephan Hackenberg, meinem Zweitbetreuer, für die Bereitstellung der HLaC-Zellen, die stets freundliche und kollegiale Hilfsbereitschaft sowie für die Vernetzung innerhalb der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten des UKWs.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin und insbesondere bei meiner Arbeitsgruppe bedanken, die mich sofort herzlich aufgenommen und unterstützt hat. Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Angela Rossi für die intensive Betreuung, das reichliche Fachwissen und die zahlreichen produktiven Gespräche. Außerdem danke ich an dieser Stelle Herrn Dr. Florian Groeber-Becker, der Frau Dr. Rossi zuweilen hervorragend vertrat und sich stets um gute Ideen und Verbesserungsvorschläge bemüht hat. Auch bedanke ich mich bei Frau Dr. Maria Steinke, die mich ebenfalls während der experimentellen Phase unterstützte.

Bei dieser Gelegenheit danke ich ebenfalls Herrn Priv.-Doz. Dr. Agmal Scherzad, Herrn Dr. Maximilian Bregenzer und Herrn Priv.-Doz. Dr. Dr. Christian Linz für die Bereitstellung der Biopsien und der damit verbundenen kollegialen Unterstützung.

Zuletzt gilt ein ausdrücklicher Dank meiner Familie. Speziell meinen Eltern danke ich für die finanzielle Unterstützung, die Ermutigungen und die lieben Zusprüche sowohl während des Studiums als auch während der kompletten Promotionsphase. Ein großer Dank außerdem an meine Freunde, die mich fortlaufend mit viel Geduld und Verständnis unterstützt haben.