

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

**Der Einfluss der Induktion von
Tumornekrosefaktor α und Transforming-
Growth-Factor β auf die epithelial-
mesenchymale Transition oraler
Plattenepithelkarzinome im CAM-Assay**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Gaayathiri Suntharalingam

aus

Detmold

Göttingen 2020

Dekan:	Prof. Dr. med. W. Brück
Referent/in	PD Dr. med. Dr. med. dent. P. Kauffmann
Ko-Referent/in:	Prof. Dr. med. J. Wilting
Drittreferent/in:

Datum der mündlichen Prüfung: 18.02.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Der Einfluss der Induktion von Tumornekrosefaktor α und Transforming-Growth-Factor β auf die epithelial-mesenchymale Transition oraler Plattenepithelkarzinome im CAM-Assay" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den

.....

(Unterschrift)

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

Kauffmann P, Troeltzsch M., Brockmeyer P, Bohnenberger H, Heidekrüger PI, Manzke M, Canis M, **Gaayathiri S**, Schliephake H, Prantl L et al. (2018): First experience of chick chorioallantoic membrane (CAM) assay in the clinical work flow with oral squamous cell carcinoma patients. Clin Hemorheol Microcirc 70, 487-494

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Orale Plattenepithelkarzinome	1
1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie	1
1.1.2 TNM-Klassifikation	2
1.1.3 Grading und Tumordicke	4
1.1.4 Therapie.....	5
1.2 <i>Chorioallantoic membrane (CAM) assay</i>	7
1.3 Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT).....	8
1.3.1 Die Marker der EMT	10
1.3.2 Induktoren der EMT	13
1.4 Fragestellung und Untersuchungsschwerpunkte	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 <i>Chorioallantoic membrane assay</i>	24
2.2.2 Einbetten und Anfertigen der histologischen Schnitte	26
2.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung und immunhistochemische Färbung der histologischen Schnitte.....	26
2.2.4 Auswertungsschema der immunhistologischen Schnitte mit dem Adobe Photoshop CS6 Programm	31
2.3 Statistik.....	32
3 Ergebnisse	34
3.1 Expression von E-Cadherin unter Stimulation mit TNF α /TGF β unter Berücksichtigung der T-Kategorie	40

3.2	Expression von Vimentin unter Stimulation mit TNF α /TGF β unter Berücksichtigung der T-Kategorie	42
3.3	Expression von E-Cadherin unter Stimulation mit TNF α /TGF β unter Berücksichtigung der N-Kategorie.....	44
3.4	Expression von Vimentin unter Stimulation mit TNF α /TGF β unter Berücksichtigung der N-Kategorie.....	46
4	Diskussion	49
4.1	Diskussion der Methode.....	50
4.1.1	Anwendung des Hühnerei-CAM-Modells	50
4.1.2	Implantation von humanem Tumorfriischgewebe	52
4.1.3	Nachweis vom humanen Gewebe mittels Humane Leukozyten Antigen (HLA)-Färbung	54
4.1.4	Auswertung der histologischen Schnitte mit Photoshop CS6.....	54
4.2	Diskussion der Ergebnisse	55
4.3	Ausblick	62
5	Zusammenfassung.....	63
6	Quellenverzeichnis	65

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Einteilung der Level der Halslymphknoten nach Robbins et al. (2008).	6
Abbildung 2: Pathologische Aktivierung der EMT und deren Folgen nach Thiery (2002).....	10
Abbildung 3: Die Rolle von β -Catenin innerhalb des E-Cadherin- und Wnt-Signalwegs nach Gall und Frampton (2013).	12
Abbildung 4: TNF- α -Signalweg nach Wu und Zhou (2010).....	14
Abbildung 5: Die Rolle von TGF β bei der Aktivierung der EMT nach Papageorgis (2015).....	18
Abbildung 6: Tumorgewebe auf der CAM.	26
Abbildung 7: Gefärbte histologische Schnitte derselben Tumor-Kontroll-Probe (T2N2b).	27
Abbildung 8: Auswertung der Präparate.	32
Abbildung 9: Altersverteilung der Patienten	35
Abbildung 10: Geschlechterverteilung der Patienten	35
Abbildung 11: N-Kategorien innerhalb der Patientenproben	36
Abbildung 12: Grading innerhalb der Patientenproben	36
Abbildung 13: HLA-Färbungen einer Tumorprobe (T4apN1).....	38
Abbildung 14: Färbungen derselben Tumorprobe (T4apN1) im Vergleich.	39
Abbildung 15: Expression von E-Cadherin unter TNF- α -Stimulation in Bezug auf die T-Kategorie	41
Abbildung 16: Expression von E-Cadherin unter TGF- β -Stimulation in Bezug auf die T-Kategorie	42
Abbildung 17: Expression von Vimentin unter TNF- α -Stimulation in Bezug auf die T-Kategorie	43
Abbildung 18: Expression von Vimentin unter TGF- β -Stimulation in Bezug auf die T-Kategorie	44
Abbildung 19: Expression von E-Cadherin unter TNF- α -Stimulation in Bezug auf die N-Kategorie	45
Abbildung 20: Expression von E-Cadherin unter TGF- β -Stimulation in Bezug auf die N-Kategorie	46
Abbildung 21: Expression von Vimentin unter TNF- α -Stimulation in Bezug auf die N-Kategorie	47

Abbildung 22: Expression von Vimentin unter TGF- β -Stimulation in Bezug auf die N-Kategorie	48
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation der 8. Ausgabe der UICC für Karzinome der Mundhöhle definiert nach Wittekind (2017)	2
Tabelle 2: Stadieneinteilung der Karzinome der Mundhöhle nach Wittekind (2017).....	4
Tabelle 3: Einteilung der fünf Grade des malignen Gewebes nach Wittekind (2017)	4
Tabelle 4: Versuchstiere, Instrumente und Verbrauchsmaterialien	21
Tabelle 5: Geräte und Programme	22
Tabelle 6: Pufferlösungen und Flüssigkeiten.....	23
Tabelle 7: Zytokine, Antikörper und Farbstoffe	23
Tabelle 8: Färbeprotokoll für die HE-Färbung	28
Tabelle 9: Färbeprotokoll für die HLA-Antikörper-Färbung	28
Tabelle 10: Färbeprotokoll für die E-Cadherine-Färbung	29
Tabelle 11: Färbeprotokoll für die Vimentin-Färbung	30
Tabelle 12: Gesamtübersicht des Patientenkollektivs	34
Tabelle 13: EMT Expression entsprechend den T-Kategorien.....	40
Tabelle 14: EMT Expression entsprechend den N-Kategorien	45

Abkürzungsverzeichnis

AAO-HNS	<i>American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery</i>
aqua dest.	destilliertes Wasser
ASHNS	<i>American Society for Head and Neck Surgery</i>
CAM	<i>chorioallantoic membrane</i>
c-Myc	<i>cellular Myelocytomatosis-Gene</i>
cTNM-Klassifikation	klinische TNM-Klassifikation
DAB	<i>3,3`-Diaminobenzidin</i>
E-Cadherin	epitheliales Cadherin
E-cups	Eppendorfcups
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
G	<i>Grading</i>
HE-Färbung	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
IHC	Immunhistochemie
LEF	<i>Lymphoid enhancer factor</i>
MET	mesenchymal-epitheliale Transition
MTA	medizinisch technische Assistentin
n	Anzahl bzw. Umfang der Patientenproben
N	regionäre Lymphknoten
N-Cadherin	neuronaies Cadherin
NF-κB	<i>nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells</i>
OP	Operation
OSCC	orale Plattenepithelkarzinome
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PDX	<i>patient-derived-xenograft</i>
pTNM-Klassifikation	pathologische TNM-Klassifikation
qRT-PCR	real-time reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
R-Smad	<i>receptor-regulated Smad</i>
T	Tumorgröße
TcF	<i>T-cell-Factor</i>
TGF β	<i>Transforming Growth Factor beta</i>
TGF β RI	<i>Transforming Growth Factor beta Rezeptor I</i>

TGF β RII	<i>Transforming Growth Factor beta Rezeptor II</i>
TK	<i>Tyrosinkinase</i>
TNF α	Tumornekrosefaktor alpha
TNFR 1	Tumornekrosefaktor Rezeptor 1
TNFR 2	Tumornekrosefaktor Rezeptor 2
TNM-Klassifikation	Tumor Nodus Metastasen-Klassifikation
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
Wnt	<i>Wingless Int-Gen</i>
ZEB1	<i>Zinc finger E-box-binding homebox 1</i>
ZEB2	<i>Zinc finger E-box-binding homebox 2</i>

1 Einleitung

1.1 Orale Plattenepithelkarzinome

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

Plattenepithelkarzinome gehören zu den häufigsten malignen Tumoren des oberen Aerodigestivtrakts. 4-5 % aller malignen Tumore manifestieren sich in der Mundhöhle, Lippe oder Rachen (Howaldt et al. 2000). In Deutschland liegt die Inzidenz bei ca. 10.000 Neuerkrankungen pro Jahr. Zu den Hauptrisikofaktoren der oralen Plattenepithelkarzinome (*oral squamous cell carcinoma*, OSCC) gehören ein chronischer Alkoholabusus und Tabakkonsum (Balakirski et al. 2014). Der kombinierte Konsum erhöht das Risiko um ein Vielfaches (Rothman und Keller 1972). Neuere Forschungen haben gezeigt, dass auch Humane Papillomviren bei der Entstehung der OSCC von Bedeutung sein können (Rosenquist 2005).

Von den erkrankten Patienten sind 77,2 % männlich. Die Erkrankung tritt vornehmlich im höheren Lebensalter auf, wobei Männer im Alter zwischen 50 bis 60 Jahren und Frauen zwischen 50 bis 75 Jahren betroffen sind (Howaldt et al. 2000). OSCCs treten vornehmlich im Bereich des Mundbodens und am seitlichen Zungenrand auf (Palasz et al. 2017).

Jegliche Veränderungen der Mundschleimhaut im Sinne einer Hyperplasie, einer Farbveränderung, Verhärtung der Schleimhaut oder eines Gewebedefektes können mit dem OSCC einhergehen. Kennzeichnend ist jedoch „ein zentrales Ulkus mit peripherem Randwall und weißlichen (leukoplakischen) Auflagerungen“ zumeist an der Zunge und am Mundboden (DGMKG 2012). Auch großflächige rötliche Läsionen, Erythroplakien genannt, stellen eine Präkanzerose dar (Neville und Day 2002). Symptome wie nicht-heilende Ulcera, Schwellung der Halslymphknoten und Schwierigkeiten beim Schlucken, Kauen oder Sprechen können auf eine fortgeschrittene Erkrankung hindeuten (DGMKG 2012).

Orale Karzinome metastasieren hauptsächlich in die regionären Lymphknoten. Ein Lymphknotenbefall geht mit einer ungünstigeren Prognose einher (Shingaki et al. 2003), die sich zunehmend verschlechtert, sobald Fernmetastasen diagnostiziert werden (Listl et al. 2013).

Die Prognose wird anhand der 5-Jahres-Überlebensrate eingeschätzt, die wiederum mithilfe der TNM (Tumor Nodus Metastasen)-Klassifikation und dem daraus resultierenden Stadium bestimmt wird.

1.1.2 TNM-Klassifikation

Die TNM-Klassifikation erfolgt durch die Vorgaben der Organisation *Union for International Cancer Control* (UICC) und dient zur einheitlichen Einteilung oraler Plattenepithelkarzinome. Dabei beschreibt T0-T4 die Ausdehnung des Primärtumors, N0-N3 steht für das Vorhandensein oder Nicht-Vorhandensein von regionären Lymphknotenmetastasen und M0-M1 gibt an, ob Fernmetastasen vorhanden sind (siehe Tabelle 1) (Wittekind 2017).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation der 8. Ausgabe der UICC für Karzinome der Mundhöhle definiert nach Wittekind (2017)

<i>T – Primärtumor</i>	
<i>TX</i>	<i>Primärtumor kann nicht beurteilt werden</i>
<i>T0</i>	<i>Kein Anhalt für Primärtumor</i>
<i>Tis</i>	<i>Carcinoma in situ</i>
<i>T1</i>	<i>Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung und 5 mm oder weniger maximale Invasionstiefe</i>
<i>T2</i>	<i>Tumor 2 cm oder weniger in größter Ausdehnung und mehr als 5 mm aber nicht mehr als 10 mm maximale Invasionstiefe Tumor mehr als 2 cm aber nicht mehr als 4 cm in größter Ausdehnung und nicht mehr als 10 mm maximale Invasionstiefe</i>
<i>T3</i>	<i>Tumor mehr als 4 cm in größter Ausdehnung oder maximale Invasionstiefe von mehr als 10 mm</i>
<i>T4a</i>	<i>Tumor infiltrierte durch kortikalen Knochen der Maxilla oder Mandibula, in äußere Muskulatur der Zunge (M. genioglossus, M. hyoglossus, M. palatoglossus und M. styloglossus), Kieferhöhle oder Gesichtshaut</i>
<i>T4b</i>	<i>Tumor infiltrierte Spatium masticatorium, Processus pterygoideus oder Schädelbasis oder umschließt die Ateria carotis interna</i>

<i>N – regionäre Lymphknoten</i>		
<i>NX</i>	<i>Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden</i>	
<i>N0</i>	<i>Keine regionären Lymphknotenmetastasen</i>	
<i>N1</i>	<i>Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung ohne extranodale Ausbreitung</i>	
<i>N2</i>	<i>Metastase(n) wie nachfolgend beschrieben:</i>	
	<i>N2a</i>	<i>Metastase(n) in solitärem ipsilateralem Lymphknoten, mehr als 3 cm, aber nicht mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung</i>
	<i>N2b</i>	<i>Metastasen in multiplen ipsilateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung</i>
	<i>N2c</i>	<i>Metastasen in bilateralen oder kontralateralen Lymphknoten, keiner mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung</i>
<i>N3a</i>		<i>Metastase(n) in Lymphknoten, mehr als 6 cm in größter Ausdehnung, ohne extranodale Ausbreitung</i>
<i>N3b</i>		<i>Metastase(n) in einem einzelnen oder multiplen Lymphknoten, klinisch mit extranodaler Ausbreitung</i>
<i>M– Fernmetastasen</i>		
<i>M0</i>		<i>Keine Fernmetastasen</i>
<i>M1</i>		<i>Fernmetastasen</i>

Die präoperative TNM-Klassifikation, deren Bestimmung anhand von klinischen Untersuchungen und bildgebenden Verfahren erfolgt, wird cTNM-Klassifikation genannt. Als pTNM-Klassifikation wird das *Staging* bezeichnet, nachdem postoperativ die histopathologischen Befunde ausgewertet und mitberücksichtigt wurden (Wittekind 2017). Anhand der Befunde und der Einteilung erfolgt die Zusammenfassung der Tumore in Stadien (siehe Tabelle 2), die eine prognostische Aussage erlaubt und über mögliche Therapieformen entscheidet. In der 8. Ausgabe der UICC für Karzinome der Mundhöhle beschreibt Wittekind (2017) die Stadieneinteilung wie folgt:

Tabelle 2: Stadieneinteilung der Karzinome der Mundhöhle nach Wittekind (2017)

<i>Stadium 0</i>	<i>Tis</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
<i>Stadium I</i>	<i>T1</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
<i>Stadium II</i>	<i>T2</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
<i>Stadium III</i>	<i>T3</i>	<i>N0</i>	<i>M0</i>
	<i>T1, T2, T3</i>	<i>N1</i>	<i>M0</i>
<i>Stadium IVA</i>	<i>T4a</i>	<i>N0, N1</i>	<i>M0</i>
	<i>T1, T2, T3, T4a</i>	<i>N2</i>	<i>M0</i>
<i>Stadium IVB</i>	<i>Jedes T</i>	<i>N3</i>	<i>M0</i>
	<i>T4b</i>	<i>Jedes N</i>	<i>M0</i>
<i>Stadium IVC</i>	<i>Jedes T</i>	<i>Jedes N</i>	<i>M1</i>

1.1.3 Grading und Tumordicke

Das *Grading* ist ein weiteres Indiz für die Prognose und die Therapie. Es beurteilt den Differenzierungsgrad des Gewebes. Je schlechter das Tumorgewebe differenziert ist, umso größer ist das Potenzial zur Metastasierung in regionale Lymphknoten, wodurch sich gleichzeitig die Überlebenschance verringert (DGMKG 2012; Shingaki et al. 1988).

Von der UICC wird das maligne Gewebe in fünf Grade eingeteilt (siehe Tabelle 3). Sie gelten für alle Kopf- und Halstumore, jedoch nicht für Schilddrüsentumore und das maligne Schleimhautmelanom. Wittekind (2017) beschreibt die fünf Grade in der 8. Ausgabe der TNM-Klassifikation der UICC folgendermaßen:

Tabelle 3: Einteilung der fünf Grade des malignen Gewebes nach Wittekind (2017)

<i>GX</i>	<i>Differenzierungsgrad kann nicht bestimmt werden</i>
<i>G1</i>	<i>Gut differenziert</i>
<i>G2</i>	<i>Mäßig differenziert</i>
<i>G3</i>	<i>Schlecht differenziert</i>
<i>G4</i>	<i>Undifferenziert</i>

Die Tumordicke spielt eine weitaus größere Rolle bei der Prognosebewertung. Bereits 1970 hat Breslow als einer der ersten die Bedeutung der Tumordicke für die Prognose bei malignen Melanomen beschrieben (Breslow 1970). In den letzten Jahren haben Untersuchungen bestätigt, dass die Tumordicke auch bei oralen Plattenepithelkarzinomen einen

signifikanten Parameter für die Überlebensrate darstellt (Gonzalez-Moles et al. 2002; Larsen et al. 2009). Gonzalez-Moles et al. (2002) haben in ihrer Studie gezeigt, dass die 5-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit einer Tumordicke von 0-3 mm (85,7 %) im Vergleich zu den Patienten mit einer Tumordicke von 4-7 mm (58,3 %) erhöht ist.

Die Intention vieler Untersuchungen besteht darin, den Zusammenhang zwischen Tumordicke und zervikaler Lymphknotenbeteiligung zu bewerten sowie eine Aussage zu treffen, ab welcher Tumordicke eine *Neck-Dissection* erforderlich ist (Huang et al. 2009; Lim et al. 2004)

1.1.4 Therapie

Der Therapieansatz ist abhängig von mehreren Faktoren, wie z. B der Lokalisation und der Größe des Primärtumors, dem allgemeinen Wohlbefinden des Patienten und dem Tumorstadium. Ziel ist es, einen kurativen Behandlungserfolg mit langfristiger Tumorkontrolle zu erreichen, ohne gravierende Verluste in der Ästhetik und Funktion zu verbüßen (DGMKG 2012).

Laut der S3-Leitlinie Mundhöhlenkarzinom, Diagnostik und Therapie der Arbeitsgemeinschaft der wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften e.V. beinhaltet die Behandlungsempfehlung bei „kurativ resektablen Mundhöhlenkarzinomen“ die operative Entfernung des Primärtumors, sofern der Allgemeinzustand des Patienten das chirurgische Vorgehen erlaubt (DGMKG 2012).

Patienten mit fortgeschrittenen Karzinomen ab Stadium III werden multimodal behandelt, indem eine chirurgische Resektion mit einer Strahlentherapie kombiniert wird (Bernier et al. 2004; Fu et al. 2000; Rodgers et al. 1993).

Studien haben gezeigt, dass die ergänzende Chemotherapie die Überlebenschance weiter verbessert, wenn sie im Zusammenhang mit der Bestrahlung angewandt wird (Bernier 2009; Kreppel et al. 2011).

Ein weiterer wichtiger Bestandteil der Therapie ist die Halslymphknotenausräumung (*Neck-Dissection*).

Das Komitee für Kopf-/Halschirurgie und Onkologie der *American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery* (AAO-HNS) hat in Zusammenarbeit mit der *American Society for Head and Neck Surgery* (ASHNS) 1991 eine einheitliche Klassifikation für die *Neck-Dissection* und Halslymphknoten-Level veröffentlicht (Robbins et al. 2002).

Über die Jahre wurde diese Einteilung mehrfach durch Modifizierungen ergänzt. Die aktuellste Klassifikation richtet sich nach der Empfehlung von Robbins im Jahre 2008, die gemeinsam mit dem *Neck-Dissection-Klassifikations-Komitees* der ASHNS erarbeitet wurde (siehe Abbildung 1) (Robbins et al. 2008).

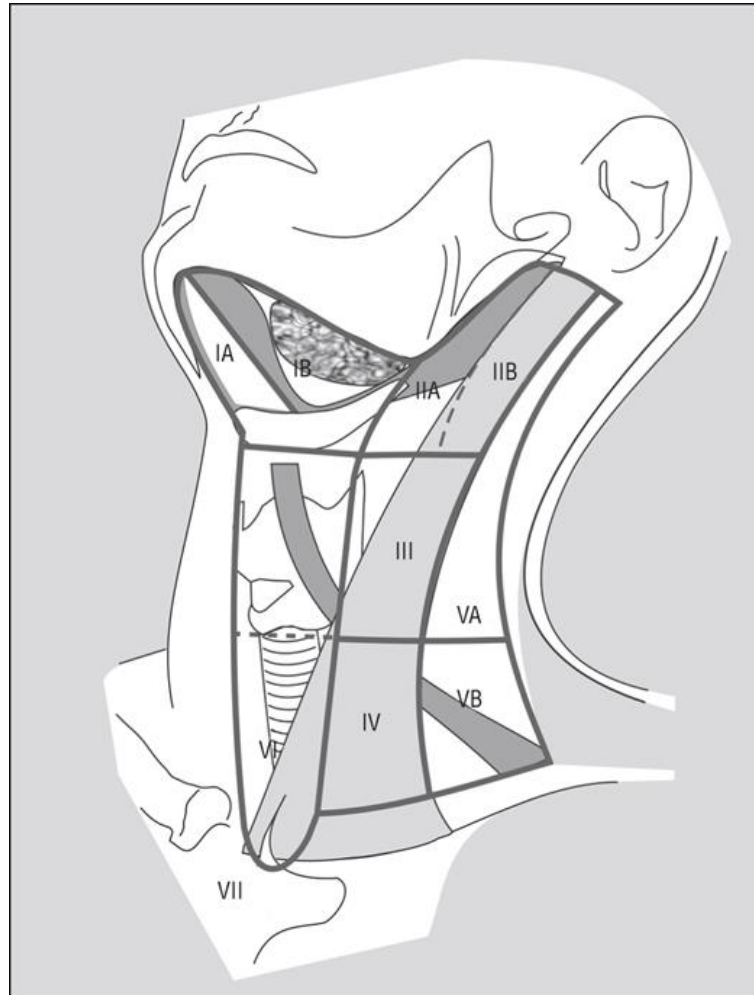


Abbildung 1: Einteilung der Level der Halslymphknoten nach Robbins et al. (2008). Level IA: submentale Lymphknoten; Level IB: submandibuläre Lymphknoten; Level IIA und IIB: obere juguläre Lymphknoten; Level III: mittlere juguläre Lymphknoten; Level IV: untere juguläre Lymphknoten; Level VA und VB: Lymphknotengruppe im posterioren Halsdreieck; Level VI: Lymphknotengruppe im vorderen Kompartiment; Level VII: Lymphknoten des oberen Mediastinums (Robbins et al. 2002; Robbins et al. 2008)

Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von der American Medical Association.

Man unterscheidet vier Variationen der *Neck-Dissection*: Die radikale *Neck-Dissection*, die modifiziert radikale *Neck-Dissection*, die selektive *Neck-Dissection* und die erweiterte radikale *Neck-Dissection* (Robbins et al. 2002).

Bei einer radikalen *Neck-Dissection* werden alle ipsilateralen Lymphknoten in den Leveln I bis V entfernt sowie der Musculus sternocleidomastoideus, der Nervus accessorius und die Vena jugularis interna (Robbins et al. 2002).

Die Ausräumung von zusätzlichen Lymphknotenleveln oder-gruppen und das Heraustrennen von weiteren nicht-lymphatischen Strukturen, wie z. B. Muskeln, Nerven oder Blutgefäße, die nicht in der radikalen *Neck-Dissection* umfasst sind, wird als erweiterte radikale *Neck-Dissection* bezeichnet (Ferlito et al. 2011; Robbins et al. 2002).

Die Level I bis V werden auch bei der modifiziert radikalen *Neck-Dissection* entfernt. Sie unterscheidet sich von der radikalen *Neck-Dissection* darin, dass mindestens eine der drei nicht-lymphatische Strukturen (d. h. Musculus sternocleidomastoideus, Nervus accessorius und Vena jugularis interna) geschont werden (Robbins et al. 2002; Robbins et al. 2008).

Bei der selektiven *Neck-Dissection* bleiben ein oder mehrere Lymphknotenlevel oder -gruppen erhalten, die normalerweise bei der radikalen *Neck-Dissection* ausgeräumt werden. Die zu entfernenden Lymphknotengruppen richten sich nach der Lage des Primärtumors und dessen Metastasierungsmustern (Ferlito et al. 2011; Robbins et al. 2002).

In 20-40 % der Fälle liegen bei oralen Karzinomen okkulte Mikrometastasen vor (Wolff et al. 2012). Meist sind die Level I-III (nach Robbins) betroffen, gelegentlich das Level IV (Hamoir et al. 2014). Daher soll auch bei unauffälligem Lymphknotenstatus und/oder niedriger T-Kategorie eine selektive *Neck-Dissection* vorgenommen werden (Huang et al. 2008).

Beim positiven Lymphknotenbefall kann eine radikale bzw. eine modifizierte radikale *Neck-Dissection* notwendig sein (Chu und Strawitz 1978; Hamoir et al. 2014). Zusätzlich wird bei größerer Ausdehnung des Primärtumors, mittelliniennahen Karzinomen, höherem *Grading* und/oder mehreren Lymphknotenmetastasen auf der ipsilateralen Seite eine selektive Halslymphknotenausräumung auf der kontralateralen Seite diskutiert (DGMKG 2012; Koo et al. 2006)

1.2 Chorioallantoic membrane (CAM) assay

Während der Entwicklung des Hühnerembryos verschmilzt ungefähr zwischen dem fünften und sechsten Tag nach der Inkubation die mesodermale Schicht der Allantoismembran mit der mesodermalen Schicht des angrenzenden Chorionepithels zur *chorioallantoic membrane* (CAM). Es entstehen dadurch drei unterschiedliche Schichten der CAM, die zusammen selten 100 µm überschreiten (Deryugina und Quigley 2008): Das

chorionale Ektoderm, welches an die Schalenmembran angrenzt und stark vaskularisiert ist, die verschmolzene mesenchymale Zwischenschicht, die die Hauptblutgefäße führt und die endodermale Allantois, über die der Gasaustausch zwischen dem Embryo und der Umgebung des Eies im beträchtlichen Maße erfolgt (Leeson und Leeson 1963).

Somit hat die CAM eine respiratorische Funktion und umgibt am zwölften Tag komplett das Embryo (Deryugina und Quigley 2008). Die dabei stark vaskularisierte CAM ist über Allantoisarterien und -venen mit dem embryonalen Blutgefäßsystem verbunden (Fuchs und Lindenbaum 1988).

Der CAM-Assay hat sich bereits seit mehreren Jahren in Experimenten mit xenogenen Tumortransplantaten bewährt und ist von unschätzbarem Wert für In-vivo-Studien (Knighton et al. 1977; Leighton 1964; Storgard et al. 2005).

Hierbei handelt es sich um ein einfaches und effizientes Modell, bei der die CAM von Hühnerembryos für klinische Untersuchungen freigelegt wird, um eine Tumorprobe auf der CAM zu platzieren. Mit diesem Modell ist es unter anderem möglich, das Wachstum von Tumoren und deren Angiogenese zu erforschen (Knighton et al. 1977; Lokman et al. 2012; Ribatti 2016).

Sobald das Tumorpräparat auf die CAM verpflanzt wird, zerfallen die präexistierenden Blutgefäße des heterologen Gewebes innerhalb der ersten 24 Stunden. Nach ca. drei Tagen wird das Tumorgewebe durch Blutgefäße der CAM bzw. des Embryos revaskularisiert (Ausprunk et al. 1975).

Durch die hohe Vaskularisierung der CAM eignet sie sich besonders gut, um das Wachstum der Tumorzellen zu analysieren und die Metastasierung zu verfolgen. Bei diesem Versuchsmodell werden Vorgänge wie die Intravasation, Extravasation und die anschließende Ansiedlung von Tumorzellen zu Metastasen annähernd nachgestellt.

Eine Besonderheit des Versuchssystems stellt die Immundefizienz des Embryos in den ersten Tagen dar. Dies ermöglicht eine Transplantation von Geweben oder Zellen anderer Spezies ohne eine Abwehrreaktion des Wirtes (Ribatti 2016).

Zudem ist anzunehmen, dass der Embryo keine Schmerzempfindungen hat, da die CAM nicht innerviert ist (Ribatti 2016).

1.3 Epithelial-Mesenchymale-Transition (EMT)

Greenburg und Hay haben erstmals 1982 herausgefunden, dass die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) einen wesentlichen Mechanismus beim Gewebeumbau in

der Embryogenese übernimmt (Greenburg und Hay 1982). Diese Transition beschreibt einen Prozess, bei dem epitheliale Zellen ihre Polarität und Zelladhäsion verlieren und in eine invasive mesenchymale Form übergehen (Hay 1995).

Die EMT wird in drei Subtypen eingeteilt: Subtyp 1 findet sich bei der Entstehung des Embryos und bei der Organentwicklung und ist essenziell. Dabei wandern die generierten mesenchymalen Zellen ab und differenzieren sich an ihrem Zielgebiet zu unterschiedlichen Zellen oder zu Epithelzellen zurück. Subtyp 2 wird bei der Wundheilung, Gewebe-neubildung und bei Organfibrosen an Fibroblasten beobachtet. Sie ist mit Entzündungsprozessen verknüpft und lässt nach, sobald die Entzündung abklingt. Bei persistierenden Entzündungsvorgängen kommt es zu einer Organfibrose (Kalluri und Weinberg 2009).

Der Subtyp 3 der EMT beschreibt den Verlust der Zellpolarität epithelialer Zellen und deren funktionellen Übergang zu mobilen mesenchymalen Zellen. Diese Form der EMT wird in neoplastischen Zellen beobachtet, die genetische und epigenetische Veränderungen durchlaufen haben (Kalluri und Neilson 2003; Kalluri und Weinberg 2009). Diese Veränderungen beeinflussen die Onkogene und Tumorsuppressorgene und führen im Zusammenspiel mit dem Regulationskreislauf der EMT zu einer Invasion und Metastasierung von Tumorzellen, die in einer lebensbedrohlichen Tumorprogression resultiert. Einige Zellen des Tumorepithels behalten bei dieser EMT zum Teil epitheliale Merkmale bei und erwerben teilweise mesenchymale Charakteristika, während andere Tumorzellen komplett mesenchymale Eigenschaften annehmen (Kalluri und Weinberg 2009).

Während der Tumorprogression führt diese pathologische Aktivierung der EMT zu einer Auflösung der epithelialen Zellen des Karzinoms aus ihrem Zellverband und zu einer Fragmentierung der Basalmembran. Durch den Verlust der Zellpolarität, wandeln sie sich in mesenchymale Zellen um, werden mobil und migrieren nun durch die Basalmembran. Sie gelangen in die Blut- oder in die Lymphbahn und werden passiv zu den Organen transportiert. Einzelne Tumorzellen können nach dem Verlassen der Blut- oder Lymphbahn Mikrometastasen bilden. Alternativ können die Zellen durch den Umkehrprozess der EMT – die mesenchymal-epitheliale Transition (MET) – sich in die entfernt befindlichen Gewebstrukturen zu einem neuen Tumor formieren (siehe Abbildung 2) (Thiery 2002). Studien haben gezeigt, dass Tumorzellen die gesamte EMT-MET-Kaskade für die Bildung von Fernmetastasen durchlaufen müssen (Zheng und Kang 2014).

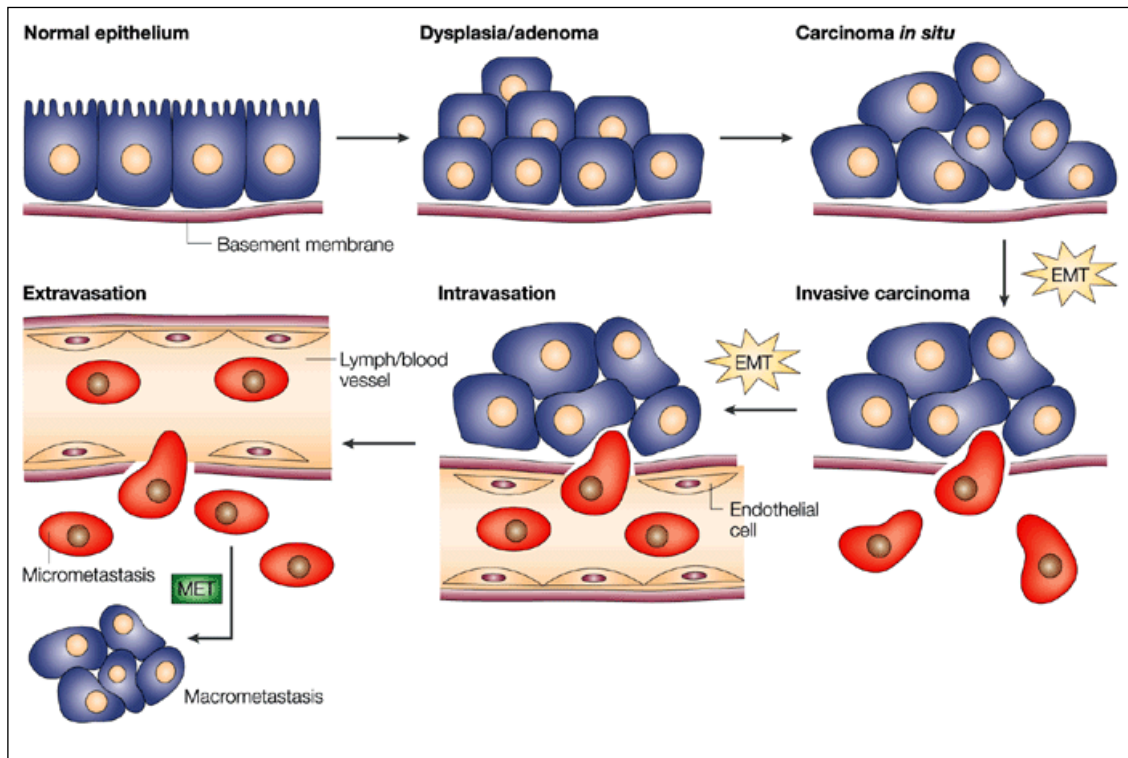


Abbildung 2: Pathologische Aktivierung der EMT und deren Folgen nach Thiery (2002). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature.

Viele Signalwege der EMT in der Embryonalentwicklung gleichen denen der EMT beim Tumorwachstum (Thiery 2002). Kennzeichnend ist dabei der Verlust der Expression des Adhäsionsproteins E-Cadherin, das zur Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten dient (Wellner et al. 2010). Zudem wird eine reduzierte Expression von epithelialen Markern wie Zytokeratin und eine Überexpression von mesenchymalen Markern wie Neuronales(N)-Cadherin, Vimentin und Fibronectin beobachtet (Zheng und Kang 2014).

1.3.1 Die Marker der EMT

Es gibt eine Vielzahl von Biomarkern, die spezifisch für die EMT sind und deren Funktion eine große Rolle bei der Transition spielen (Zeisberg und Neilson 2009). Diese Arbeit beschäftigt sich mit den aus der Literatur bekanntesten EMT-Markern E-Cadherin und Vimentin.

1.3.1.1 Vimentin

Vimentin ist ein Intermediärfilament vom Typ 3. Dieses Protein ist ein Bestandteil des Zytoskeletts und kommt im Zytoplasma mesenchymaler Zellen vor (Eriksson et al. 2009). Die Hauptfunktion von Vimentin besteht in der Stabilisierung und Formgebung der Zellen. Zudem interagiert es mit vielen zytoplasmatischen Strukturen (Eckes et al. 1998).

Bei der EMT kommt es zu einer gesteigerten Produktion von Vimentin (Hay 1995). Aus diesem Grund wird die Vimentin-Expression in der Pathologie als genereller, mesenchymaler Marker für Tumorzellen verwendet, bei denen eine EMT stattgefunden hat (Yang et al. 2004).

Forschungen haben zusätzlich gezeigt, dass die Expression von Vimentin mit einer gesteigerten Invasivität einhergeht (Raymond und Leong 1989), wodurch eine geringere Überlebensrate resultiert (Otsuki et al. 2011; Yamashita et al. 2013)

1.3.1.2 E-Cadherin

Epitheliales(E)-Cadherin ist ein Calciumionen-abhängiges transmembranes Glykoprotein und gehört zu der Superfamilie der Cadherine. Es zählt zu der Untergruppe der klassischen Cadherine, die in Typ I und Typ II unterteilt werden. E-Cadherin gehört zum Typ I der klassischen Cadherine und ist ein wichtiger Bestandteil der Adhärenz junction (Halbleib und Nelson 2006).

Die Adhärenz junction bilden gemeinsam mit den Desmosomen (Macula adherens), *tight junction* und *gap junction* unterschiedliche Formen der Zell-Zell Kontakte, deren Hauptaufgabe unter anderem darin besteht, eine mechanische Verbindung und Kommunikation zwischen den Zellen zu schaffen (Gumbiner 1996; Michaelson und Huang 2012).

E-Cadherin besteht jeweils aus einer N-terminalen (extrazellulär), einer transmembranen und einer C-terminalen Domäne (intrazellulär). Sie vermitteln starke Zell-Zell Kontakte, indem die extrazellulären Domänen benachbarter E-Cadherine miteinander agieren und einen homophilen Zusammenhalt der Epithelzellen schaffen (Islam et al. 1996). Außerdem spielen sie eine entscheidende Rolle bei der Erhaltung der Zellpolarität, der Signalübertragung und der embryonalen Morphogenese (Halbleib and Nelson 2006.)

E-Cadherin ist über die intrazelluläre Domäne mit β -Catenin und somit mit dem Zytoskelett verbunden. Diese Verknüpfung ist essenziell für die Funktionalität und Stabilität von E-Cadherin (Pectasides et al. 2014). Zusätzlich ist das β -Catenin eines der Schlüssel-

regulatoren bei dem Wingless Int-Gen(Wnt)-Signalweg. Dieser Signalweg ist an der Embryonalentwicklung beteiligt und kontrolliert Vorgänge wie die Zellproliferation, Zellmigration und Zelladhäsion (Gall und Frampton 2013).

Die Affinität der Verbindung zwischen β -Catenin und E-Cadherin wird durch Phosphorylierungen moduliert. Die Tyrosinkinase(TK)-Phosphorylierung führt zur Auflösung des Cadherin/Catenin-Komplexes (Behrens et al. 1993; Muller et al. 1999). Zudem führt der Verlust bzw. das Herunterregulieren von E-Cadherin ebenfalls zur Destabilisierung des Cadherin/Catenin-Komplexes (Pectasides et al. 2014). Als Folge wird das membrangebundene β -Catenin ins Zytoplasma freigesetzt (Gall und Frampton 2013). Daraufhin wird das β -Catenin dem Wnt-Signalweg vermehrt zugeführt und reichert sich im Zellkern an (Muller et al. 1999). Dort bildet es einen Komplex mit den Transkriptionsfaktoren der TcF(*T-cell-Factor*)/LEF(*Lymphoid enhancer factor*)-Familie und aktiviert die Transkription von Zielgenen, wie z. B. c-Myc , die eine ungehinderte Zellproliferation herbeiführen (siehe Abbildung 3) (Gall und Frampton 2013; Gottardi und Gumbiner 2001; Huber und Weis 2001).

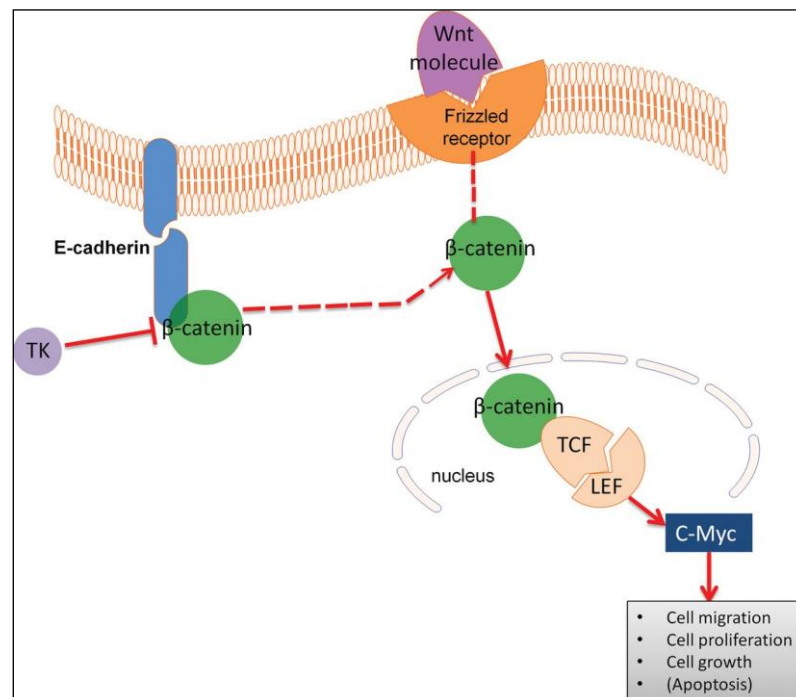


Abbildung 3: Die Rolle von β -Catenin innerhalb des E-Cadherin- und Wnt-Signalwegs nach Gall und Frampton (2013). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von BMJ Publishing Group Ltd.

Mutationen, verminderte Transkription des E-Cadherin-Genes und eine Methylierung des E-Cadherin-Promotors führen zu einer herabgesetzten E-Cadherin-Expression während der Tumorprogression (Rajwar et al. 2015). In Folge dessen kommt es zu einer reduzierten

Zelladhäsion (Hirohashi 1998). Transkriptionsfaktoren wie z. B. Zinc finger protein SNAI2 (Slug), Zinc finger protein SNAI1 (Snail) und Twist sind bekannt dafür, an diesen Promotor zu binden und die Bildung von E-Cadherin zu hemmen. Sie werden daher mit der EMT assoziiert (Smith et al. 2013). Während der EMT und des Tumorwachstums wird E-Cadherin herunterreguliert und die Expression von anderen Cadherintypen, wie z. B. N-Cadherin, gesteigert. Das N-Cadherin kommt nicht im epithelialen Gewebe, sondern im mesenchymalen, neuronalen und endothelialen Gewebe vor (Szarvas et al. 2011).

Dieser Wechsel in der Cadherinexpression, der sogenannte *Cadherin-Switch*, kennzeichnet den Übergang der Gewebestruktur vom epithelialen zum mesenchymalen Typ. Damit verbunden verlieren Tumorzellen ihre epithelialen Gewebemarker und beginnen, mesenchymale Marker zu bilden (Szarvas et al. 2011). Der *Cadherin Switch*, geht mit einem erhöhten Invasionspotenzial einher (Islam et al. 1996). Gleichzeitig korreliert das reduzierte Vorkommen der E-Cadherine mit einem schlechteren Differenzierungsgrad des Tumorgewebes und einer ungünstigen Prognose (Birchmeier und Behrens 1994; Birchmeier et al. 1993; Mattijssen et al. 1993)

1.3.2 Induktoren der EMT

Eine Vielzahl von EMT-Induktoren ist bekannt. Diese Arbeit konzentriert sich auf die Untersuchung der zwei Induktoren Tumornekrosefaktor α (TNF α) und *Transforming Growth Factor β* (TGF β).

1.3.2.1 Tumornekrosefaktor α (TNF α)

TNF α ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das hauptsächlich von Makrophagen sezerniert wird. Es handelt sich hierbei um ein Typ II-Transmembran-Protein mit einem intrazellulären N-Terminus, das gemeinsam mit TNF β zur TNF/TNFR-Superfamilie gehört (Balkwill 2009).

TNF α kommt im Zytoplasma als lösliches Zytokin oder als Protein in der Membran integriert vor. Er ist an der Homöostase des Immunsystems und an lokalen und systemischen Entzündungsprozessen beteiligt (Balkwill 2006).

Die biologische Aktivität von TNF α wird über zwei Rezeptoren ausgeführt: TNF Rezeptor 1 (TNFR 1) ist auf den meisten Zellen aufzufinden und wird über die lösliche und membrangebundene Form von TNF α aktiviert. TNF Rezeptor 2 (TNFR 2) wird auf den hämatopoetischen Zellen ausgebildet und hauptsächlich über die membrangebundene Form aktiviert (Balkwill 2006). Beide Rezeptoren können durch die Bindung von TNF α zwei Signalwege aktivieren: Zum einen können die Signalwege apoptotische Prozesse und zum anderen Entzündungsreaktionen, Zellproliferation und Zellregeneration induzieren (siehe Abbildung 4) (Locksley et al. 2001; Wu und Zhou 2010).

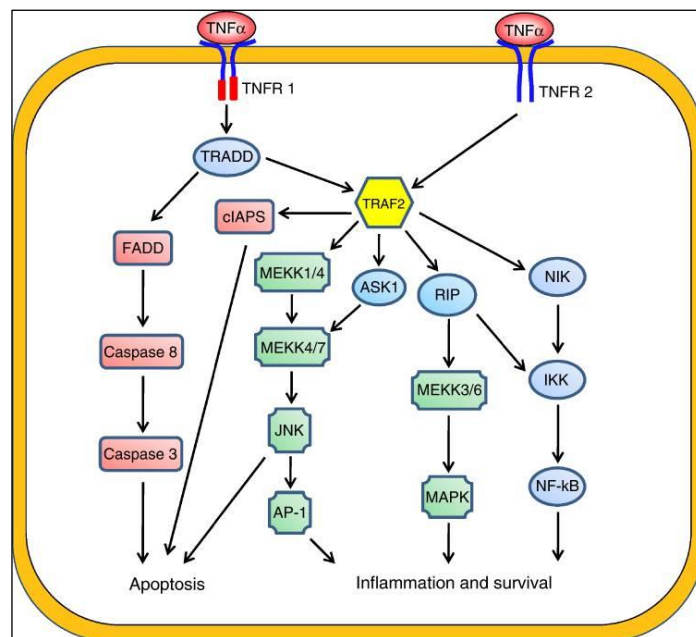


Abbildung 4: TNF- α -Signalweg nach Wu und Zhou (2010). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature (CC BY-NC-SA 3.0).

Der TNFR 1 aktiviert über eine Signalkaskade den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor ,kappa-light-chain-enhancer‘ of activated B-cells*). Dieser Faktor ist von großer Bedeutung für Entzündungsreaktionen, für die Regulierung zahlreicher Proteine der Zellproliferation und -aktivierung und für die Hemmung der Apoptose. Zudem kann der TNFR 1 über die Aktivierung von spezifischen Caspasen apoptotische Prozesse in der Zelle auslösen, wenn eine ungenügende Aktivierung des Faktors NF- κ B vorliegt (siehe Abbildung 4) (Balkwill 2006; Hehlhans und Pfeffer 2005; Krippner-Heidenreich et al. 2002; Wu und Zhou 2010).

TNF α wird als Antwort auf pathogene Stimuli – wie bakterielle und virale Antigene, persistierende Wunden und chemisch-physikalische Noxen – zu Beginn der inflamma-

torischen Zytokin Kaskade ausgeschüttet (Coussens und Werb 2002; Westbrook et al. 2010).

Neben den Makrophagen sind unter anderem Lymphozyten, Killerzellen und maligne entartete Zellen in der Lage, TNF α zu produzieren (Beutler und Cerami 1987; Semenzato 1990). Die unkontrollierte Produktion von TNF α führt zu vielen chronisch entzündlichen Krankheiten (Balkwill 2002).

Mehrere Studien und Beobachtungen belegen, dass ein Zusammenhang zwischen Entzündung und Tumorentwicklung besteht: Viele chronische inflammatorische Krankheiten werden mit einem gesteigerten Risiko für Krebsleiden assoziiert. Tumorentstehung wird an Stellen beobachtet, bei dem chronische Entzündungen vorliegen. Chemische Mediatoren, die bei Entzündungen vorkommen, werden bei vielen Tumoren nachgewiesen. Die Ausschaltung von zellulären oder chemischen Botenstoffen von Entzündungsprozessen können die Tumorentwicklung und -ausbreitung negativ beeinflussen (Balkwill und Mantovani 2001).

TNF α ist einer der Schlüsselmediatoren bei der Tumorentstehung im Zusammenhang mit Inflammationen (Coussens und Werb 2002). Es wurde bewiesen, dass dieser Faktor über den Signalweg, der zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B führt, bei der Entstehung und Entwicklung von humanen Karzinomen beteiligt ist (Pikarsky et al. 2004). Dem Namen entsprechend führt allerdings eine hohe Dosis von lokoregionären TNF α zu einer hämorrhagischen Nekrose, indem die Blutgefäße von den Tumoren zerstört werden (Lejeune et al. 1998). Wird jedoch TNF α chronisch in geringen Mengen in dem Mikromilieu des Krebsgeschwürs produziert, kann es paradoxerweise als endogener Tumorpromoter wirken (Balkwill und Mantovani 2001).

Normalerweise lässt sich TNF α nicht im Plasma oder Serum von gesunden Individuen nachweisen, sondern vornehmlich bei Krebspatienten mit fortgeschrittener Krankheit und schlechter Prognose (Karayiannakis et al. 2001; Szlosarek und Balkwill 2003). Die niedrigen Mengen TNF α im Pikogrammbereich, die sowohl von Tumor- als auch Stromazellen produziert werden, verursachen Schäden an der DNA und haben eine anti-apoptotische sowie proliferationsanregende Wirkung (Balkwill 2006; Coussens und Werb 2002). In In-vitro-Studien wurde festgestellt, dass diese geringen Mengen an TNF α zusammen mit anderen Zytokinen und Chemokinen, wie z. B. Interleukin-1, Interleukin-6, Interleukin-8 oder CC-Chemokinligand 2, chronisch von den Tumorzelllinien sezerniert werden und die Tumorentwicklung fördern. Diese pathologische Sekretion der inflamma-

torischen Zytokine ist einer der Hauptgründe für die Aktivität von NF- κ B in Tumorzellen (Lu und Stark 2004).

Der Transkriptionsfaktor NF- κ B gilt als einer der Hauptfunktionäre in der Tumorgenese. TNF α aktiviert NF- κ B in den Tumorzellen, wodurch die Proliferation und das Überleben der entarteten Zellen gesteigert wird (Luo et al. 2004). Einerseits verhindert NF- κ B den Zelltod von Zellen mit malignem Potenzial, andererseits stimuliert es die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen in den myeloiden und lymphoiden Zellen des Tumorgewebes. Diese Zytokine signalisieren wiederum den Epithelzellen, neoplastische Zellproliferation zu fördern und das Überleben dieser Zellen zu steigern (Perkins 2004).

Zudem kann eine verstärkte Metastasierung in Abhängigkeit von der TNF- α -Produktion in den hämatopoetischen Zellen des Wirtskörpers beobachtet werden (Luo et al. 2004).

Darüber hinaus kann TNF α mit dem *Transforming Growth Factor β* (TGF β) zusammenwirken. Neuere Studien haben unter anderem belegt, dass TNF α die TGF β induzierte EMT in Kolon-Karzinomen unterstützt (Bates und Mercurio 2003).

Wissenschaftliche Studien belegen, dass TNF α die EMT bei Mamma-, Nierenzell-, Prostata- und oralen Plattenepithelkarzinomen induzieren kann (Ho et al. 2012; Soria et al. 2011; Wang und Fang et al. 2013; Zhou et al. 2015).

Bei OSCC wurde beobachtet, dass TNF α eine Aktivierung und Stabilisierung des Transkriptionsrepressors Snail durch die Aktivierung des Signalweges des Transkriptionsfaktors NF- κ B hervorruft und die EMT auslöst (Wu et al. 2009). Die Rolle von Snail bei der EMT-Regulation wurde bei unterschiedlichen Tumorentitäten in mehreren Studien beobachtet (Wang und Wang et al. 2013). Das Snail-Protein ist ein wichtiger Regulator bei der EMT. Es kann in erheblichem Maße die EMT einleiten und unterdrückt zudem die Expression von E-Cadherin (Techasen et al. 2012). Dies führt zu vermehrtem, invasivem Wachstum der Tumorzellen und Metastasierung (Wu et al. 2009; Zhou et al. 2015).

Die Hypothese, dass TNF- α -Antagonisten einen tumorpräventiven Effekt aufweisen, muss noch genauer erforscht werden (Szlosarek und Balkwill 2003). Klinische Studien haben bisher keine eindeutigen Ergebnisse erbracht (Madhusudan et al. 2004; Madhusudan et al. 2005). Eine große Anzahl an Patienten, die eine Therapie mit Anti-TNF- α -Präparaten im Rahmen von chronisch entzündlichen Erkrankung erhalten, werden bezüglich des Risikos für die Entstehung maligner Erkrankungen hinuntersucht (Wolfe und Michaud 2004). Die

derzeitige Datenlage ist unzureichend und daher wird diese These weiterhin kontrovers diskutiert (Bastian und Burmester 2010).

1.3.2.2 Transforming Growth Factor β (TGF β)

Der TGF β ist ein multifunktionelles, regulatorisches Polypeptid und gehört zu einer großen Familie von Zytokinen. Diese Zytokine können mehrere Aspekte der zellulären Funktion kontrollieren und Zellproliferation, -differenzierung, -migration, -adhäsion, Apoptose, Angiogenese und die Kontrolle des Immunsystems regulieren (Jakowlew 2006). Die TGF- β -Familie beinhaltet drei Isoformen: TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3. Davon ist TGF β 1 am häufigsten im humanen Gewebe zu finden (Poniatowski et al. 2015). Die Signale der TGF- β -Isoformen werden über drei mögliche Rezeptoren übermittelt.

In den meisten Geweben erfolgt die Signalübertragung durch die Komplexbildung zweier Rezeptoren (Papageorgis 2015). Der TGF- β -Ligand bindet an den TGF- β -Rezeptor II (TGF β RII) auf der Zelloberfläche und aktiviert mithilfe der Serin/Threonin-Kinase TGF- β -Rezeptor I (TGF β RI). Es erfolgt die Aktivierung eines Signalweges durch Smad-Proteine. Die Signalmoleküle Smad 1, 2, 3, 5 und 8, die receptor-regulated Smad (R-Smad) genannt werden, transportieren durch Phosphorylierung extrazelluläre Signale der Rezeptoren in den Zellkern und regulieren dort die Transkription der Zellen (Shi und Massague 2003).

In Bezug auf die Karzinogenese besteht die physiologische Aktivität von TGF β darin, eine Homöostase zu schaffen und mit dem autonomen Mechanismus die Zellproliferation von entarteten Epithelzellen zu verhindern. TGF β hat somit einen suprimierenden Effekt bei der primären Tumorentstehung (Massague 2008).

Im fortgeschrittenen Tumorstadium findet ein Wechsel von TGF β vom Tumorsuppressor zum Tumorpromotor statt (Jakowlew 2006). Die Tumorzellen werden resistent gegen die wachstumsinhibierenden und Apoptose-induzierenden Effekte von TGF β . Sie verhelfen den Epithelzellen zum malignen Zellwachstum und fördern somit die Tumorprogression (Massague 2008). Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind bisher nicht vollständig erklärt (Stope et al. 2013).

Es wurde beobachtet, dass Mutationen an Genen, die die TGF- β -Rezeptoren oder Smad Proteine kodieren, vermehrt in Kolonkarzinomen und Magenkarzinomen aufgetreten sind (Chung et al. 1996; Markowitz et al. 1995). Jedoch werden diese genetischen Veränderungen nicht bei allen Tumortypen (z. B. Mammakarzinom (Vincent et al. 1996))

beobachtet. Dies verdeutlicht, dass neben den genetischen Veränderungen zusätzlich epigenetische Mechanismen existieren, die eine Resistenz gegen die TGF β -vermittelte Wachstumsinhibition bilden und dem TGF- β -Signalweg eine pro-onkogene Rolle verleihen (Papageorgis 2015).

TGF β spielt des Weiteren eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung der EMT, indem das Zytokin über den Smad- oder Non-Smad-Signalweg die Expression von mehreren Transkriptionsfaktoren herbeiführt (Nagaraj und Datta 2010). Diese Faktoren sogenannte „Masterregulatoren“ der EMT sind unter anderem Snail, Slug, *Zinc finger E-box-binding homebox 1* (ZEB1) und *Zinc finger E-box-binding homebox 2* (ZEB2) (Cano et al. 2000; Comijn et al. 2001; Eger et al. 2005; Savagner et al. 1997). Dies führt zu einer verminderten Expression des epithelialen Markers E-Cadherin und einer gesteigerten Expression des mesenchymalen Markers Vimentin (Wellner et al. 2010). Als Folge kommt es zum Verlust der Adhärens- und *tight junctions* und die Zellen erlangen ein bewegliches, invasives Potenzial. Sie gelangen in die Blutbahn und können auf diese Weise Fernmetastasen bilden (siehe Abbildung 5) (Papageorgis 2015).

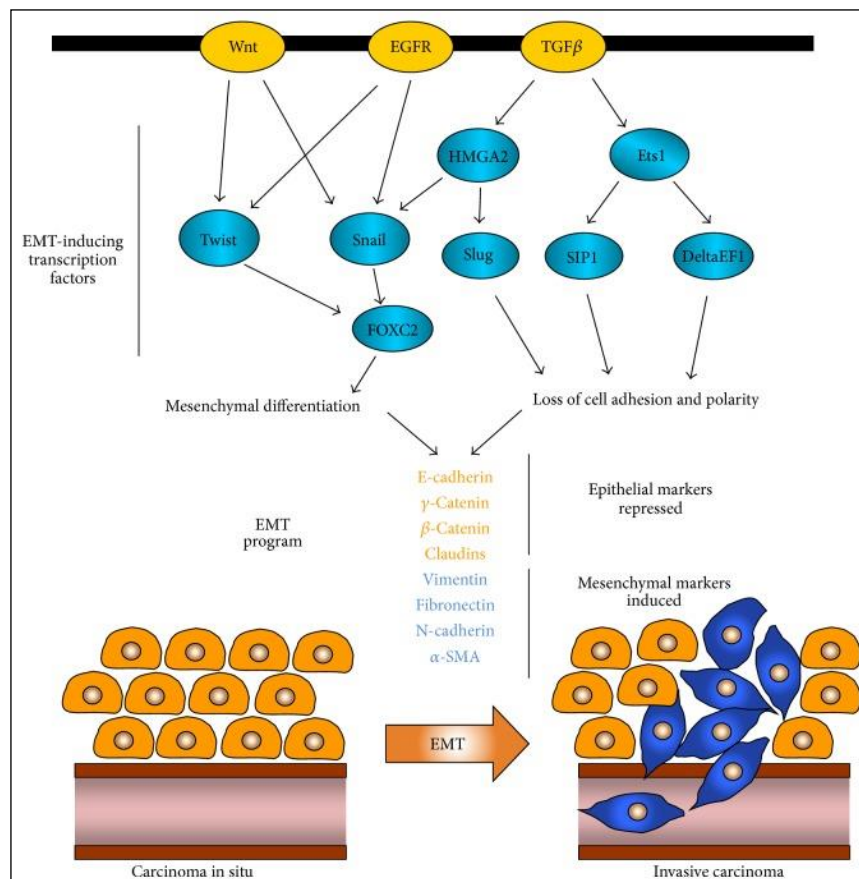


Abbildung 5: Die Rolle von TGF β bei der Aktivierung der EMT nach Papageorgis (2015). Die Verwendung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Panagiotis Papageorgis (CC BY 3.0).

Zudem sind Tumorzellen auch im Stande, TGF β zu sezernieren. Die gesteigerte Produktion fördert zum einen die Angiogenese des Tumorgewebes und vermindert die Funktion des Immunsystems, wodurch dem Tumor ein Wachstums-Vorteil verschaffen wird (Gold 1999). Zusätzlich geht ein erhöhter Serumspiegel von TGF β mit einer schlechten Prognose und einem gesteigerten Metastasierungsverhalten einher (Saito et al. 2000).

Durch die zweigeteilte Funktion von TGF β einerseits als Tumorsuppressor und andererseits als Tumorpromoter werden die Mediatoren des TGF- β -Signalwegs als vorhersehbare Biomarker für die fortschreitende Tumorgenese gesehen. Zudem bieten die Mediatoren mögliche Ziele für die Prävention und Therapie von Tumorerkrankungen und Metastasenbildung (Jakowlew 2006).

1.4 Fragestellung und Untersuchungsschwerpunkte

Mit dieser experimentellen Arbeit soll die Etablierung des CAM-Assays zur Beobachtung des Einflusses der Induktion von $\text{TNF } \alpha$ und $\text{TGF } \beta$ auf die EMT von humanem Gewebe oraler Plattenepithelkarzinome untersucht werden. Die Auswirkung einer Induktion wird anhand der charakteristischen EMT-Marker E-Cadherin und Vimentin bewertet.

Der derzeitige Forschungsstand beläuft sich darauf, dass xenogene Tumortransplantate oder humane Tumorzellen auf die CAM verpflanzt werden. Bei dieser Arbeit wurde stattdessen humanes Frischgewebe von oralen Plattenepithelkarzinomen für die Implantation auf der CAM verwendet, um die Tumormikroarchitektur zu erhalten.

Diese Arbeit soll zeigen, ob humanes Tumorfriechgewebe von OSCC auf der CAM anwächst und inwiefern dieses Modell zur Untersuchung dieser Tumorproben geeignet ist. Zudem soll diese experimentelle Studie Aufschluss darüber geben, ob das CAM-Modell in dieser Form mit den verwendeten Untersuchungsmethoden in der Lage ist das Tumorstadium und die EMT anhand der Marker E-Cadherin und Vimentin adäquat abzubilden. Das Ziel dieser Studie ist zu überprüfen, ob sich der CAM-Assay als ein zuverlässiges und sicher funktionierendes In-vivo-Modell zur Untersuchung von Tumorproben des OSCC in den klinischen Arbeitsablauf integrieren lässt.

Durch die Etablierung des Workflows könnten auf diese Weise histologische und molekularbiologische Untersuchungen an Tumoren unter Erhalt der Tumorarchitektur erfolgen und gegebenenfalls individuelle Therapiemöglichkeiten getestet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Tabelle 4: Versuchstiere, Instrumente und Verbrauchsmaterialien

Versuchstiere / Instrumente / Verbrauchsmaterialien	Hersteller / Vertrieb
befruchtete Hühnereier	diverse Bauernhöfe Landkreis Göttingen
Handschuhe	Rösner-Mautby Meditrade GmbH Kiefersfelden
Mundschutz	Farster medical Barsbüttel
Tape 3M™ Durapore™	3M Medica Neuss
Desomed	Dr. Schumacher GmbH, Malsfeld
Meliseptol	B. Braum Melsungen AG
Schere	Allgaier Instrumente GmbH, Frittlingen
Pinzette	Aesculap, Tuttlingen
Petrischale	Sarstedt, Newton
Eppendorf(E)-cups	Eppendorf Safe-Lock Tubes, Eppendorf AG
Cups formalinhaltig	KABE Labortechnik GmbH, Nürnberg
Eierhalter	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß
Gewebeeinbettkassetten	Thermo Scientific, Kalamanzoo
Einbettvlies	Vogel Medizinische Technik und Elektronik GmbH & Co. KG, Fernwald
Objektträger Superfrost Plus	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Tissue Tek® Eindeckfolie	Sakura Finetek Europe B.V., Niederlande
Pinsel Pinsel 613F Größe 14	Pelikan Holding AG, Schweiz
Pinsel Pinsel 711150 Größe 7	Pelikan Holding AG, Schweiz
Thermometer	Amarell, Kreuzwertheim
Klinge	Wilkinson, Solingen
Pipette	Eppendorf AG, Hamburg
Spritze	Becton Dickinson S.A., Spanien

Versuchstiere / Instrumente / Verbrauchsmaterialien	Hersteller / Vertrieb
Roti Coll Einkomponenten-Sekundenkleber	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
Pipettenspitzen mit Filter	Starlab GmbH, Hamburg Sarstedt Nümbrecht
Kanüle	Becton, Dickinson and Company Limited, Ireland
Skalpell	Feather, Japan

Tabelle 5: Geräte und Programme

Geräte / Programme	Hersteller
Brutschrank BSS 300 MP GTFS Brutgerät	Grumbach, Asslar
Vibratom Leica VT 1200S	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie, Wetzlar
Rotationsmikrotom	Reichert, jetzt Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH Mikroskopie und Histologie, Wetzlar
Paraffinstreckbad	GFL, Burgwedel
Wärmeplatte	Medax GmbH & Co.KG, Neumünster
Wärmeschrank	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Gefrierschrank -18° C	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß
Gefrierschrank -80° C	Thermo Fischer Scientific Inc., Massachusetts, USA
Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Kamera	Asia Motic Hong Kong
Dotslide	Bio Vision Systems, Kansas, USA
<i>Adobe Photoshop CS6</i>	Adobe System Software, Ireland Ltd.
<i>GraphPadPrism Computersoftware 5</i>	Graphpad Software Inc., California, USA

Tabelle 6: Pufferlösungen und Flüssigkeiten

Pufferlösungen /Flüssigkeiten	Hersteller
Formaldehyd 37 % verdünnt mit destil- tem Wasser auf 4 %	Chemievertrieb Hannover
PBS	Sigma-Aldrich, USA
Natriumchlorid 0,9 %	B.Braun, Melsungen AG
Ethanol 99% unvergällt	Th. Geyer Ingredients GmbH & Co. KG, Höxter
Xylol	Avantor Performance Materials, Poland
Wash-Buffer (20x) Dako Omnis	Dako Denmark A/S, Dänemark
<i>Target Retrieval Solution, pH 6 (50x)</i> <i>(Dako Omnis)</i>	Dako Denmark A/S, Dänemark
<i>EnVision FLEX Antibody Diluent</i>	Dako Denmark A/S, Dänemark

Tabelle 7: Zytokine, Antikörper und Farbstoffe

Zytokine / Antikörper / Farbstoffe	Hersteller
Mayers Hämalanlösung	Merck KGaA, Darmstadt
Eosin gelblich	Merck KGaA, Darmstadt
<i>Anti-HLA Class I ABC antibody [EMR8-5]</i>	Abcam plc, UK
Flex E-Cadherine NCH-38, Mo a Hu	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
Flex Vimentin (V9), Mo a Hu	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
<i>EnVision FLEX, High pH (Dako Omnis)</i> <i>Convenience Kit</i>	Agilent Technologies, Inc., California, USA
Hämatoxylin (Dako Omnis)	Dako, Denmark A/S
Tumornekrosefaktor α	Peptotech, New Jersey, USA
<i>Transforming-Growth-Factor β</i>	Peptotech, New Jersey, USA

2.2 Methoden

2.2.1 *Chorioallantoic membrane assay*

Für dieses wissenschaftliche Projekt wurden die befruchteten Eier regelmäßig von der medizinisch technischen Assistentin (MTA) der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie aus den umliegenden Bauernhöfen im Raum Göttingen beschafft und ins Labor des Uniklinikums gebracht. Jeden Dienstag und Mittwoch wurden in der Regel 30 Eier vorbereitet: Dafür wurden sie mit Desomed-Tüchern abgewischt und in den Brutschrank auf Schienen mit besonderen Rolleinlagen gelegt. Auf diesen Schienen wurden die Eier bei 37,8° C und bei einer Luftfeuchtigkeit von 26 % stetig gedreht. Am vierten Tag, d. h. am Freitag und Sonntag wurden die Eier herausgenommen und gefensterst.

Dabei wurden die Eier zunächst mit Meliseptol desinfiziert und an der unteren abgerundeten Seite ein Klebestreifen befestigt. Mit einer spitzen Schere wurde durch den Klebestreifen in die Eierschale hindurch gestochen und ein quadratisches Fenster mit einem Durchmesser von ca. 1,5 cm innerhalb des abgeklebten Bereichs herausgeschnitten. Da sich an der Stelle die Luftblase befindet und die Eierschale mit einem Klebestreifen fixiert ist, zerbricht sie bei diesem Schritt nicht. Die Luft entweicht und die CAM sinkt ab. Um die Öffnung zu schließen und ein Austrocknen der CAM zu verhindern, wurde die Stelle mit einem zweiten Klebestreifen dicht verschlossen. Die Eier wurden auf Eierhalter aus handelsüblichen Kühlschränken hochkant platziert und stabil in den Brutschrank gelagert.

Am Tag der Operation (OP) bei dem ein OSCC entfernt wird – d. h. am siebten Tag nachdem die Eier in den Brutschrank gelegt wurden – wurde der Operateur der Universitätsmedizin Göttingen in der Klinik Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie oder in der Abteilung Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde und der diensthabende Pathologe informiert, dass eine native Probe für die wissenschaftliche Arbeit gebraucht wird. Eine Einverständniserklärung der Patienten zur Entnahme einer kleinen Probe für die wissenschaftliche Studie lag vor. Patienten mit einem Residualtumor oder einer bereits durchgeführten Chemo- oder Strahlentherapie wurden von der Studie ausgeschlossen. Die Zustimmung der Ethikkommission für die hier beschriebene Studie liegt vor. Die Antragsnummer des Ethikvotums lautet 16/4/15.

Nachdem der Pathologe aus dem zentralen Anteil des nativen Tumorpräparates ein kleines Stück herausgeschnitten hat, wurde diese ca. 1x1x1 cm³ große Probe mit dem Vibratom

geschnitten. Dabei wurde die Tumorprobe mit Gewebekleber (Einkomponenten Sekundenkleber) auf eine runde Metallplatte befestigt und in das Vibratom fixiert. Das Präparat wurde in der phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) platziert und mit einem Vibratom in 350 µm dicke Scheiben geschnitten. Die Probe wurde mit einer Geschwindigkeit von 3 mm/s geschnitten und in dem Nährmedium PBS für den Transport gelagert.

Jeweils eine Probe wurde auf die Membran eines befruchteten Eies gelegt, sofern eindeutig Blutgefäße und leicht Bewegungen des Embryos zu sehen waren (siehe Abbildung 6 links). Danach wurde die Öffnung wieder mit einem Klebestreifen zugeklebt und in den Brutkasten gestellt. Nach zwei Tagen waren die Tumore mit der Membran verwachsen und wurden vom Embryo mit Nährstoffen versorgt. Es wurde zum ersten Mal 250 µl TNF α oder TGF β in einer Konzentration von 10 ng/250 µl durch topische Applikation induziert. Zuvor wurde die Stammlösung von 10 µl TNF α oder 10 µl TGF β in einer Konzentration von 100 ng/µl soweit verdünnt, dass die gewünschte Konzentration erreicht werden konnte. Dafür wurde zu den 10 µl der Stammlösung 90 µl sterilisiertes 0,9 %iges Natriumchlorid (NaCl) hinzu pipettiert. Aus dieser Lösung wurden 4 µl entnommen und in 1 ml NaCl versetzt, sodass eine Konzentration von 40 ng/1000 µl erreicht wurde. Aus dieser Endlösung wurden jeweils 250 µl auf die CAM appliziert. In den Kontrolleiern wurden zum gleichen Zeitpunkt 250 µl NaCl hineinpipettiert. Das Fenster wurde wiederum mit einem Klebestreifen verschlossen und die Eier in den Brutschrank zurückgelegt. Nach zwei und vier Tagen wurde die Induktion wiederholt.

Am Tag nach der dritten Induktion – am 14. Tag – wurden die Tumorproben explantiert (siehe Abbildung 6 rechts). Mit einer sterilen Schere wurde der Tumor mit der umliegenden, angewachsenen CAM aus der Membran geschnitten und in Tubes, die mit 4 %iger Formalinlösung gefüllt waren, hineingelegt. Zum Schluss wurden die Hühnerembryonen dekapitiert.

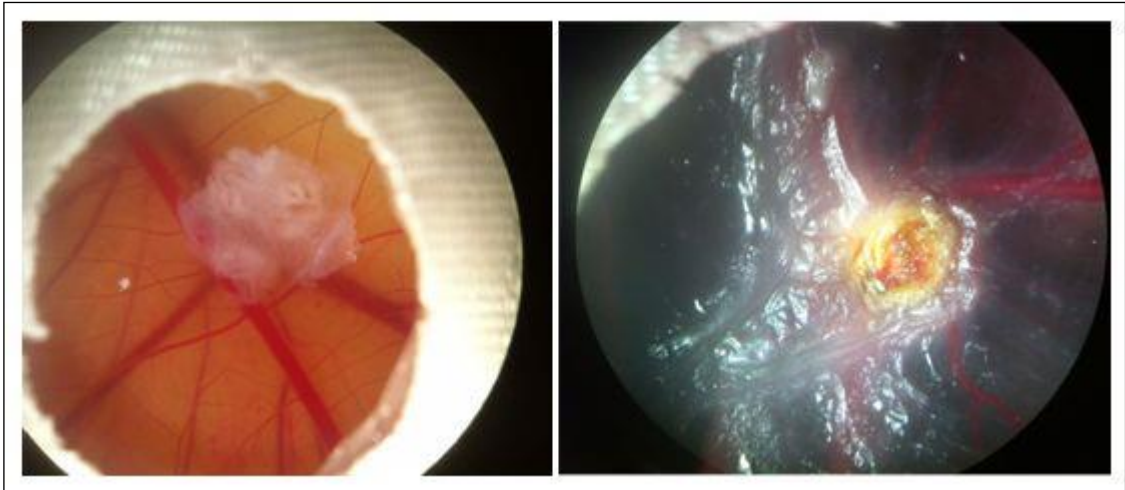


Abbildung 6: Tumorgewebe auf der CAM. links: Hühnerei am Tag der Implantation des Tumorgewebes; rechts: Hühnerei am Tag der Explantation des Tumorgewebes

2.2.2 Einbetten und Anfertigen der histologischen Schnitte

Die Tumorproben wurden von den MTAs der Abteilung Pathologie in Paraffin eingebettet. Bevor die entstandenen Paraffinblöcke von der MTA der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie geschnitten werden konnten, mussten sie mindestens eine Stunde im Gefrierfach bei -18°C gekühlt werden. Dadurch wurde das Schneiden erleichtert. Parallel wurde ein Wärmebad angesetzt, das auf 46°C aufgeheizt wurde, und eine Wärmeplatte ebenfalls auf 46°C vorbereitet.

Nach dem Kühlen wurden nacheinander die Paraffinblöcke herausgenommen und in das Rotationsmikrotom eingespannt. Die Paraffinblöcke wurden angeschnitten und so viel Paraffin abgetragen, dass eine glatte Schnittfläche entstand. Danach wurden vorsichtig durch das Drehen der Handkurbel Schnitte in einer Schichtdicke von $2\ \mu\text{m}$ angefertigt. Die Schnitte wurden ins Wasserbad überführt, das vorher auf 46°C vorgewärmt wurde. Durch die Wärme haben sich die Paraffinschnitte ausgedehnt, sodass sie nun auf die Objektträger aufgezogen und zum Trocknen auf die vorgewärmte Wärmeplatte gelegt wurden. Im Anschluss wurden die Schnitte im Wärmeschrank bei 40°C über Nacht getrocknet.

2.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung und immunhistochemische Färbung der histologischen Schnitte

Aus jedem Paraffinblock wurden mindestens vier Schnitte angefertigt. Zunächst wurde mit dem ersten Schnitt eine Hämatoxylin-Eosin(HE)-Färbung durchgeführt.

In dem zweiten Schnitt wurde das *Human Leukocyte Antigen*(HLA)-Antikörper angefärbt um das humane Geweb – den Primärtumor – in den Proben zu identifizieren. In dem zweiten Schnitt wurde Vimentin als Marker für den mesenchymalen Phänotyp und im dritten Schnitt E-Cadherin als Marker für den epithelialen Phänotyp angefärbt (siehe Abbildung 7).

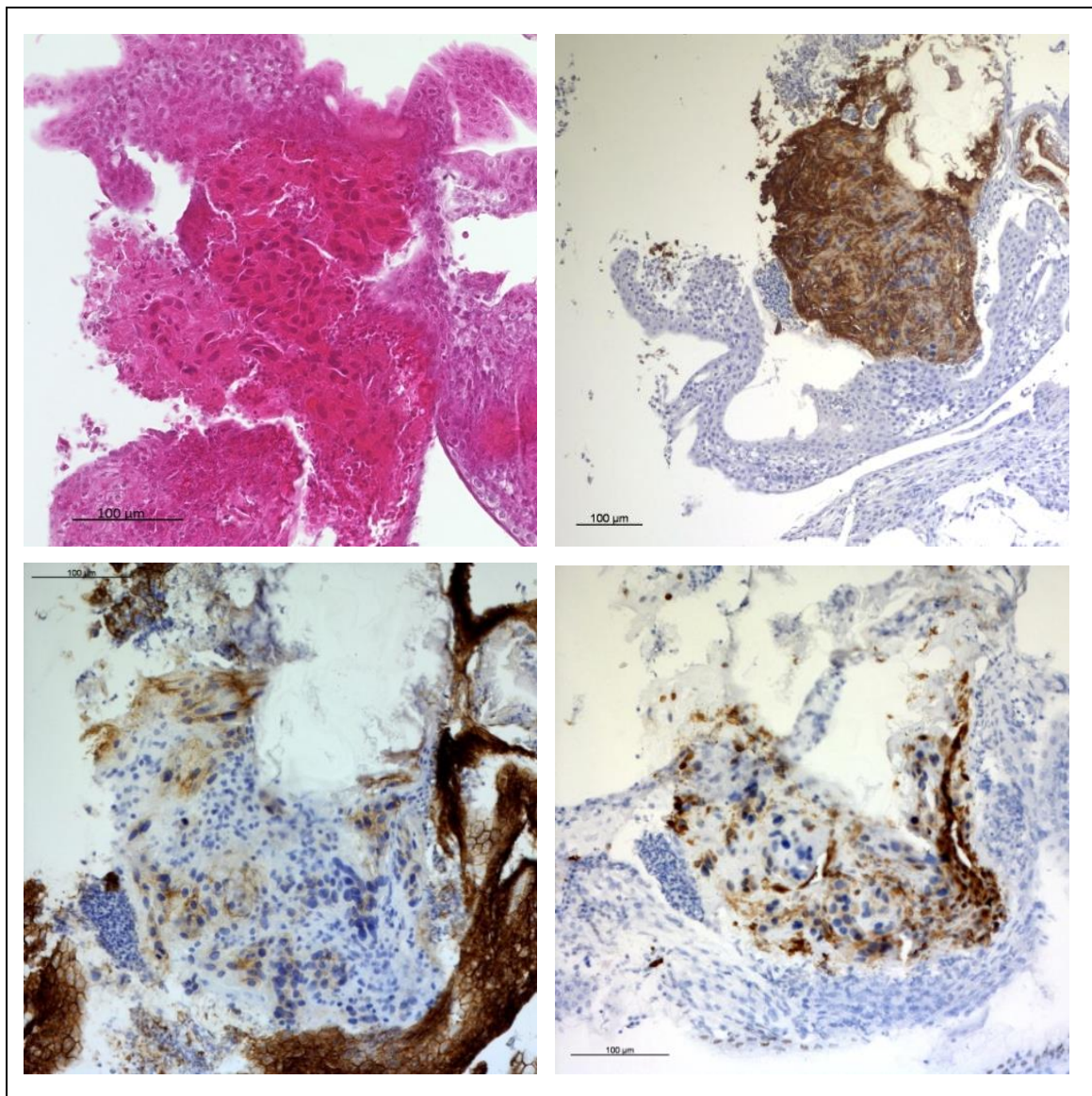


Abbildung 7: Gefärbte histologische Schnitte derselben Tumor-Kontroll-Probe (T2N2b). oben links: HE-Färbung (20-fach vergrößert), oben rechts: HLA-Färbung (10-fach vergrößert), unten links: E-Cadherin-Färbung (20-fach vergrößert), unten rechts: Vimentin-Färbung (20-fach vergrößert)

Die immunhistochemischen Färbungen wurden mit den Reagenzien und Lösungen des Detektionssystems *EnVision FLEX, High pH* (Dako Omnis) durchgeführt. Lediglich bei der HLA-Färbung wurde zur Demaskierung und Entparaffinierung der Proben die Lösung *Target Retrieval Solution pH 6* verwendet.

Tabelle 8: Färbeprotokoll für die HE-Färbung

	Reagenz /Arbeitsschritt	Dauer
1.	Entparaffinieren Xylol Ethanol 100 % Ethanol 96 % Ethanol 70 %	2x 5 min 2x 2 min 2 min 2 min
2.	aqua dest.	kurz spülen
3.	Hämalaunlösung (1:2 mit Leitungswasser verdünnt)	5 min
4.	Waschen (Leitungswasser)	10 min
5.	1 %iges Eosin	5 min
6.	aqua dest.	kurz spülen
7.	Entwässerungsreihe Ethanol 70 % Ethanol 96 % Ethanol 100 % Xylol	1 min 2x 1 min 3x 1 min 2x 1 min
8.	Eindecken mit <i>Tissue Tek</i> [®] Eindeckfolie	

Tabelle 9: Färbeprotokoll für die HLA-Antikörper-Färbung

	Reagenz /Arbeitsschritt	Dauer
1.	Entparaffinieren und Demaskierungs-Immunhisto- chemie (IHC) Demaskierungssolution pH 6 bei 97°C	15 min
2.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	2 x 2:40 min
3.	Primärer Antikörper <i>Anti-HLA Class 1 ABC antibody</i> [EMR8-5] mit <i>Anti- body Diluent</i> auf 1:1000 verdünnt)	30 min
4.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
5.	Blocken mit Peroxidase-Blocking Reagent (ca. 3 %iges H ₂ O ₂)	3 min
6.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
7.	Markiertes Polymer (<i>Horseradisch Peroxidase</i>)	20 min
8.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
9.	spülen mit aqua dest.	30 sec

	Reagenz /Arbeitsschritt	Dauer
10.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
11.	3,3'-Diaminobenzidin (DAB) Substrat-Chromogen	10 min
12.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
13.	Spülen mit aqua dest.	30 sec
14.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
15.	Gegenfärbung mit Hämatoxylin	3 min
16.	Spülen mit aqua dest.	10 x 2 min
17.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
18.	Entwässerungsreihe Ethanol 1 x 70 %, 2 x 96 %, 3 x 100 % Xylol	jeweils 1 min 1 min
19.	Eindecken mit <i>Tissue Tek</i> [®] Eindeckfolie	

Tabelle 10: Färbeprotokoll für die E-Cadherine-Färbung

	Reagenz /Arbeitsschritt	Dauer
1.	Entparaffinieren und Demaskierungs-IHC Demaskierungssolution pH 9 bei 97°C	30 min
2.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	2 x 2:40 min
3.	Primärer Antikörper Flex E-Cadherine NCH-38, Mo a Hu	25 min
4.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
5.	Blocken mit Peroxidase-Blocking Reagent (ca. 3 %iges H ₂ O ₂)	3 min
6.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
7.	Sekundäres Reagenz <i>Mouse Linker</i>	10 min
8.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
9.	Markiertes Polymer (<i>Horseradisch Peroxidase</i>)	20 min
10.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
11.	Spülen mit aqua dest.	30 sec
12.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
13.	DAB Substrat-Chromogen	5 min

	Reagenz /Arbeitsschritt	Dauer
14.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
15.	Spülen mit aqua dest.	30 sec
16.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
17.	Gegenfärbung mit Hämatoxylin	3 min
18.	Spülen mit aqua dest.	10 x 2 min
19.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
20.	Entwässerungsreihe Ethanol 1 x 70 %, 2 x 96 %, 3 x 100 % Xylol	jeweils 1 min 1 min
21.	Eindecken mit <i>Tissue Tek</i> [®] Eindeckfolie	

Tabelle 11: Färbeprotokoll für die Vimentin-Färbung

	Reagenz /Arbeitsschritt	Dauer
1.	Entparaffinieren und Demaskierungs-IHC Demaskierungssolution pH 9 bei 97°C	30 min
2.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	2 x 2:40 min
3.	Primärer Antikörper Flex Vimentin (V9), Mo a Hu	22,5 min
4.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
5.	Blocken mit Peroxidase-Blocking Reagent (ca. 3 %iges H ₂ O ₂)	3 min
6.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
7.	Markiertes Polymer (<i>Horseradisch Peroxidase</i>)	20 min
8.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
9.	Spülen mit aqua dest.	30 sec
10.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
11.	Substrat-Chromogen DAB	5 min
12.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
13.	Spülen mit aqua dest.	30 sec
14.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
15.	Gegenfärbung mit Hämatoxylin	3 min
16.	Spülen mit aqua dest.	10 x 2 min

	Reagenz /Arbeitsschritt	Dauer
17.	Waschen mit <i>Wash Buffer</i>	10 x 2 min
18.	Entwässerungsreihe Ethanol 1 x 70 %, 2x 96 %, 3 x 100 % Xylol	jeweils 1 min 1 min
19.	Eindecken mit <i>Tissue Tek</i> [®] Eindeckfolie	

2.2.4 Auswertungsschema der immunhistologischen Schnitte mit dem Adobe Photoshop CS6 Programm

Alle gefärbten Schnitte wurden mit dem DOTslide Gerät eingescannt. Die dabei entstandene tiff.-Datei wurde in das .jpeg2 Format konvertiert, wodurch die digitalisierten Schnitte mit dem Computerprogramm *Adobe Photoshop CS6* geöffnet werden konnten. Das Betrachten und die einheitliche Auswertung wurden durch das Digitalisieren der Schnitte vereinfacht. Mit *Adobe Photoshop* wurde jedes der Schnitte in Dreiergruppen geöffnet; jeweils eine HLA-, eine Vimentin und eine E-Cadherin-Färbung von derselben Probe.

Bei der HLA-Färbung werden die betroffenen Areale des humanen Gewebes in den histologischen Schnitten in einem bestimmten Braun-Ton angefärbt. Bei der E-Cadherin und Vimentin-Färbung wird der positiv gefärbte Bereich in einem ähnlichen Braun-Ton dargestellt (siehe Abbildung 13).

Zum Auswerten wurde diese Braun-Ton-Kalibrierung innerhalb der drei Färbungen verglichen und überprüft. Dafür wurde in dem Programm mit der Funktion „Auswahl“ ein Farbbereich ausgewählt, der die gewünschten Brauntöne hervorhebt. Mit dem Schieberegler „Toleranz“ konnte die Genauigkeit der Auswahl bestimmt und so verändert werden, dass der zu quantifizierende Bereich komplett umschlossen wurde. Diese Farbeinstellungen wurden in einer einheitlichen Maske gespeichert. Jeder histologische Schnitt der Versuchsreihe wurde dadurch mit denselben Voreinstellungen ausgewertet.

Mit dem Werkzeug „magnetisches Lasso“ wurde der Tumor in jedem histologischen Präparat umrahmt und die dazugehörige Pixelzahl die Gesamtpixelzahl notiert. Danach wurde im Menü die Maske für den vorher bestimmten Farbbereich geladen, sodass nur noch die festgelegten Brauntöne in den umrahmten Bereich erfasst wurden, und die Pixelanzahl der Auswahl notiert (siehe Abbildung 8).

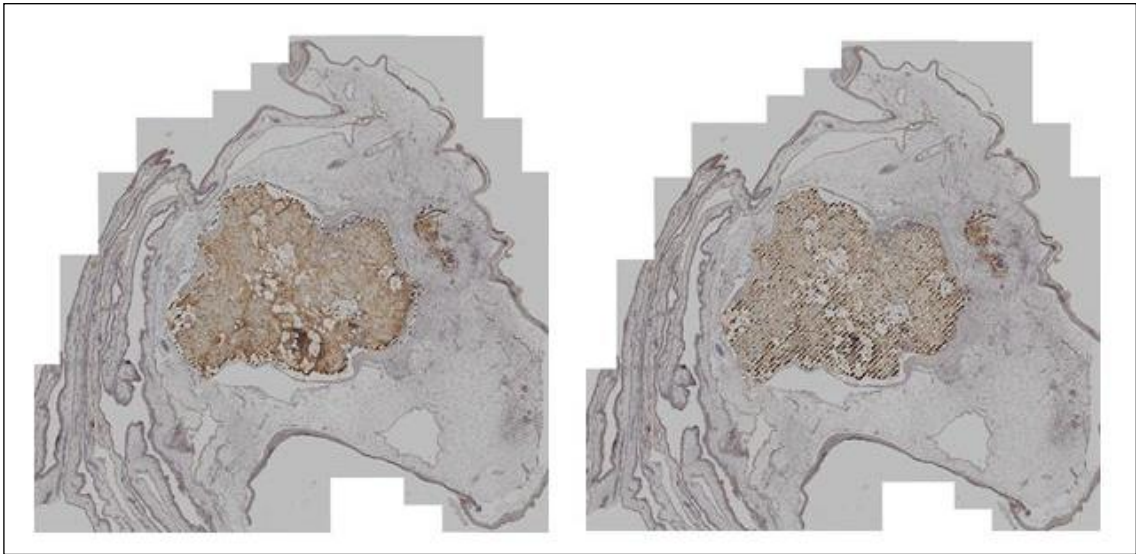


Abbildung 8: Auswertung der Präparate. links: Umrahmung des Tumors zur Erfassung der Gesamtpixelzahl, rechts: schraffierte Flächen innerhalb des umrahmten Tumors zeigen den hervorgehobenen Farbbereich nach Anwendung der festgelegten Maske zur Erfassung der Pixelanzahl der Auswahl

Um die Schnitte miteinander zu vergleichen und auszuwerten wurde der Quotient aus der Pixelanzahl der Auswahl und der Gesamtpixelanzahl gebildet.

$$Q (\text{Quotient}) = \frac{\text{Pixelanzahl der Auswahl}}{\text{Tumorgesamtpixelanzahl}}$$

Dieser Quotient soll Aufschluss darüber geben, in wie fern sich eine Induktion bzw. keine Induktion von $\text{TNF } \alpha$ bzw. $\text{TGF } \beta$ auf die E-Cadherin-Expression bzw. Vimentin-Expression in den histologischen Schnitten der Tumorproben auswirkt.

2.3 Statistik

Alle ermittelten Daten wurden auf Normalverteilung mittels Shapiro-Wilk Test überprüft. Aufgrund der nicht vorhandenen Normalverteilung aller Daten, wurde einheitlich die grafische Darstellung mithilfe von Boxplots und die deskriptive Darstellung mittels Medianen und Interquartilbereichen durchgeführt, um eine Übersichtlichkeit und Vergleichbarkeit der Daten zu erreichen. Für das Verständnis der hier dargestellten Boxplots sind folgende Punkte wichtig: Die Linie innerhalb der Box kennzeichnet den Median und die obere und untere Begrenzung der Box beschreiben die 75. und 25. Perzentile. Der obere und untere Strich stehen für den Maximal- bzw. Minimalwert. Unterhalb des Medians befinden sich 50 % der gemessenen Werte. Unterhalb der 75 % Perzentile liegen 75 % und unterhalb der 25 % Perzentile entsprechend 25 % der Messwerte. Für die jeweiligen T- und N-

Kategorien der entsprechenden EMT Marker (E-Cadherin und Vimentin) wurden parameterfreie Kruskal-Wallis Tests durchgeführt. Als post Hoc Tests wurde der Dunns Test jeweils angewendet.

Ein statistisch signifikanter Unterschied wurde bei einem Wert $p < 0,05$ angenommen. Die statistische Auswertung wurde mit *GraphPadPrism Computersoftware 5* durchgeführt.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde das Tumorgewebe von 14 Patienten (n=14) experimentell untersucht und ausgewertet (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Gesamtübersicht des Patientenkollektivs

Patient	Alter	Geschlecht	Tumorgröße	N-Kategorie	Grading
1	54	W	T1	N0	G2
2	57	M	T4a	N1	G2
3	54	W	T4	N0	G3
4	40	M	T4	N0	G2
5	52	W	T4	N0	G2
6	54	W	T2	N0	G1
7	70	M	T2	N1	G2
8	56	M	T2	N0	G2
9	58	M	T4a	N1	G2
10	58	M	T2	N0	G2
11	65	M	T3	N0	G2
12	62	M	T2	N2b	G2
13	67	M	T2	N2b	G2
14	65	M	T3	N1	G2

Der Altersdurchschnitt lag bei dem analysierten Patientenkollektiv bei 58 Jahren (siehe Abbildung 9). Es handelte sich um zehn männliche und vier weibliche Patienten/Patientinnen (siehe Abbildung 10).

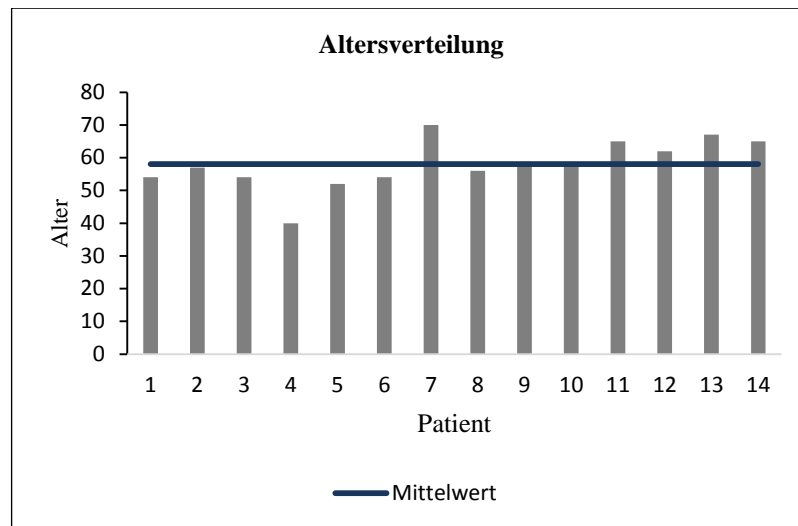


Abbildung 9: Altersverteilung der Patienten

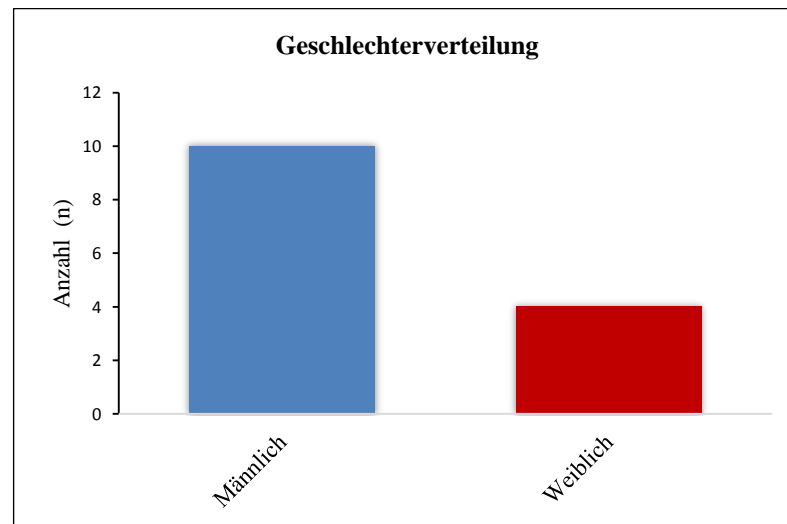


Abbildung 10: Geschlechterverteilung der Patienten

Hinsichtlich der Ausdehnung des Primärtumors (T-Kategorie) wurden die Untersuchungsgruppen in Patienten mit T1-/T2-Tumoren und T3-/T4-Tumoren zusammengefasst. Von den untersuchten Patienten hatten 50 % kleine Tumore (T1/T2) und 50 % große Tumore (T3/T4).

Im Hinblick auf die Beurteilung des Lymphknotenbefalls (N-Kategorie) wurden die Untersuchungsgruppen aufgeteilt in Patienten mit fehlenden regionären Lymphknotenmetastasen (N0) und in Patienten mit vorhandenen regionären Lymphknotenmetastasen (N1/N2). Bei acht untersuchten Patienten (57,1 %) wurde eine N0- und bei 6 Patienten (42,9 %) eine N1-/N2- Klassifizierung festgestellt (siehe Abbildung 11).

Das Grading des Tumorgewebes wurde bei zwölf Patienten, d. h. bei den meisten Patienten, als G2 gewertet. Jeweils eine Patientenprobe wurde mit Grad G1 und G3 diagnostiziert (siehe Abbildung 12).

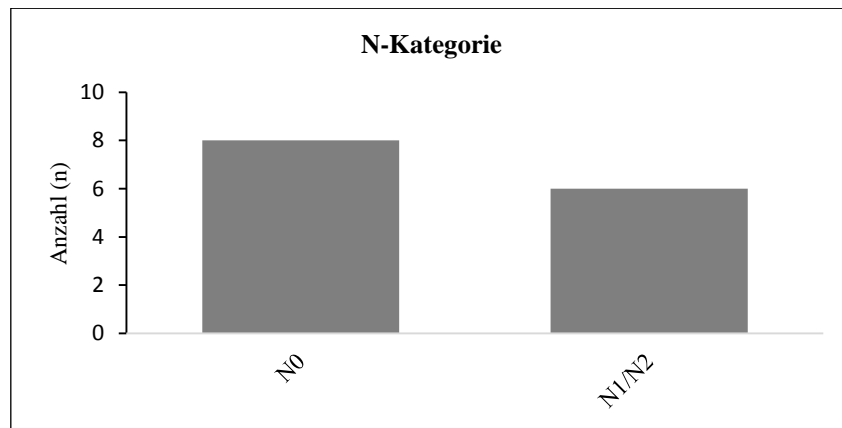


Abbildung 11: N-Kategorien innerhalb der Patientenproben

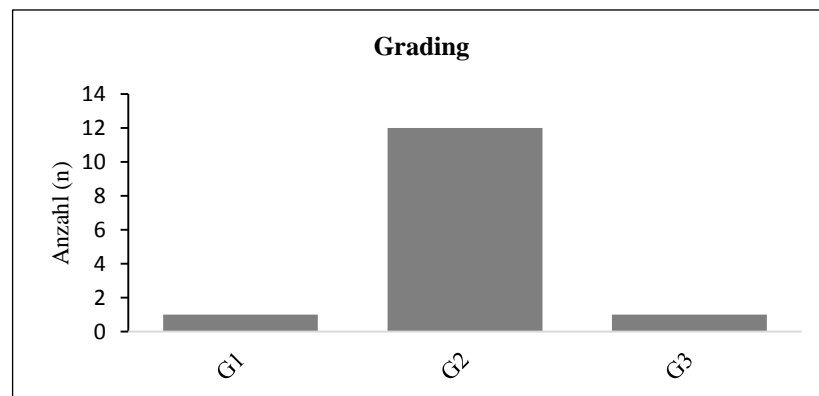


Abbildung 12: Grading innerhalb der Patientenproben

Die Tumorproben der 14 Patienten wurden in 350 μm große Stücke geschnitten. Je nach Größe der entnommenen Tumorprobe wurden unterschiedlich viele Schnitte angefertigt. Von demselben Patienten wurde auf diese Weise ein Schnitt des Tumorpräparats auf der CAM von mindestens sechs Hühnereiern implantiert. In mindestens jeweils zwei dieser Hühnereier wurde entweder TNF α , TGF β oder NaCl für die Kontrollgruppen induziert. Nach dem Explantieren des Gewebes aus dem Hühnerei und Einbetten in Paraffin wurden pro entnommenem Präparat mehrere histologische Schnitte angefertigt. Jeweils in einem histologischen Schnitt wurde E-Cadherin und in einem Schnitt Vimentin angefärbt, um deren Expression unter der Stimulation von TNF α oder TGF β und die Kontrollgruppe

ohne Zytokininduktion zu bewerten. Zusätzlich wurde in einem histologischen Schnitt HLA angefärbt, um die Existenz des humanen Gewebes in dem Präparat zu überprüfen (siehe Abbildung 13)

Die nachfolgenden Abbildungen zeigen den Nachweis für das Vorhandensein von Tumorgewebe in den untersuchten Präparaten. Die HLA-Färbung kennzeichnet das humane Gewebe in dem histologischen Schnitt in einem bräunlichen Farbton.

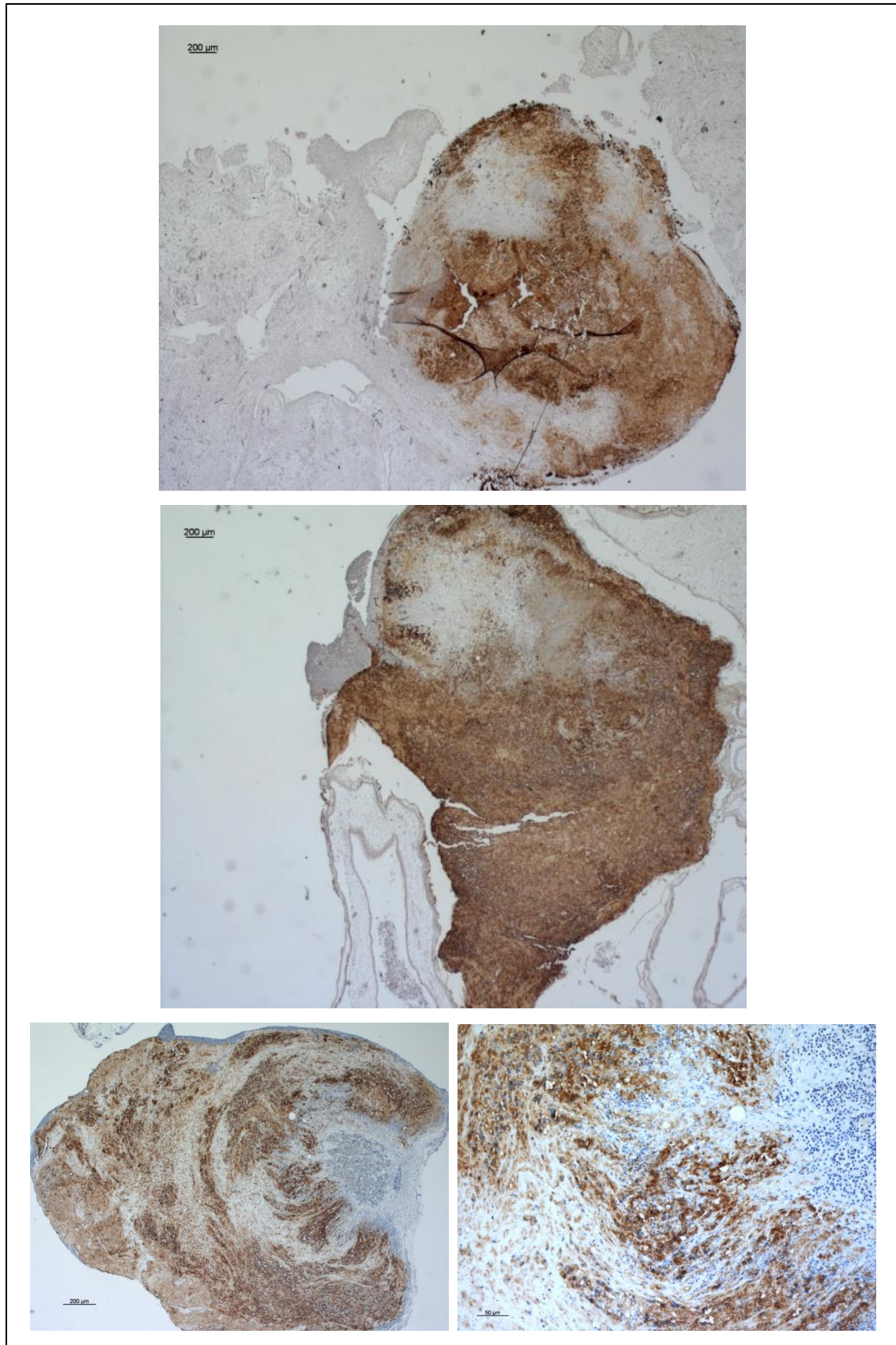


Abbildung 13: HLA-Färbungen einer Tumorprobe (T4apN1). oben: keine Zytokininduktion (Kontrollgruppe, 2,5-fach vergrößert), Mitte: nach TNF- α -Induktion (2,5-fach vergrößert), unten links: nach TGF- β -Induktion (5-fach vergrößert), unten rechts: nach TGF- β -Induktion (20-fach vergrößert)

Die nachfolgenden Bilder zeigen die histologischen Schnitte eines Tumorresektats (T4apN1) nach der Zytokininduktion ($\text{TNF } \alpha$ oder $\text{TGF } \beta$) und ohne Zytokininduktion nach der Vimentin- oder E-Cadherin-Färbung.

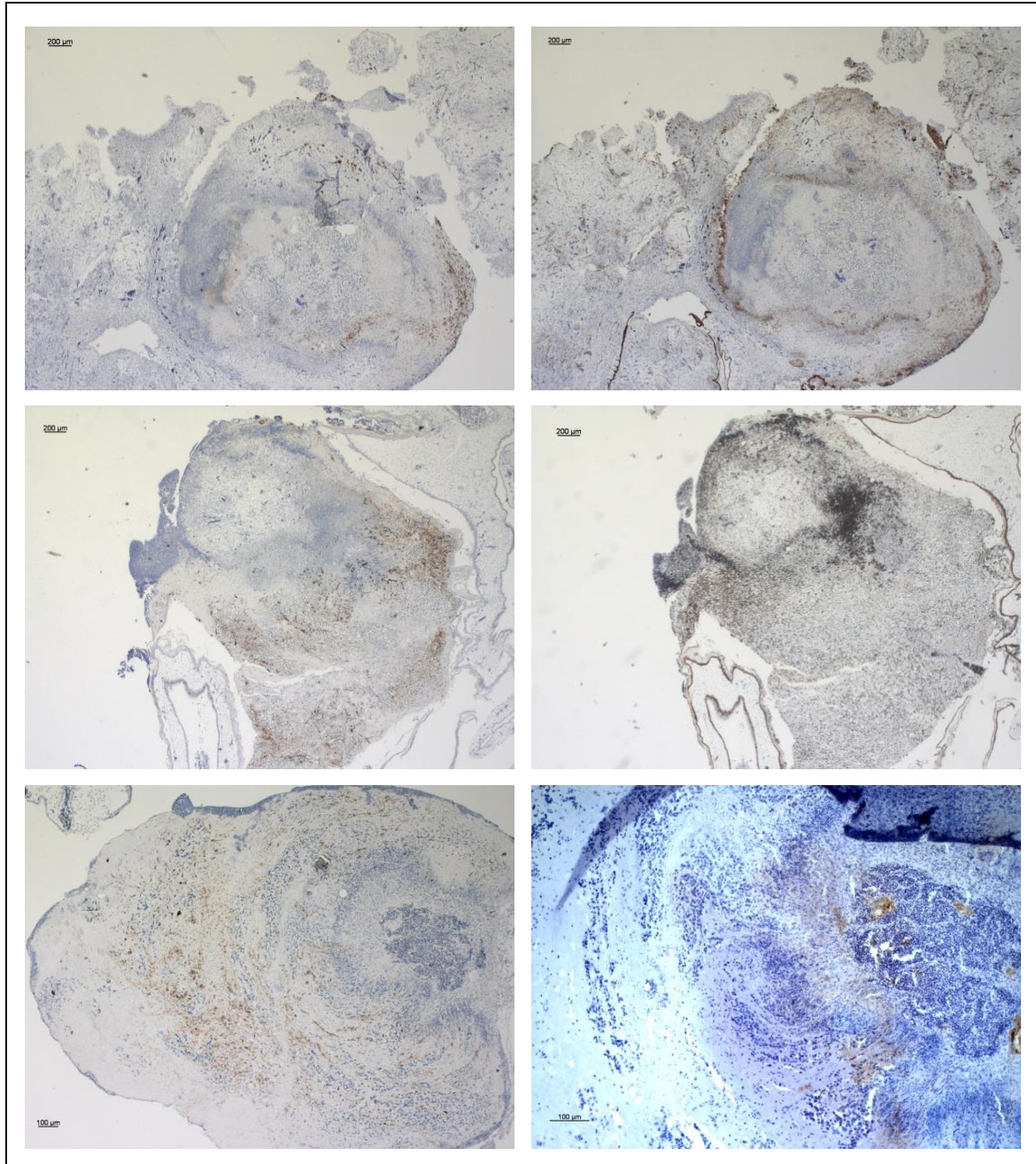


Abbildung 14: Färbungen derselben Tumorprobe (T4apN1) im Vergleich. oben links: Vimentin-Färbung der Kontrollgruppe (2,5-fach vergrößert), oben rechts: E-Cadherin-Färbung der Kontrollgruppe (2,5-fach vergrößert), mitte links: Vimentin-Färbung nach Zytokininduktion von $\text{TNF } \alpha$ (2,5-fach vergrößert), mitte rechts: E-Cadherin-Färbung nach Zytokininduktion von $\text{TNF } \alpha$ (2,5-fach vergrößert), unten links: Vimentin-Färbung nach Zytokininduktion von $\text{TGF } \beta$ (5-fach vergrößert), unten rechts: E-Cadherin-Färbung nach Zytokininduktion von $\text{TGF } \beta$ (10-fach vergrößert)

3.1 Expression von E-Cadherin unter Stimulation mit TNF α /TGF β unter Berücksichtigung der T-Kategorie

Die E-Cadherin-Expression war bei der Kontrollgruppe der kleinen Tumore im Vergleich zu der Kontrollgruppe der großen Tumore erhöht. Beim Vergleich der beiden Gruppen miteinander nach TNF- α -Induktion zeigten die großen Tumore ausgehend vom Median eine minimal höhere E-Cadherin-Expression als die kleinen Tumore. Bei den Tumoren in der T1-/T2-Kategorie wies die Gruppe nach TNF- α -Induktion im Vergleich zur Kontrollgruppe eine verminderte E-Cadherin-Expression auf. Bei den Tumoren der T3-/T4-Kategorie war die E-Cadherin-Expression sowohl in der Kontrollgruppe als auch unter TNF- α -Stimulation nahezu übereinstimmend (siehe Abbildung 15 und Tabelle 13).

Tabelle 13: EMT Expression entsprechend den T-Kategorien

	E-Cadherin in %	Kruskal-Wallis	Vimentin in %	Kruskal-Wallis
Kontroll- le T1/T2	1,66 (0,41-4,05)	p=0,03; post Hoc Analyse Dunns Test negativ	0,42 (0,003- 7,54)	p=0,71
TNF α T1/T2	0,18 (0,042- 2,36)		0,31 (0,007- 7,00)	
Kontroll- le T3/T4	0,37 (0,05-1,26)		0,96 (0,10-2,27)	
TNF α T3/T4	0,33 (0,1-0,65)		0,29 (0,08-1,6)	
TGF β T1/T2	1,49 (0,05-7,86)	p=0,14; Tu- morstadien gegen- einander und Tu- morstadien gegen Kontrollgruppen	0,05 (0,004- 1,16)	p=0,14; Tu- morstadien ge- geneinander und Tumorstadien gegen Kontroll- gruppen
TGF β T3/T4	1,01 (0,008- 2,01)		0,76 (0,02-7,46)	

In der Tabelle dargestellt sind Median (Min-Max) der E-Cadherin- und Vimentin-Expression.

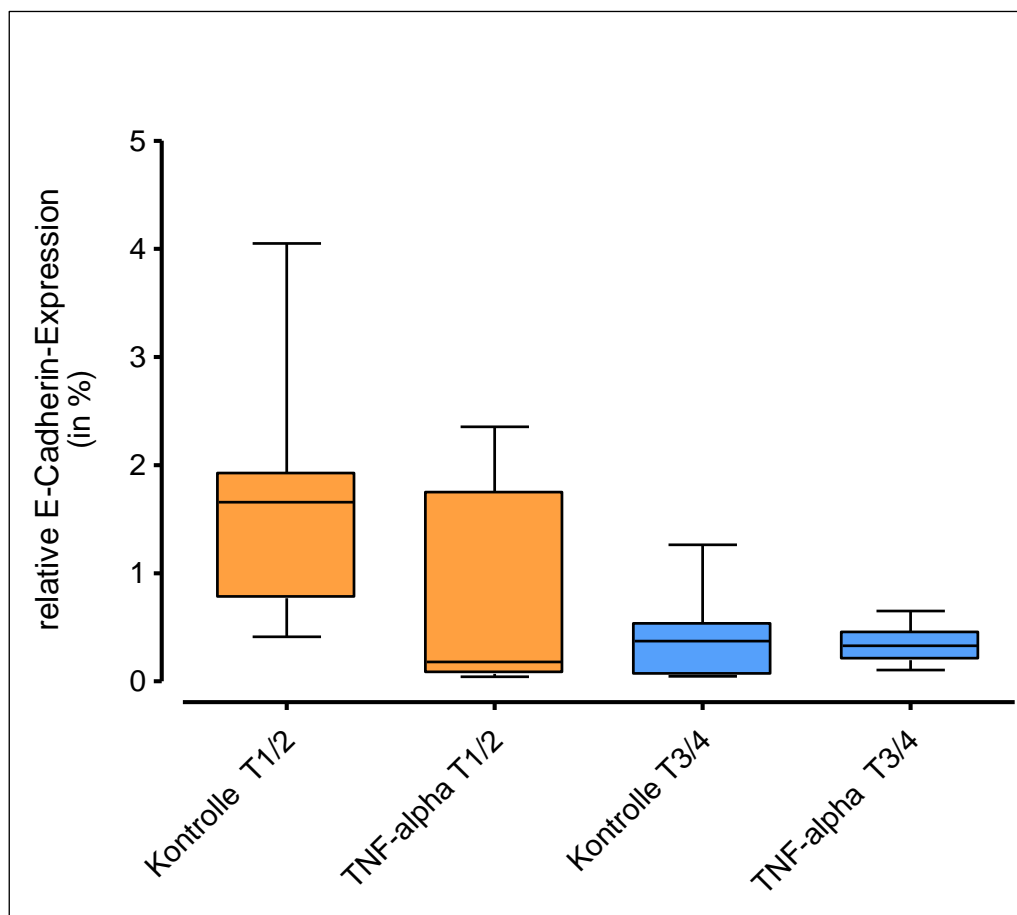


Abbildung 15: Expression von E-Cadherin unter TNF- α -Stimulation in Bezug auf die T-Kategorie

Nach der Induktion von TGF β zeigten die kleinen Tumore ausgehend vom Median eine niedrigere E-Cadherin-Expression als ihre Kontrollgruppe. Die E-Cadherin-Expression bei den großen Tumoren war nach TGF- β -Induktion im Vergleich zu der Kontrollgruppe gestiegen. Im direkten Vergleich der beiden Gruppen unter TGF- β -Stimulation war die E-Cadherin-Expression bei den T3-/T4-Tumore leicht verringert (siehe Abbildung 16).

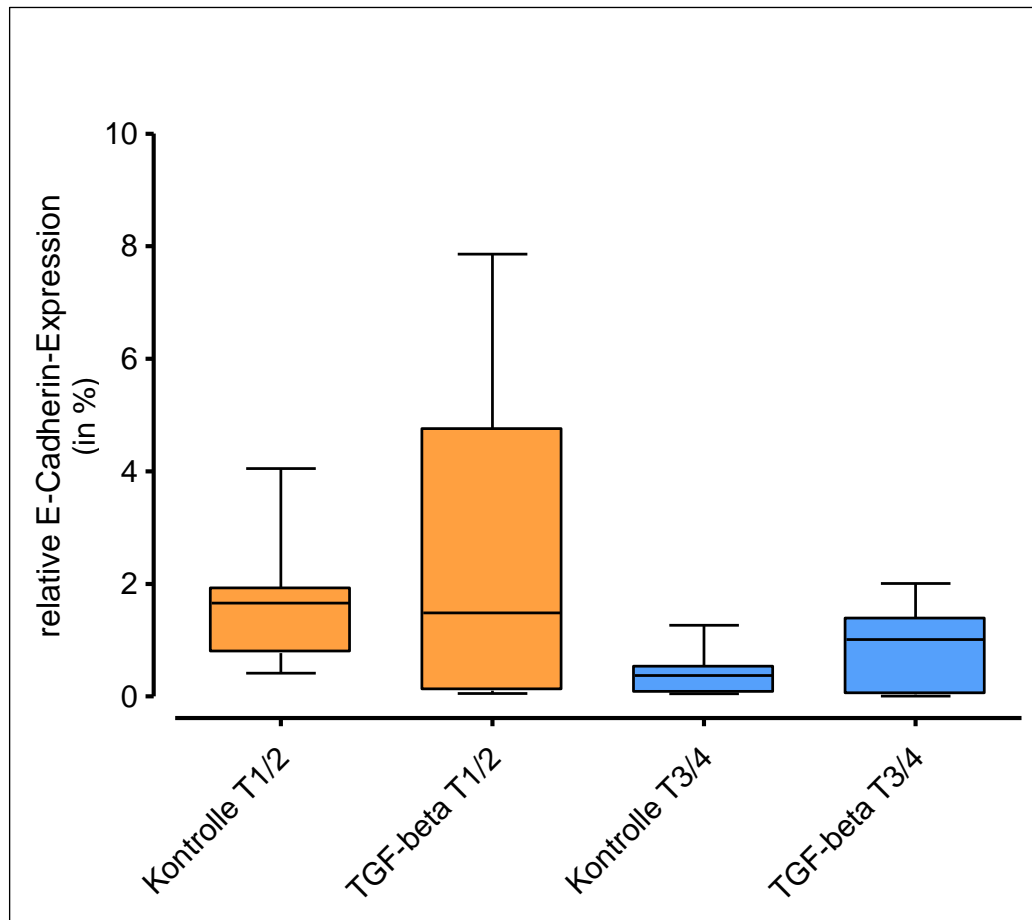


Abbildung 16: Expression von E-Cadherin unter TGF- β -Stimulation in Bezug auf die T-Kategorie

3.2 Expression von Vimentin unter Stimulation mit TNF α /TGF β unter Berücksichtigung der T-Kategorie

Die Vimentin-Expression innerhalb der Kontrollgruppen war bei den T3-/T4-Tumoren stärker ausgeprägt als bei den T1-/T2-Tumoren. Ausgehend vom Median wurde bei den kleineren Tumoren Vimentin unter TNF- α -Stimulation im Vergleich zu der Kontrollgruppe geringfügig mehr exprimiert. Bei den größeren Tumoren war die Vimentin-Expression unter TNF- α -Stimulation im Vergleich zu der Kontrollgruppe verringert. Betrachtete man die beiden Gruppen nach TNF- α -Induktion im Vergleich, blieb die Vimentin-Expression bei den T1-/T2- und bei den T3-/T4-Tumoren unverändert (siehe Abbildung 17).

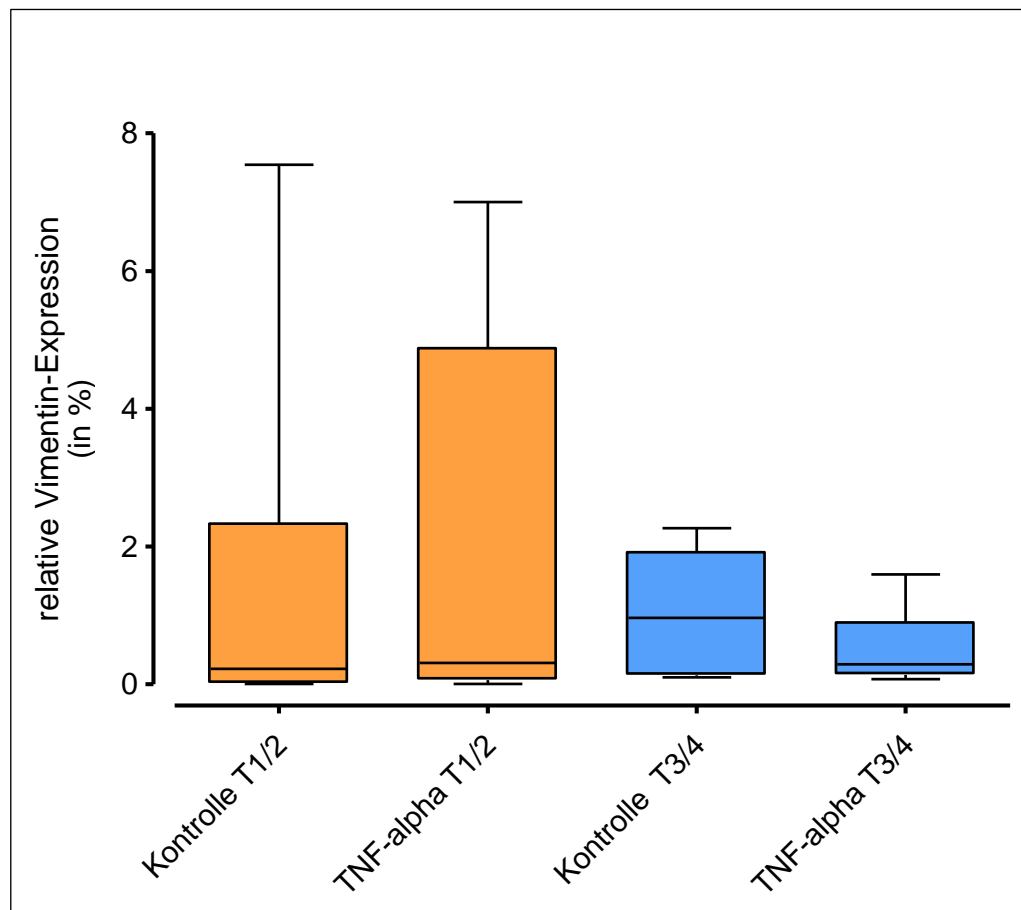


Abbildung 17: Expression von Vimentin unter TNF- α -Stimulation in Bezug auf die T-Kategorie

Ausgehend vom Median war die Expression von Vimentin unter dem Einfluss von TGF β sowohl bei den kleineren als auch bei den größeren Tumoren im Vergleich zu deren Kontrollgruppe minimal verringert. Beim Vergleich der beiden Gruppen unter TGF- β -Stimulation miteinander, war bei den größeren Tumoren die Vimentin-Expression nach TGF- β -Induktion stärker ausgeprägt als bei den kleineren Tumoren (siehe Abbildung 18).

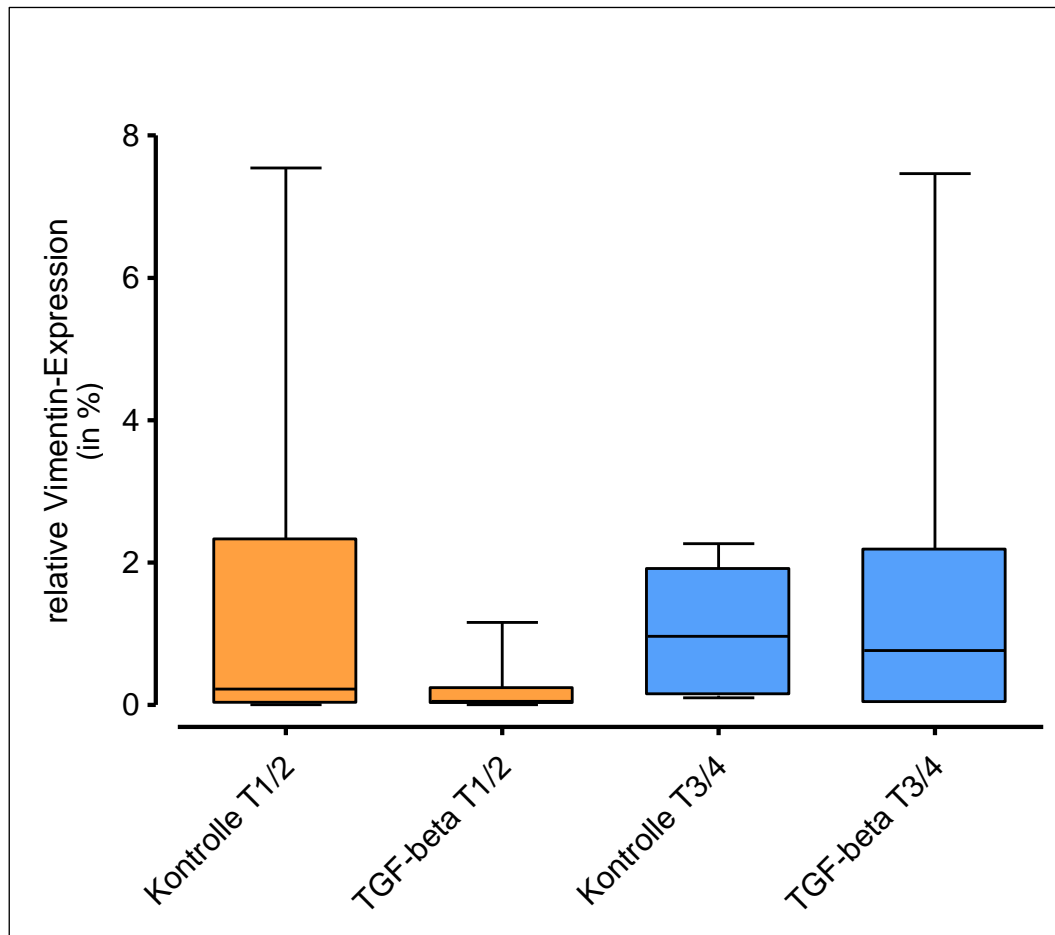


Abbildung 18: Expression von Vimentin unter TGF- β -Stimulation in Bezug auf die T-Kategorie

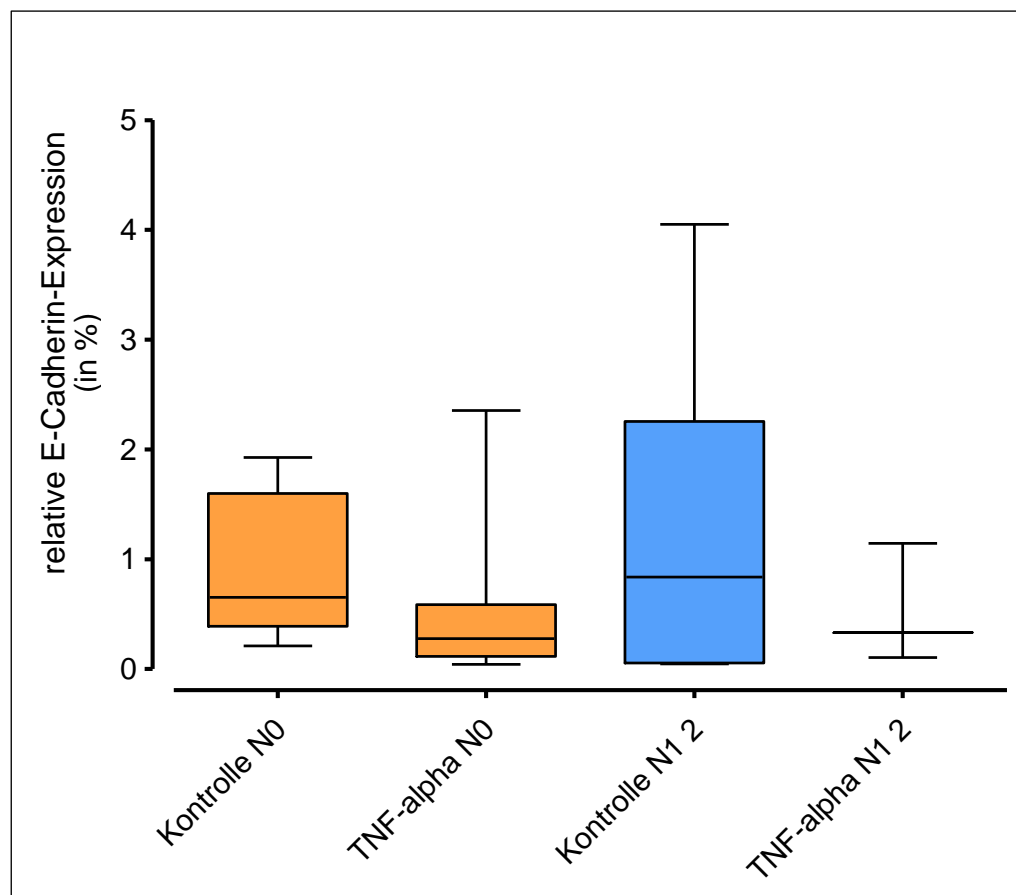
3.3 Expression von E-Cadherin unter Stimulation mit TNF α /TGF β unter Berücksichtigung der N-Kategorie

Die Expression von E-Cadherin war bei der Kontrollgruppe mit regionären Lymphknotenmetastasen im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen leicht erhöht. Unter Berücksichtigung des Medians konnte unter TNF- α -Stimulation sowohl bei den Patienten mit N0-Kategorie als auch bei den Patienten mit N1-/N2-Kategorie eine verminderte E-Cadherin-Expression im Vergleich zu deren Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Vergleich man die beiden Gruppen unter TNF- α -Stimulation miteinander, war keine Veränderung in der E-Cadherin-Expression festzustellen (siehe Abbildung 19 und Tabelle 14).

Tabelle 14: EMT Expression entsprechend den N-Kategorien

	E-Cadherin in %	Kruskal-Wallis	Vimentin in %	Kruskal-Wallis
Kontrolle N0	0,65 (0,21-1,93)	p=0,42	0,51 (0,003-2,27)	p=0,78
TNF α N0	0,28 (0,04-2,36)		0,28 (0,01-1,6)	
Kontrolle N1/N2b	0,84 (0,05-4,05)		0,15 (0,01-7,54)	
TNF α N1/N2b	0,33 (0,10-1,15)		2,18 (0,08-7,00)	
TGF β N0	1,09 (0,01-4,76)	p=0,95; N-Stadien gegeneinander und N-Stadien gegen Kontrollgruppen	0,15 (0,08-2,20)	p=0,82; N-Stadien gegeneinander und N-Stadien gegen Kontrollgruppen
TGF β N1/N2b	0,75 (0,03-7,86)		0,62 (0,004-7,46)	

In der Tabelle dargestellt sind Median (Min Max) der E-Cadherin- und Vimentin-Expression.

**Abbildung 19: Expression von E-Cadherin unter TNF- α -Stimulation in Bezug auf die N-Kategorie**

Unter dem Einfluss von TGF β konnte eine erhöhte E-Cadherin-Expression bei den Patienten mit N0-Kategorie im Vergleich zu der Kontrollgruppe festgestellt werden. Die E-Cadherin-Expression war nach TGF- β -Induktion bei den Patienten mit N1-/N2-Kategorie im Vergleich zu der Kontrollgruppe unverändert. Bei der Gegenüberstellung beider Gruppen nach TGF- β -Stimulation war bei den Patienten mit N1-/N2-Kategorie eine minimal verringerte Expression von E-Cadherin als bei den Patienten mit N0-Kategorie zu beobachten (siehe Abbildung 20).

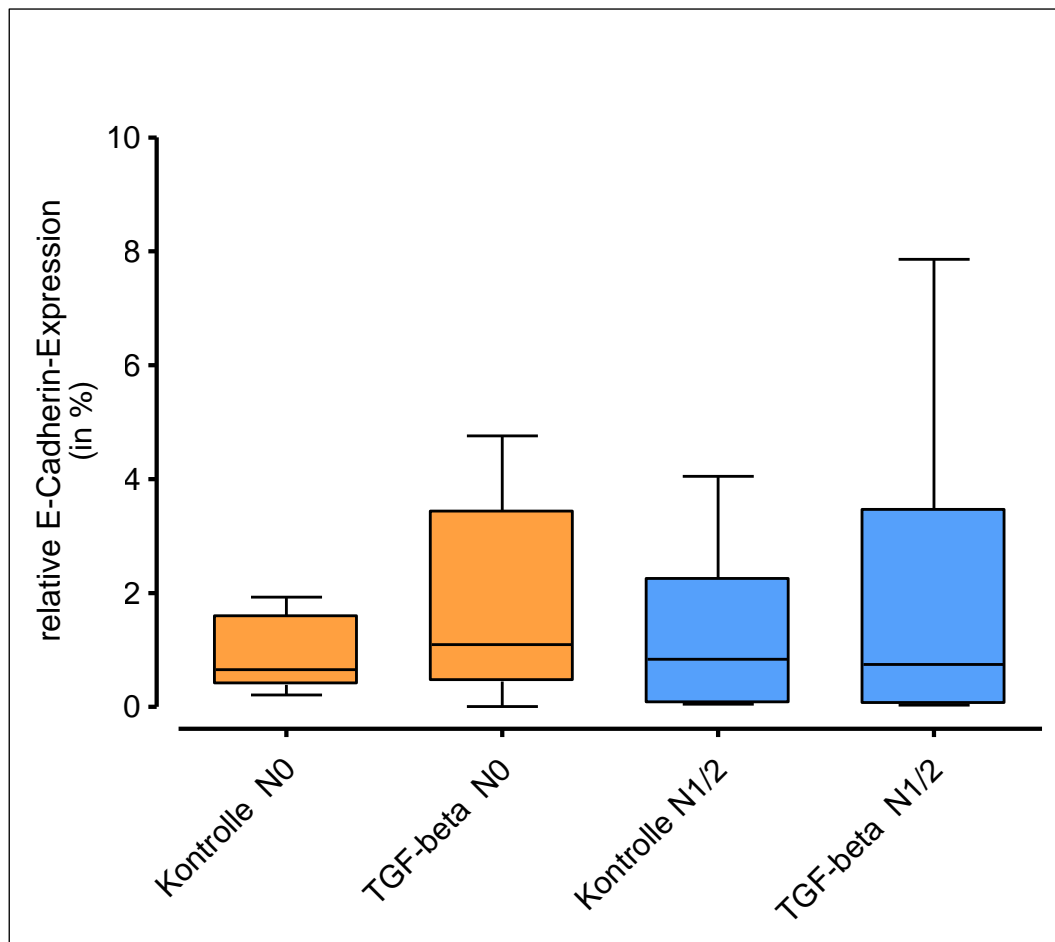


Abbildung 20: Expression von E-Cadherin unter TGF- β -Stimulation in Bezug auf die N-Kategorie

3.4 Expression von Vimentin unter Stimulation mit TNF α /TGF β unter Berücksichtigung der N-Kategorie

Die Vimentin-Expression war bei der Kontrollgruppe ohne regionäre Lymphknotenmetastasen unter Berücksichtigung des Medians im Vergleich zu der Kontrollgruppe mit

regionären Lymphknotenmetastasen erhöht. Vimentin wurde nach TNF- α -Stimulation in der N0-Gruppe vermindert und in der N1-/N2-Gruppe vermehrt exprimiert. Im direkten Vergleich der beiden Gruppen unter TNF- α -Stimulation war in der Gruppe mit N1-/N2-Tumoren eine gesteigerte Vimentin-Expression zu beobachten (siehe Abbildung 21).

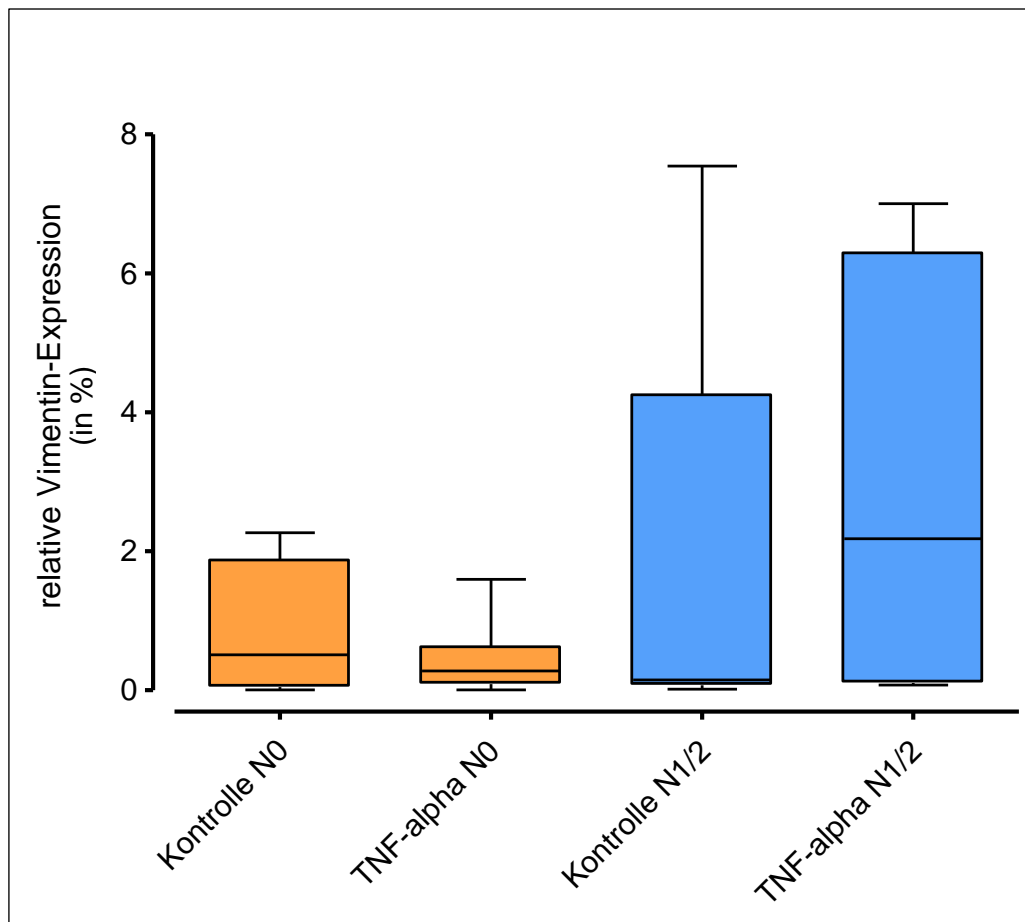


Abbildung 21: Expression von Vimentin unter TNF- α -Stimulation in Bezug auf die N-Kategorie

Eine TGF- β -Induktion führte im Vergleich zu deren Kontrollgruppen bei den Tumoren der N0-Gruppe zu einer reduzierten Expression und bei den Tumoren der N1-/N2-Gruppe zu einer gesteigerten Expression von Vimentin. Im direkten Vergleich der beiden Gruppen unter TGF- β -Stimulation war zu erkennen, dass die Vimentin-Expression bei der Gruppe mit regionären Lymphknotenmetastasen im Vergleich zu der Gruppe ohne regionäre Lymphknoten erhöht war (siehe Abbildung 22).

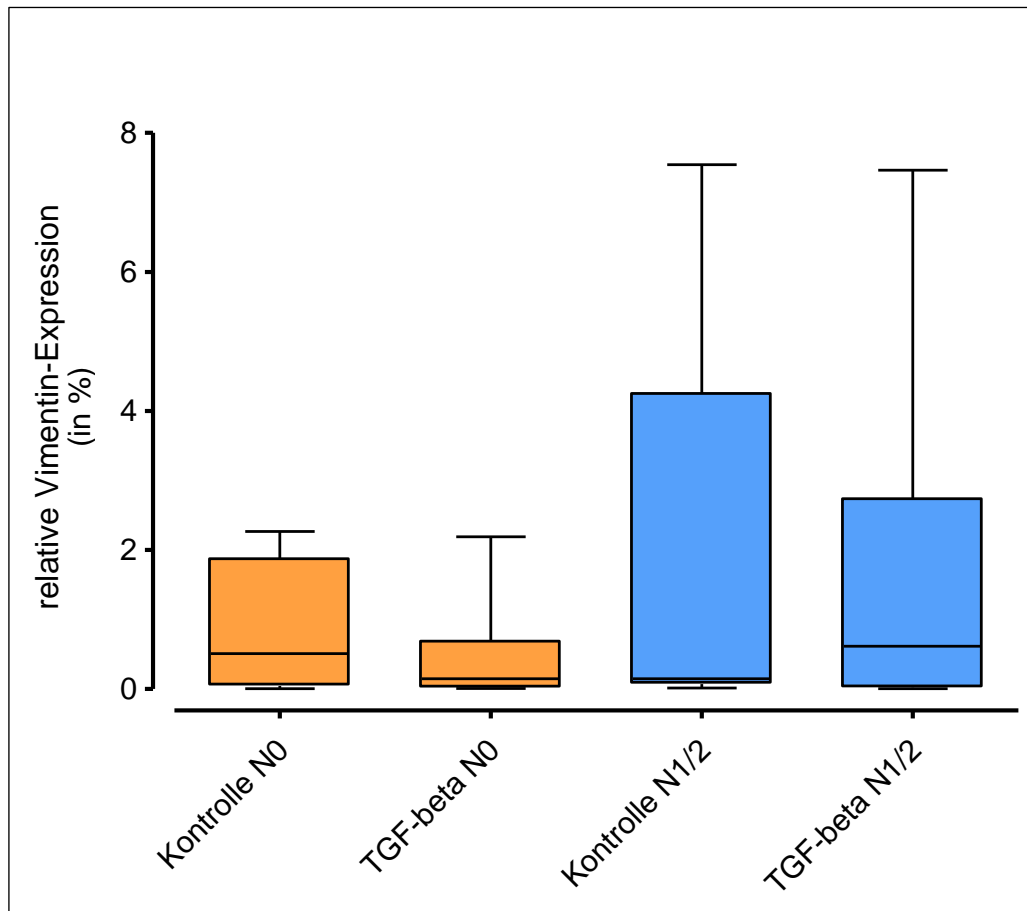


Abbildung 22: Expression von Vimentin unter TGF- β -Stimulation in Bezug auf die N-Kategorie

4 Diskussion

Die Entstehung eines Tumors ist ein hochgradig komplexer Prozess. Mehrere exogene und endogene Faktoren, insbesondere auch Faktoren auf zellulärer Ebene tragen dazu bei, dass ein physiologisches, gesundes Gewebe sich zu einer malignen Neoplasie entwickelt.

Das OSCC gehört zu den häufigsten bösartigen Tumoren der Mundhöhle (DGMKG 2012; Howaldt et al. 2000). Die Folgen von OSCC erstrecken sich von ästhetischen Beeinträchtigungen bis hin zu funktionellen Schäden.

Obwohl in der Früherkennung von OSCC über die Zeit Fortschritte erzielt wurden und das therapeutische Vorgehen verbessert wurde, hat sich die Prognose von Patienten mit fortgeschrittenem Tumorstadium kaum gebessert (Johnson et al. 2011).

Die bisherigen Forschungen zielen daraufhin, auf zellulärer Ebene die Signalwege und Mechanismen zu erforschen, die für die Tumorgenese zuständig sind, um eventuell neue Therapieansätze zu entwickeln.

Die EMT in Bezug auf die Tumorprogression ist ein Prozess, der seit Jahren intensiv erforscht wird (Hay 1995; Kalluri und Weinberg 2009). Sie spielt eine Schlüsselrolle bei der Metastasierung von OSCC. Die EMT beschreibt die Kaskade, in der entartete Epithelzellen sich aus ihrem Zellverband auflösen und einen invasiven mesenchymalen Charakter annehmen. Über die Blut- und Lymphbahn können sie auf diese Weise zu anderen Organen gelangen und Mikrometastasen bilden (Thiery 2002).

Diese klinische Arbeit zielt darauf hin, mit Hilfe des CAM-Assays diesen Prozess der EMT an humanem Tumorfrischgewebe darzustellen. Bislang wurden menschliche Tumorzellen beispielsweise vom Prostatakarzinom oder kolorektalen Karzinom oder auch tierisches Gewebe auf die CAM von befruchteten Hühnereiern gegeben und danach untersucht (Ausprunk et al. 1975; Ebert 1954; Kim et al. 2016; Xiao et al. 2015). Forschungen mit humanem Tumorgewebe (z. B. vom Nierenzellkarzinom oder ovarialen Adenokarzinom) wurden unter Verwendung des CAM-Assays nur von vereinzelten Studiengruppen durchgeführt (Ferician et al. 2015; Ismail et al. 1999). Die begrenzte Übertragbarkeit von tierischen Gewebeprozessen auf das menschliche Gewebe und die limitierte prognostische Aussagekraft von Untersuchungen mit Tumorzelllinien im klinischen Modell erfordern eine Weiterentwicklung dieser Methode, um zusammenhängende Prozesse im menschlichen Tumorgewebe darzustellen (de Bono und Ashworth 2010; DeBord et al. 2018; Landis et al. 2013).

In der vorliegenden Arbeit soll daher das Versuchsmodell hinsichtlich der Anwendbarkeit im klinischen Alltag bewertet werden. Das Modell soll Aufschluss darüber geben, ob ein Anwachsen des Tumorfrischgewebes auf der CAM gegeben ist und ob die verwendeten Untersuchungsmethoden die Tumorprogression und die EMT angemessen darstellen können. Nach dem Transplantieren der Tumorproben auf die CAM der Hühnereier wurde in die eine Gruppe das Zytokin TNF α , in die andere Gruppe das Zytokin TGF β und in die Kontrollgruppe NaCl induziert.

Nach festgelegtem Zeitpunkt wurde das induzierte Gewebe entnommen, histologische Schnitte angefertigt, immunhistochemisch angefärbt und mikroskopisch mit *Adobe Photoshop CS6* ausgewertet.

4.1 Diskussion der Methode

4.1.1 Anwendung des Hühnerei-CAM-Modells

Die Karzinogenese und Metastasierung ist ein sehr komplexer und zum Teil noch unerklärter Prozess. Um den Mechanismus der Tumorgenese besser zu verstehen, ist in den klinischen Studien ein Verfahren notwendig, das die Komplexität eines lebenden dreidimensionalen Systems veranschaulicht.

Bereits seit mehreren Jahren hat sich das CAM-Modell als ein geeignetes experimentelles System für die Forschung in der Tumorbiologie etabliert (Ribatti 2014; Storgard et al. 2005). Das Modell ermöglicht es, komplizierte Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Zusammenhänge in dem Mikromilieu des Tumors darzustellen (Mangir et al. 2018).

Ein großer Vorteil, den dieses experimentelle Modell bietet, ist die dichte Vaskularisierung der CAM. Auf diese Weise wachsen die implantierten Tumorzellen auf der CAM rapide an und werden vom Kapillarplexus versorgt. Dadurch konnten in den bisherigen Studien Vorgänge wie das Wachstum von Tumorzellen, Intravasation, Extravasation und die Ansiedlung von Tumorzellen zu Metastasen beobachtet und die Veränderungen in der Morphologie in Echtzeit analysiert werden (Deryugina und Quigley 2008).

In vielen Ländern unterliegen Experimente mit dem CAM-Modell keinen tierrechtlichen Auflagen, da der Hühnerembryo bis zum 17. Tag nicht als Lebewesen betrachtet wird (Ribatti 2016). Die CAM ist nicht innerviert und die Experimente werden beendet, bevor im Gehirn die Areale zur Schmerzwahrnehmung ausgebildet werden. Einen weiteren positiven Aspekt stellt das Immundefizit des Embryos im frühen Inkubationsstadium dar.

Durch die fehlende Immunantwort auf fremde Tumorzellen bleibt auch eine Abwehrreaktion des Wirtes aus und die Untersuchungen von transplantierten Tumorzellen und Tumorgewebe über einen bestimmten Zeitraum werden somit ermöglicht (Mangir et al. 2018; Ribatti 2016).

Auf der anderen Seite hat die fehlende Immunantwort des Wirtes zur Folge, dass bei den Untersuchungen des humanen Gewebes auf der CAM auch die natürliche Immunabwehr des menschlichen Organismus in dem Modell nicht imitiert werden kann. Dies muss bei der Bewertung der Untersuchungsergebnisse stets mitberücksichtigt werden.

Die Hauptlimitation des CAM-Modells ist die unspezifische Entzündungsreaktion, die bei den Experimenten auftreten kann, die länger als 15 Tage nach Inkubation andauern (Ribatti 2016). Auch wenn es in der Literatur als ein immundefizientes Modell beschrieben wird und das lymphatische System erst im späteren Inkubationsstadium sich vollständig entwickelt (Deryugina und Quigley 2008), muss demzufolge der Untersuchungszeitraum gut überwacht und eingegrenzt werden, um potenzielle unspezifische Entzündungsreaktionen und Beeinträchtigungen in den Untersuchungsergebnissen zu vermeiden.

Ein weiterer Aspekt bei Experimenten mit dem CAM-Modell, der kritisch zu betrachten ist, besteht darin, dass die CAM sehr empfindlich auf Veränderungen in ihrer Umgebung reagiert. Unter anderem Veränderungen des Sauerstoffpartialdrucks, des pH-Werts oder der Osmolarität können das Anwachsen der Zellen und des Gewebes oder aber auch das Überleben des Embryos beeinflussen (Ribatti 2016).

Die Öffnung in der Eierschale ist lediglich mit einem Klebestreifen versehen, welches in regelmäßigen Abständen entfernt und wieder angebracht wird, um das Zytokin zu induzieren. Hierdurch wird die Schaffung einer konstanten Umgebung für das Versuchsmodell erschwert.

Für das Erreichen einer einheitlichen Versuchsumgebung und eines konstanten Tumormilieus über die gesamte Versuchsdauer ist eine Optimierung bzw. eine Weiterentwicklung des Versuchsaufbaus notwendig.

Ein weiterer Aspekt, der bei der Anwendung des CAM-Modells zu berücksichtigen ist, besteht im zeitlichen Aufwand dieser Studie. Die einzelnen Schritte, die für den Versuchsaufbau notwendig sind, d. h. vom Legen der befruchteten Eier in den Brutkasten bis zum Fenster der Eier am vierten Tag, beanspruchen regelmäßig Zeit im Labor. Dadurch, dass die Tumoroperation an bestimmten Tagen durchgeführt wird und die Induktion der Zytokine immer nach dem gleichen Schema erfolgen muss, gab es während der Versuchsdurch-

führung stets eine strikt reglementierte Laborzeit, die es einzuhalten galt, um die Studie und die damit verbundenen Ergebnisse nicht zu gefährden. Weitere limitierende Faktoren waren z. B. der festgelegte Tag der Tumorexplantation oder die durch die Ethikkommission vorgegebene Anzahl der Versuchstage, die wenig Spielraum in der Ausführung der Studie zuließen. So kam es nicht selten vor, dass die vorbereiteten Hühnereier nicht verwendet werden konnten, da der Operationstermin verschoben wurde. Die Proben hätten nicht zu einem späteren Zeitpunkt implantiert werden können, da sonst die vorgeschriebenen Versuchstage der Ethikkommission überschritten worden wären.

Diese Aspekte verdeutlichen, dass ein präziser Zeitplan und eine exakte Terminierung pro Versuchsdurchlauf erforderlich sind, um einen Workflow in dem klinischen Alltag zu etablieren.

4.1.2 Implantation von humanem Tumorfrischgewebe

Das Tumorfrischgewebe ist als Untersuchungsobjekt als fragil zu werten. Die Verarbeitung des Tumorgewebes für die experimentelle Studie ist verhältnismäßig aufwendig und erfordert eine genaue Planung und Einhaltung der versuchsvorbereitenden Schritte. Im Vergleich zu Tumorzellen, die eine Aufbewahrung und Versuchsdurchführung zu einem beliebigen Zeitpunkt ermöglichen, ist eine zeitnahe Verarbeitung des Tumorfrischgewebes erforderlich. Eine gute interdisziplinäre Zusammenarbeit ist zwischen der Abteilung der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und der Abteilung der Pathologie notwendig, um eine nahtlose Probeentnahme für die Studie nach der operativen Tumoresektion zu gewährleisten. Erfolgt die Weiterverarbeitung der Probe und das Implantieren auf der CAM nicht am selben Tag der OP, ist die Gefahr groß, dass das Gewebe nekrotisch wird, auf der CAM nicht anwächst und/oder der Embryo frühzeitig abstirbt.

Lange Zeit wurden in den bisherigen Studien die Tumorzellen aus dem Tumor isoliert und auf der CAM implantiert, um Untersuchungen vorzunehmen. Dabei wurden durch diese Herangehensweise viele Erkenntnisse in der Tumorbiologie und in den vorklinischen Tests bei der Entwicklung von Arzneimitteln erzielt (Lacroix und Leclercq 2004; Voskoglou-Nomikos et al. 2003).

Ein Nachteil der Anwendung von Tumorzelllinien besteht darin, dass sie die Morphologie und die zelluläre Heterogenität des Originaltumors nicht adäquat darstellen kann und somit die Aussagekraft der Untersuchungen limitiert (de Bono und Ashworth 2010; Landis et al. 2013).

In den letzten Jahren kann eine Zunahme der Studien zu CAM-Assay in Kombination mit Implantation vom Tumorfrischgewebe beobachtet werden.

Im Vergleich zu den Zelllinien bleiben beim humanen Tumorfrischgewebe die Schlüsseleigenschaften und die Pathophysiologie vom Spender-Tumor erhalten. Das natürliche Wachstum des Tumors kann somit annäherungsweise beobachtet werden. Denn bei einem solchen Gewebegeflecht bleibt das gesamte Gerüst wie z. B. die Zell-Zell-Kontakte, extrazelluläre Matrix und die umschließende Mikrostruktur bestehen, wodurch das Verhalten des Gewebes auf bestimmte Reize und die Interaktion des zusammenhängenden Zellverbands besser beurteilt werden kann (Hidalgo et al. 2014).

Zudem werden die genetischen und epigenetischen Anomalien in dem komplexen Gewebe beibehalten und verändern auf diese Weise nicht die Untersuchungsergebnisse in Bezug auf dem Originaltumor (Richmond und Su 2008).

Bei der Erprobung von Arzneimitteln haben Studien gezeigt, dass im Vergleich zu den Untersuchungen mit den Tumorzelllinien die Medikamentenwirkung bei Menschen durch die Untersuchungen mit dem Tumorfrischgewebe exakter wiedergegeben wird. Durch die Heterogenität wird die molekulare, genetische und histologische Komplexität des Originaltumors bewahrt und imitiert die Gegebenheiten im menschlichen Organismus (Rosfjord et al. 2014; Tentler et al. 2012).

Als Weiterentwicklung dieser Erkenntnis könnte durch die Anwendung vom Tumorgewebe theoretisch derselbe Tumor eines Patienten mit unterschiedlichen Therapiestrategien mittels CAM-Assay untersucht und die Therapiemöglichkeiten untereinander verglichen werden (Landis et al. 2013).

Der limitierende Faktor der Untersuchungen mit Tumorfrischgewebe besteht sowohl in der Quantität als auch der Qualität der Tumorprobe.

Die Probenmenge ist einerseits durch das Patientenkollektiv und andererseits durch die Größe des Resektats, die für die Versuche zur Verfügung gestellt wird, begrenzt. Daraus lässt sich schließen, dass abhängig von der Anzahl der histologischen Schnitte, die aus der Probe gewonnen werden, nur eine begrenzte Anzahl an Versuchen mit einem Spender-Tumor möglich ist. Da es nach der Implantation zusätzlich zum Verlust der Probe durch das frühzeitige Absterben des Embryos kommen kann, reduziert sich möglicherweise die tatsächliche Versuchsanzahl mit frischem Tumorgewebe weiter.

Ein weiterer Nachteil vom Tumorfrischgewebe ist neben der erforderlichen schnellen und aufwendigen Verarbeitungszeit die Gefahr, dass bei der Probeentnahme nach dem Resektieren des Tumors oder später bei der Anfertigung der histologischen Schnitte eine nicht-

optimale Stelle angeschnitten wird, bei dem der Tumor nur zum Teil oder im schlechtesten Fall gar nicht erfasst ist (DeBord et al. 2018).

Da jedoch der Pathologe die Tumorprobe für diese Studie stets zentral aus dem Tumorsektat herausgeschnitten hat, ohne die T-Kategorie zu verändern und stets mehr histologische Schnitte aus einer Tumorprobe angefertigt und histologisch bewertet wurden als benötigt, können diese Bedenken minimiert werden.

4.1.3 Nachweis vom humanen Gewebe mittels Humane Leukozyten Antigen (HLA)-Färbung

Bei der Explantation des Tumorpräparats aus dem Hühnerei wurde stets die umgebende CAM mit entfernt. Die in Paraffin eingebetteten Proben bestanden demnach zum Teil aus humanem und zum Teil aus tierischem Gewebe.

Diese Besonderheit spiegelte sich in der HE-Färbung der histologischen Schnitte in Form von unterschiedlicher Rotton-Färbung des Präparats wieder, die auf das Vorhandensein von menschlichem Gewebe in den Schnitten hindeuteten. Mit dieser Übersichtsfärbung konnte jedoch kein präziser Nachweis von humanem Tumorgewebe in den Proben erzielt werden. In der HE-Färbung werden alle basophilen Strukturen blau und alle eosinophilen Strukturen rot gefärbt (Chan 2014).

Da in dieser Arbeit die EMT in den humanen Tumorproben untersucht werden sollte, ist der eindeutige Nachweis vom menschlichen Gewebe in den histologischen Schnitten essenziell. Aus diesem Grund musste eine weitere Färbung, eine HLA-Färbung, durchgeführt werden. Das *Humane Leukozyten Antigen* bezeichnet einen Komplex von menschlichen Genen, die für die Regulierung des humanen Immunsystems verantwortlich ist (Wang et al. 2014). Dies bedeutet, dass bei der HLA-Färbung in den Proben lediglich das menschliche Gewebe angefärbt wird. Die HLA-Färbung hat sich bereits in mehreren Studien bewährt, um humane Zellen von Hühnerei-Zellen zu unterscheiden (Klingenberg et al. 2014; Vishnubalaji et al. 2015). Daher wurde auch in dieser Studie das *Anti-HLA Class I ABC antibody* (EMR8-5, abcam) zur Färbung der histologischen Schnitte und zum Nachweis von menschlichem Gewebe verwendet.

4.1.4 Auswertung der histologischen Schnitte mit Photoshop CS6

Die *real-time reverse* Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR) hat sich in den vergangenen Studien als Methode bewährt, um die quantitative Expression bestimmter

Wachstumsfaktoren bei OSCC zu bestimmen, die eine EMT bewirken (Li et al. 2016). Jedoch unterscheidet sich der Versuchsaufbau von dieser Studie dahingehend, dass anstelle eines komplexen Gewebes lediglich Zelllinien verwendet wurden. Da die Migration des Tumorgewebes in die umgebende Matrix nicht mit der qRT-PCR ermittelt werden kann, konnte diese Methode für die hier beschriebene Studie nicht angewandt werden. Die Auswertung der histologischen Schnitte in Bezug auf die Quantität der EMT nach Induktion von TNF α oder TGF β in humanem Tumorfrischgewebe ist in den bisherigen Studien noch nicht erforscht. Um hierfür ein einheitliches Bewertungsschema festzulegen, die die Quantität der EMT erfasst, musste eine Methode gewählt werden, die jeden histologischen Schnitt gleichermaßen auf EMT untersucht.

Das Digitalisieren und die Nutzung des Photoshop Programms CS6 (Adobe Software) hat es ermöglicht, die gefärbten histologischen Schnitte mit einem einheitlichen Maßstab auszuwerten. Das Erstellen und Anwenden der Auswertungsmaske hat eine gleichartige Betrachtung jedes einzelnen histologischen Schnitts ermöglicht. Dadurch konnten die gemessenen Pixelzahlen in die notwendigen Daten zur Erfassung der EMT überführt werden. Die Erfassung der Brauntöne für die EMT musste mit Bedacht vorgenommen werden. Die Braun-Färbungen der EMT mussten beispielsweise strikt von den Braun-Färbungen der nekrotischen Gewebe und von den Färbeartefakten abgegrenzt werden, um keine falschen Daten zu erheben

Ein Nachteil der selbst erstellten Auswertungsmaske zeigt sich darin, dass womöglich, aufgrund der unterschiedlichen feinen Nuancen der Braun-Kalibrierung der Färbung nicht alle EMT-Bereiche in den Präparaten erfasst wurden. Da jedoch zu Beginn der Auswertung die Maske festgelegt wird und die potenziellen EMT-Bereiche folglich in jedem Schnitt nicht erfasst werden, ist diese mögliche Fehlerquelle als minimal zu betrachten, da das Gesamtergebnis – der Quotient – nicht verändert wird.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Bei der Auswertung des Patientenkollektivs fällt auf, dass sich bis auf wenige Ausnahmen, der Großteil der Patienten im späteren mittleren Alter zwischen 53 und 63 Jahren befindet. Der Altersdurchschnitt der untersuchten Patienten beträgt im Mittel 58 Jahre. Mehr als zwei Drittel der untersuchten Personen sind männlich. Diese Auswertungsergebnisse decken sich mit den Erkenntnissen, die in den bisherigen Studien erzielt wurden. Beispielsweise beschreiben Johnson et al. (2011) in ihrer Studie das OSCC als eine Er-

krankung, die normalerweise bei Männern ab der fünften Lebensdekade auftritt. Zahlreiche Studien belegen, dass Tumore im Kopf-Hals-Bereich bei Männern häufiger vorkommen als bei Frauen (Cronin et al. 2018; Ferlay et al. 2010). Früher trat das OSCC gehäuft bei Männern fortgeschrittenen Alters auf, die durch die ständige Exposition von Alkohol und Tabak hervorgerufen wurde. Aufgrund des gesteigerten Bewusstseins über die Schäden, die durch Alkohol oder Tabak verursacht werden, konnte ein Rückgang des OSCCs in Verbindung mit Tabakabusus über die Jahre festgestellt werden (Ng et al. 2017).

In der Studie von Ng et al. (2017) wurde in den letzten Jahren in 14 von 22 untersuchten Ländern ein demografischer Wandel festgestellt. Die Häufigkeit von OSCC im Zungenbereich hat bei Patienten unter 45 Jahren stärker zugenommen als bei Patienten über 45 Jahren.

Zudem wurde in den letzten Jahren ermittelt, dass in einigen Ländern wie z. B. in Argentinien die Zahl der Erstdiagnosen mit Mundhöhlenkarzinomen bei Frauen stärker gestiegen ist (Brandizzi et al. 2005).

Es zeichnet sich die Tendenz ab, dass auch junge Menschen und Frauen an einem OSCC erkranken, ohne den hier dargestellten gängigen Risikofaktoren ausgesetzt zu sein. Dies führt zu der Vermutung, dass neben den genannten Einflüssen weitere ätiologische Faktoren wie Humane Papilomviren oder genetische Faktoren bei der Entstehung von OSCC eine große Rolle spielen (Dahlstrom et al. 2008; Ng et al. 2017).

Bei zwölf der 14 untersuchten Patienten, d. h. bei der Mehrheit der Patienten, war der histopathologische Differenzierungsgrad – das *Grading* – des Gewebes G2 (mäßig/moderat differenziert). Das *Grading* wird nach chirurgischer Resektion für das postoperative Management der Therapie und für die Bewertung der Prognose der Patienten herangezogen (Dissanayaka et al. 2012). Für gewöhnlich wird bei OSCC die Einteilung des Gradings nach Broder angewandt, die auch von der WHO anerkannt und übernommen wurde (Akhter et al. 2011).

In den 70er Jahren wurde in den Studien ein starker Zusammenhang zwischen dem histologischen Differenzierungsgrad und der Prognose der Patienten festgestellt (Arthur und Farr 1972). Auch wenn in einer aktuellen retrospektiven Studie beobachtet werden kann, dass schlechte histopathologische Gewebedifferenzierung auf einen Risikofaktor für das Auftreten lokaler Rezidive hindeutet (Troeltzsch et al. 2018), ist inzwischen bekannt, dass das Grading allein keinen verlässlichen prognostischen Wert für

die Diagnose und den Ausgang der Behandlung liefert (Dissanayaka et al. 2012; Woolgar und Triantafyllou 2009).

Ein wichtiger Grund liegt darin, dass nach der Einteilung nach Broder mehr als 90 % der oralen und oropharyngealen Plattenepithelkarzinome als moderat differenziert (G2) bewertet werden (Woolgar 2006). Diese Gegebenheit spiegelt sich auch in dieser Studie sehr gut wider.

In den letzten Jahren haben Untersuchungen gezeigt, dass die Tumordicke bei OSCC einen signifikanten Parameter für das Fortschreiten der Erkrankung und die Überlebensrate darstellt (Gonzalez-Moles et al. 2002; Li et al. 2013).

Zudem zeigen neuere Studien, dass Faktoren, wie das Muster der Tumorinvasion, die perineurale Invasion und die Lymphozytenreaktion eine weitaus größere Bedeutung für die Überlebensprognose besitzen und einen Einfluss auf das lokale Rezidiv haben (Brandweingensler et al. 2005; Dissanayaka et al. 2012).

Die histologische Auswertung dieser Studie zeigt, dass das komplexe Tumorgewebe humaner OSCC durchaus in ein tierisches Modell, dem CAM-Assay, mit Erfolg implantiert werden kann, ohne dass es nekrotisch wird. Wie in anderen Studien bereits beschrieben wurde (Ausprunk et al. 1975), konnte in mehreren Versuchsdurchläufen beobachtet werden, wie das Tumorgewebe mit der CAM des Hühnereis zusammenwächst und das Gewebe von den Arterien der CAM bzw. des Embryos revaskularisiert wird. Fortan wird das artfremde humane Gewebe mit Blut und Nährstoffen vom Hühnerembryo versorgt und hält dabei das Tumormilieu aufrecht (Mangir et al. 2018). Die histologischen Schnitte, bei dem das HLA angefärbt wurde bestätigen ein Anwachsen auf der CAM.

Bereits in seiner Studie von 1995 hat Ribatti darüber berichtet, dass sich innerhalb weniger Tage (nach Tag 8) die Blutgefäße innerhalb der CAM stark wachsen, vermehren und sich zu einem dichten Kapillarnetz formieren (Ribatti et al. 1995). So wie auch in dieser experimentellen Studie beobachtet wurde, umgeben und durchziehen die Blutgefäße das Tumorgewebe nach ca. drei Tagen und werden fortan vom Embryo versorgt (Ausprunk et al. 1975). Aufgrund der schnellen Vaskularisierung und damit verbundenen raschen Entwicklung der Tumorzellen, können auf diese Weise die Echtzeit-Veränderungen in der Morphologie der Tumorzellen beobachtet und analysiert werden.

Überträgt man diese Erkenntnis auf die vorliegende Arbeit, bedeutet es für den klinischen Alltag, dass durch diesen Versuchsaufbau theoretisch innerhalb kürzester Zeit Real-Time-Untersuchungen am Tumorgewebe durchgeführt werden können, während sich der Patient

noch stationär nach OP in Behandlung befindet. Nach Weiterentwicklung der Methode könnte die Therapie für jeden Patienten anhand des entnommenen Tumorgewebes schnell individualisiert zusammengesetzt und optimiert werden.

Ein weiterer Untersuchungspunkt dieser Studie bestand darin, zu überprüfen, inwiefern die EMT anhand der Schlüsselmediatoren TNF α und TGF β im Tumorgewebe nachweisbar ist. Die Wirkungsweise von TNF α und TGF β als Schlüsselmediatoren zur Aktivierung der EMT sind sehr ausgiebig erforscht (Coussens und Werb 2002; Nagaraj und Datta 2010).

E-Cadherin und Vimentin sind spezifische Biomarker und spielen eine entscheidende Rolle bei der EMT (Zeisberg und Neilson 2009). Unzählige Studien haben gezeigt, dass es während der EMT und des Tumorwachstums zu einer verminderten E-Cadherin-Expression und zu einer gesteigerten Vimentin-Produktion kommt (Hay 1995; Wellner et al. 2010; Zheng und Kang 2014). Dennoch bleibt es schwierig, diese Erkenntnisse auf die vorliegende klinische Studie zu übertragen.

Die vorliegenden Ergebnisse nach TNF- α - oder TGF- β -Stimulation unterscheiden sich teilweise von den bisher erforschten und bekannten Resultaten. Innerhalb der T-Kategorie ist nach TNF- α -Induktion bei den kleineren Tumoren ausgehend vom Median eine verminderte E-Cadherin-Expression, bei den T3/T4 Tumoren jedoch keine signifikante Veränderung in der E-Cadherin-Expression festzustellen. Nach der TGF- β -Induktion ist ausgehend vom Median in den kleinen Tumoren T1/T2 eine geringgradig verminderte Expression von E-Cadherin festzustellen. Bei den größeren Tumoren T3/T4 ist die E-Cadherin-Expression entgegen der Erwartungen und bisherigen Feststellungen leicht gestiegen.

Die Vimentin-Expression verändert sich nach TNF- α - oder TGF- β -Induktion in den kleineren Tumoren nicht signifikant, tendenziell ist nach der TNF- α -Induktion jedoch eine gesteigerte Vimentin-Expression zu beobachten. In den größeren Tumoren T3/T4 verringert sich die Vimentin-Expression geringfügig entgegen der Annahmen und bisherigen Erkenntnissen sowohl nach TNF- α -Induktion als auch nach TGF- β -Induktion.

Ausgehend vom aktuellen Kenntnisstand, könnte man annehmen, dass die größeren Tumore in Relation zu den kleineren Tumoren eine reduzierte E-Cadherin-Expression und eine gesteigerte Vimentin-Expression aufweisen müssten. In den bislang veröffentlichten Studien gibt es gegensätzliche Ergebnisse zu den Untersuchungen, die die Tumorgröße und deren Einfluss auf die E-Cadherin-Expression betreffen. Während Wang et al. von einer signifikanten Verbindung zwischen der E-Cadherin-Expression und der Tumorgröße

berichtet, konnte Mehendiratta et al. in ihrer Studie keinen Zusammenhang zwischen den beiden Faktoren feststellen (Mehendiratta et al. 2014; Wang et al. 2009).

In der vorliegenden Arbeit zeigt die Auswertung in der Kontrollgruppe eine verminderte Expression von E-Cadherin bei den größeren Tumoren T3/T4 im Vergleich zu den kleineren Tumoren T1/T2 sowie eine gesteigerte Vimentin-Expression bei den größeren Tumoren T3/T4 in Relation zu den kleineren Tumoren T1/T2.

Die Erkenntnisse aus der Studie von Zheng und Kang (2014), dass es während der EMT und des Tumorwachstums zu einer verminderten E-Cadherin-Expression und zu einer gesteigerten Vimentin-Produktion kommt, wurde in diesen Auswertungsergebnissen, die anhand der N-Gruppe geordnet wurden, teilweise dargestellt. Die Ergebnisse der E-Cadherin-Expression nach TNF- α -Stimulation spiegeln die aktuelle Studienlage wieder. Sowohl bei den Tumoren mit regionären Lymphknotenmetastasen (N1/N2) als auch bei den Tumoren ohne regionäre Lymphknotenmetastasen (N0) ist nach der Induktion von TNF α eine verminderte E-Cadherin-Expression zu vernehmen. Die E-Cadherin-Expression nach TGF- β -Induktion zeigt sich wider Erwarten in der N0-Gruppe erhöht und in der N1-/N2-Gruppe unverändert.

Vimentin wird in der Gruppe mit regionären Lymphknotenmetastasen sowohl nach TNF- α - als auch nach TGF- β -Stimulation mehr exprimiert. Die Vimentin-Expression bei den Tumoren ohne Lymphknotenmetastasen verhält sich gegenläufig zu den bisher bekannten Ergebnissen und verringert sich demnach sowohl nach TNF- α - als auch nach TGF- β -Induktion.

Wissenschaftliche Arbeiten haben herausgefunden, dass das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen mit einer reduzierten E-Cadherin-Expression assoziiert werden kann. Zum Beispiel konnten in den Studien von Yang et al. oder He et al. gezeigt werden, dass Lymphknotenmetastasen mit einer verminderten Expression von E-Cadherin im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom bzw. im Kolorektalen Karzinom einhergehen (He et al. 2013; Yang et al. 2014). Ausgehend von den Studien zur EMT liegt die Vermutung nahe, dass das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen neben der reduzierten E-Cadherin-Expression auch zu einer gesteigerten Vimentin-Expression führt. Diese beiden Erwartungen konnten in dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Die Kontrollgruppen zeigen gegenteilige Ergebnisse: Die E-Cadherin-Expression ist bei der N1-/N2-Gruppe im Vergleich zur N0-Gruppe leicht erhöht und die Vimentin-Expression ist vermindert.

Diese Ergebnisse deuten auf eine unspezifische Reaktion des Tumorgewebes auf die TNF- α - und TGF- β -Induktion hin. Die Vimentin- und E-Cadherin-Expression kann durchaus in den histologischen Schnitten mit Hilfe der Färbungen nachgewiesen werden, doch die Zytokininduktion scheint keine signifikanten, reproduzierbaren Effekte auf die Vimentin- und E-Cadherin-Expression zu haben. Somit kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nicht eindeutig geklärt und nachgewiesen werden, ob die EMT in dem Tumorgewebe nach Zytokininduktion weiter stattgefunden hat.

Ein möglicher Lösungsansatz für diese Problematik liegt in der Erhöhung der Quantität der Proben. Die Steigerung der Probenzahl und folglich der Patientenzahl könnte eindeutigere Resultate liefern und die Qualität der Untersuchungsergebnisse verbessern.

Der Ablauf der EMT spielt eine entscheidende Rolle bei der Tumorgenese und Tumorprogression. Thiery (2002) hat in seiner Studie nachgewiesen, wie die pathologische Aktivierung der EMT dazu führt, dass die epithelialen Zellen des Karzinoms sich aus dem Zellverband lösen und einen mesenchymalen Charakter annehmen. Dadurch werden die Tumorzellen mobil, migrieren durch die Basalmembran und werden passiv über die Blut und Lymphbahn zu dem entfernt liegenden Gewebe transportiert. Nach dem Durchlaufen des Umkehrprozesses MET bilden die Tumorzellen dort neue Tumore.

Die Mehrheit der Studien zur EMT hat bisher Untersuchungen an Tumorzellkulturen durchgeführt, nachdem auf künstlichem Wege z. B. durch ektopische Expression von Transkriptionsfaktoren oder Wachstumsfaktoren eine EMT hervorgerufen wurde (Harner-Foreman et al. 2017; Papageorgis 2015; Yang et al. 2004). Anhand dieser Untersuchungen an isolierten Tumorzellen in Zellkulturen konnte über die letzten Jahrzehnte ein umfangreiches Wissen über die molekularen Vorgänge der EMT aufgebaut werden (DeBord et al. 2018). Auch die weitere Forschung in vivo mit genetisch veränderten Mausmodellen basierend auf dem Gen-Knock-out-/Gen-Knock-in-Verfahren hat zusätzlich dazu beigetragen, die Funktion bestimmter Transkriptionsfaktoren und Regulatoren im Hinblick auf die EMT besser zu verstehen (Tsai et al. 2012). Obwohl die Rolle der EMT bei der Tumorentstehung und Metastasenbildung ausgiebig in präklinischen Studien untersucht wurde, stellt die Umsetzung dieser Ergebnisse in ein klinisches Modell immer noch eine Herausforderung dar (Santamaria et al. 2017). Dennoch bleibt es schwierig, diese Erkenntnisse in die klinischen Studien zu übertragen. In dem 2018 veröffentlichten Review von DeBord et al. (2018) werden die Vorteile von Untersuchungen mit Tumorgewebe auf der CAM patient-derived-xenografts (PDX) im Vergleich zu Untersuchungen mit Tumorzelllinien auf der

CAM beschrieben. Ein sehr großer Vorteil des Tumorgewebes liegt darin, dass die Morphologie, die zelluläre Heterogenität und die molekularen Gegebenheiten des Originaltumors erhalten bleiben, wodurch bessere Untersuchungsergebnisse erzielt werden. Denn im Vergleich zu den Untersuchungen mit Tumorzelllinien können durch den Erhalt des Tumormilieus das Verhalten von Zell-Zell-Kontakte und der extrazellulären Matrix in einem kanzerogenen Gewebe dargestellt werden. Zudem kann das Verhalten des kompletten Gewebes auf bestimmte Reize untersucht und somit auch die Reaktionsweise des Originaltumors eher nachgestellt werden (DeBord et al. 2018).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die gegebene Tumorarchitektur in dem hier untersuchten Gewebe zu nutzen und die EMT anhand des CAM-Modells in dem Tumorgewebe nachzuweisen, um im nächsten Schritt ein besseres Verständnis für die Komplexität der zellulären Vorgänge und für die Wechselwirkung mit der extrazellulären Matrix zu erlangen. In den bisherigen Studien konnte durch das Fehlen der drei dimensional Tumorarchitektur in den Tumorzelllinien die Auswirkung der EMT auf das komplexe humane Gewebe nicht dargestellt werden.

Die Verwendung vom humanen Tumorgewebe in Kombination mit dem CAM-Assay hat in der Entwicklung der individuellen Tumorthherapie und Erprobung von Arzneimitteln einen bedeutenden Fortschritt erbracht, da die Medikamentenwirkung im humanen Gewebe in Bezug auf den Originaltumor exakter wiedergegeben wird (DeBord et al. 2018). Dennoch ist es schwierig, mit dem gleichen CAM-Modell und der Verwendung von humanem Tumorgewebe den Einfluss der EMT bei der Tumorgenese und Metastasenbildung darzustellen (Santamaria et al. 2017). Die Schwierigkeit der Ermittlung des Stadiums der EMT-MET-Kaskade in pathologischen Analysen der menschlichen Biopsien und das unterschiedliche Metastasierungsmuster bei verschiedenen Tumorarten stellen eine große Herausforderung für die Darstellung der EMT in einem ausgewählten humanen Gewebe dar (DeBord et al. 2018; Tarin et al. 2005).

Die Ergebnisse dieser Studie verdeutlichen, dass die Schlüsselmarker E-Cadherin und Vimentin alleine nicht ausreichen, um die EMT in seiner Komplexität in diesem Modell darzustellen. Dies bleibt weiteren molekularbiologischen Untersuchungen am Signalweg vorbehalten.

4.3 Ausblick

Die Untersuchung der Tumorgenese von OSCC ist und bleibt von enormer Wichtigkeit in zahlreichen Forschungsprojekten, um Fortschritte in den Therapiemethoden zu erzielen.

Nach Weiterentwicklung der hier beschriebenen Methode könnte der CAM-Assay in Zukunft dafür genutzt werden, Therapieansätze und Arzneimittel für die Patienten zuvor anhand der Gewebeprobe auszutesten und danach für jeden Patienten individuell die optimale Therapie zu bestimmen (DeBord et al. 2018).

Eine Überlegung zur Verbesserung der Aussagekraft der Ergebnisse ist die Erhöhung der Patientenzahl oder die Vergrößerung der entnehmenden Tumorgewebeprobe pro Patient, um mehr Untersuchungsmaterial zu erhalten. Jedoch muss hierbei berücksichtigt werden, dass bei der Arbeit mit frischem Tumorgewebe das Untersuchungsobjekt stets limitiert ist und für Forschungszwecke nur eine begrenzte Gewebegröße zur Verfügung gestellt werden kann, ohne die TNM-Klassifikation oder weiterführende pathologische Untersuchungen zu beeinträchtigen.

Als weiterer Untersuchungsansatz könnte in den nachfolgenden Studien die Kombinationsinduktion der Zytokine TNF α und TGF β untersucht werden, um die Interaktion der beiden Zytokine im Tumorgewebe näher zu beobachten.

Des Weiteren bietet der CAM-Assay durch die starke Vaskularisierung die optimale Voraussetzung zur Erforschung der Metastasenbildung im Hühnerembryo und in der Nabelschnur des Embryos. Forschungsergebnisse hinsichtlich der Metastasenbildung, die in dem CAM-Assay mit Tumorzelllinien bereits erzielt wurden (Deryugina und Quigley 2008), könnten überprüft und verglichen werden, inwiefern sie auf das CAM-Modell mit humanem Tumorfrischgewebe übertragbar sind. Zudem könnten anhand des Versuchsaufbaus mit Tumorgewebe weiterführende Informationen zu den funktionellen Mechanismen der Metastasenbildung hervorgebracht und das Metastasierungsverhalten in einem komplexen Gewebe besser untersucht werden.

5 Zusammenfassung

Viele Studien haben sich damit befasst, den komplexen Aufbau des kanzerogenen Gewebes zu erforschen und neue Erkenntnisse in der Bekämpfung von Tumorerkrankungen zu erhalten. Ein wichtiger Untersuchungspunkt dieser Studie war es, zu überprüfen, ob das humane Frischgewebe vom OSCC im CAM-Assay angewandt werden kann. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Studie bestand darin, mithilfe des hier untersuchten CAM-Modells biologische und immunhistologische Untersuchungen am Tumorgewebe vorzunehmen, um die zusammenhängenden Mechanismen der EMT näher zu beleuchten. Die EMT spielt eine gravierende Rolle bei der Tumorentstehung. Es ist bewiesen, dass die Zytokine TNF α und TGF β die EMT begünstigen. Daher sollte anhand der Induktion dieser Zytokine die EMT im humanen Gewebe des OSCC beobachtet und erforscht werden. Die Auswirkung der Induktion wurde in der vorliegenden Arbeit anhand der charakteristischen EMT-Marker E-Cadherin und Vimentin bewertet.

Diese experimentelle Studie zeigt, dass das CAM-Modell in Kombination mit humanem Frischgewebe des OSCC gut funktioniert. Das Tumorgewebe wächst auf der CAM des Hühnereis an und wird fortan vom Hühnerembryo versorgt.

Die Ergebnisse der Studie verdeutlichen, dass jedoch die Darstellung der EMT in einem Tumorgewebe im CAM-Assay nach wie vor eine große Herausforderung darstellt. In der vorliegenden Arbeit konnte nach Induktion von TNF α und TGF β zum größten Teil keine spezifische Reaktion in den Tumorsektaten beobachtet werden.

Anhand der Färbungen der histologischen Schnitte konnten die Schlüsselmarker der EMT E-Cadherin und Vimentin nachgewiesen werden. Jedoch wird deutlich, dass E-Cadherin und Vimentin alleine nicht ausreichen, um die Komplexität der EMT zu erfassen.

In weiteren Studien ist es wichtig, auf molekularer Ebene den Signalweg der EMT innerhalb des Tumorgewebes zu untersuchen.

Der CAM-Assay ist im Zusammenhang mit der Anwendung von humanem Tumorgewebe in der Vorbereitung und in der Ausführung zeitintensiv. Jedoch lässt sich das Verfahren nach wenigen Probe-Durchgängen gut in den klinischen Alltag integrieren. Durch das schnelle Anwachsen des Tumorgewebes bietet es einen bedeutenden Vorteil für die klinischen Untersuchungen.

Von einem gänzlichen Verständnis der Ätiologie der Tumorentstehung und der Heilung der Tumorerkrankung ist die Forschung noch weit entfernt. Die Weiterentwicklung der in dieser Arbeit dargestellten Methode könnte dazu beitragen, die Vorgänge im menschlichen Körper, die bei der Tumorentstehung stattfinden, im Labor besser zu imitieren und somit die Komplexität des Ganzen besser zu beleuchten sowie potenzielle Lösungsansätze bei der Abwehr der Tumorgenese zu fördern.

6 Quellenverzeichnis

Akhter M, Hossain S, Rahman QB, Molla MR (2011): A study on histological grading of oral squamous cell carcinoma and its co-relationship with regional metastasis. *J Oral Maxillofac Pathol* 15, 168-176

Arthur K, Farr HW (1972): Prognostic significance of histologic grade in epidermoid carcinoma of the mouth and pharynx. *Am J Surg* 124, 489-492

Ausprunk DH, Knighton DR, Folkman J (1975): Vascularization of normal and neoplastic tissues grafted to the chick chorioallantois: Role of host and preexisting graft blood vessels. *Am J Pathol* 79, 597-618

Balakirski G, Holzle F, Megahed M (2014): Plattenepithelkarzinom als das häufigste Mundhöhlenkarzinom: Diagnostik und Therapie. *Hautarzt* 65, 390-392

Balkwill F (2002): Tumor necrosis factor or tumor promoting factor? *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 135-141

Balkwill F (2006): TNF-alpha in promotion and progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 25, 409-416

Balkwill F (2009): Tumour necrosis factor and cancer. *Nat Rev Cancer* 9, 361-371

Balkwill F, Mantovani A (2001): Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* 357, 539-545

Bastian H, Burmester GR (2010): Does TNF play a role in the pathogenesis of solid tumors? *Z Rheumatol* 69, 483-485

Bates RC, Mercurio AM (2003): Tumor necrosis factor-alpha stimulates the epithelial-to-mesenchymal transition of human colonic organoids. *Mol Biol Cell* 14, 1790-1800

Behrens J, Vakaet L, Friis R, Winterhager E, van Roy F, Mareel MM, Birchmeier W (1993): Loss of epithelial differentiation and gain of invasiveness correlates with tyrosine phosphorylation of the E-cadherin/beta-catenin complex in cells transformed with a temperature-sensitive v-SRC gene. *J Cell Biol* 120, 757-766

Bernier J (2009): Current state-of-the-art for concurrent chemoradiation. *Semin Radiat Oncol* 19, 3-10

Bernier J, Domenge C, Ozsahin M, Matuszewska K, Lefebvre JL, Greiner RH, Giralt J, Maingon P, Rolland F, Bolla M et al. (2004): Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Engl J Med* 350, 1945-1952

Beutler B, Cerami A (1987): Cachectin: more than a tumor necrosis factor. *N Engl J Med* 316, 379-385

- Birchmeier W, Behrens J (1994): Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta* 1198, 11-26
- Birchmeier W, Weidner KM, Behrens J (1993): Molecular mechanisms leading to loss of differentiation and gain of invasiveness in epithelial cells. *J Cell Sci Suppl* 17, 159-164
- Brandizzi D, Chuchurru JA, Lanfranchi HE, Cabrini RL (2005): Analysis of the epidemiological features of oral cancer in the city of Buenos Aires. *Acta Odontol Latinoam* 18, 31-35
- Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ, Genden E, Urken ML, Wang BY (2005): Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol* 29, 167-178
- Breslow A (1970): Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 172, 902-908
- Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, Del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA (2000): The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2, 76-83
- Chan JK (2014): The wonderful colors of the hematoxylin-eosin stain in diagnostic surgical pathology. *Int J Surg Pathol* 22, 12-32
- Chu W, Strawitz JG (1978): Results in suprahyoid, modified radical, and standard radical neck dissections for metastatic squamous cell carcinoma: recurrence and survival. *Am J Surg* 136, 512-515
- Chung YJ, Song JM, Lee JY, Jung YT, Seo EJ, Choi SW, Rhyu MG (1996): Microsatellite instability-associated mutations associate preferentially with the intestinal type of primary gastric carcinomas in a high-risk population. *Cancer Res* 56, 4662-4665
- Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van Grunsven L, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, van Roy F (2001): The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 7, 1267-1278
- Coussens LM, Werb Z (2002): Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860-867
- Cronin KA, Lake AJ, Scott S, Sherman RL, Noone AM, Howlader N, Henley SJ, Anderson RN, Firth AU, Ma J et al. (2018): Annual Report to the Nation on the Status of Cancer, part I: National cancer statistics. *Cancer* 124, 2785-2800
- Dahlstrom KR, Little JA, Zafereo ME, Lung M, Wei Q, Sturgis EM (2008): Squamous cell carcinoma of the head and neck in never smoker-never drinkers: a descriptive epidemiologic study. *Head Neck* 30, 75-84
- De Bono JS, Ashworth A (2010): Translating cancer research into targeted therapeutics. *Nature* 467, 543-549

Debord LC, Pathak RR, Villaneuva M, Liu HC, Harrington DA, Yu W, Lewis MT, Sikora AG (2018): The chick chorioallantoic membrane (CAM) as a versatile patient-derived xenograft (PDX) platform for precision medicine and preclinical research. *Am J Cancer Res* 8, 1642-1660

Deryugina EI, Quigley JP (2008): Chick embryo chorioallantoic membrane model systems to study and visualize human tumor cell metastasis. *Histochem Cell Biol* 130, 1119-1130

DGMKG (2012): Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinom. Version 2.0.; S3-Leitlinie des Leitlinienprogramms Onkologie der AWMF, Deutschen Krebsgesellschaft e.V. und Deutschen Krebshilfe e.V. https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/fileadmin/user_upload/Downloads/Leitlinien/Mundhoehlenkarzinom/S3-Mundhoehlenkarzinom-OL-Langversion_.pdf; abgerufen am 13.07.2017.

Dissanayaka WL, Pitiyage G, Kumarasiri PV, Liyanage RL, Dias KD, Tilakaratne WM (2012): Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 113, 518-525

Ebert JD (1954): The effects of chorioallantoic transplants of adult chicken tissues on homologous tissues of the host chick embryo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 40, 337-347

Eckes B, Dogic D, Colucci-Guyon E, Wang N, Maniotis A, Ingber D, Merckling A, Langa F, Aumailley M, Delouvee A et al. (1998): Impaired mechanical stability, migration and contractile capacity in vimentin-deficient fibroblasts. *J Cell Sci* 111, 1897-1907

Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, Berx G, Cano A, Beug H, Foisner R (2005): DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 24, 2375-2385

Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari HM, Goldman RD (2009): Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *J Clin Invest* 119, 1763-1771

Ferician O, Cimpean AM, Avram S, Raica M (2015): Endostatin Effects on Tumor Cells and Vascular Network of Human Renal Cell Carcinoma Implanted on Chick Embryo Chorioallantoic Membrane. *Anticancer Res* 35, 6521-6528

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010): Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer* 127, 2893-2917

Ferlito A, Robbins KT, Shah JP, Medina JE, Silver CE, Al-Tamimi S, Fagan JJ, Paleri V, Takes RP, Bradford CR et al. (2011): Proposal for a rational classification of neck dissections. *Head Neck* 33, 445-450

Fu KK, Pajak TF, Trotti A, Jones CU, Spencer SA, Phillips TL, Garden AS, Ridge JA, Cooper JS, Ang KK (2000): A Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) phase III randomized study to compare hyperfractionation and two variants of accelerated fractionation to standard fractionation radiotherapy for head and neck squamous cell carcinomas: first report of RTOG 9003. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 48, 7-16

- Fuchs A, Lindenbaum ES (1988): The two- and three-dimensional structure of the microcirculation of the chick chorioallantoic membrane. *Acta Anat (Basel)* 131, 271-275
- Gall TM, Frampton AE (2013): Gene of the month: E-cadherin (CDH1). *J Clin Pathol* 66, 928-932
- Gold LI (1999): The role for transforming growth factor-beta (TGF-beta) in human cancer. *Crit Rev Oncog* 10, 303-360
- Gonzalez-Moles MA, Esteban F, Rodriguez-Archilla A, Ruiz-Avila I, Gonzalez-Moles S (2002): Importance of tumour thickness measurement in prognosis of tongue cancer. *Oral Oncol* 38, 394-397
- Gottardi CJ, Gumbiner BM (2001): Adhesion signaling: how beta-catenin interacts with its partners. *Curr Biol* 11, 792-794
- Greenburg G, Hay ED (1982): Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J Cell Biol* 95, 333-339
- Gumbiner BM (1996): Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell* 84, 345-357
- Halbleib JM, Nelson WJ (2006): Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev* 20, 3199-3214
- Hamoir M, Schmitz S, Gregoire V (2014): The role of neck dissection in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Curr Treat Options Oncol* 15, 611-624
- Harner-Foreman N, Vadakekolathu J, Laversin SA, Mathieu MG, Reeder S, Pockley AG, Rees RC, Boocock DJ (2017): A novel spontaneous model of epithelial-mesenchymal transition (EMT) using a primary prostate cancer derived cell line demonstrating distinct stem-like characteristics. *Sci Rep* 7, 40633
- Hay ED (1995): An overview of epithelio-mesenchymal transformation. *Acta Anat (Basel)* 154, 8-20
- He X, Chen Z, Jia M, Zhao X (2013): Downregulated E-cadherin expression indicates worse prognosis in Asian patients with colorectal cancer: evidence from meta-analysis. *PLoS One* 8, e70858
- Hehlhans T, Pfeffer K (2005): The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology* 115, 1-20
- Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinska E, Byrne AT, Caldas C, Clarke RB, De Jong S, Jonkers J, Maclandsmo GM et al. (2014): Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov* 4, 998-1013
- Hirohashi S (1998): Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol* 153, 333-339

- Ho MY, Tang SJ, Chuang MJ, Cha TL, Li JY, Sun GH, Sun KH (2012): TNF-alpha induces epithelial-mesenchymal transition of renal cell carcinoma cells via a GSK3beta-dependent mechanism. *Mol Cancer Res* 10, 1109-1119
- Howaldt HP, Vorast H, Blecher JC, Reicherts M, Kainz M (2000): Ergebnisse aus dem DOSAK-Tumorregister. *Mund Kiefer Gesichtschir* 4 216-225
- Huang SF, Kang CJ, Lin CY, Fan KH, Yen TC, Wang HM, Chen IH, Liao CT, Cheng AJ, Chang JT (2008): Neck treatment of patients with early stage oral tongue cancer: comparison between observation, supraomohyoid dissection, and extended dissection. *Cancer* 112, 1066-1075
- Huang SH, Hwang D, Lockwood G, Goldstein DP, O'sullivan B (2009): Predictive value of tumor thickness for cervical lymph-node involvement in squamous cell carcinoma of the oral cavity: a meta-analysis of reported studies. *Cancer* 115, 1489-1497
- Huber AH, Weis WI (2001): The structure of the beta-catenin/E-cadherin complex and the molecular basis of diverse ligand recognition by beta-catenin. *Cell* 105, 391-402
- Islam S, Carey TE, Wolf GT, Wheelock MJ, Johnson KR (1996): Expression of N-cadherin by human squamous carcinoma cells induces a scattered fibroblastic phenotype with disrupted cell-cell adhesion. *J Cell Biol* 135, 1643-1654
- Ismail MS, Torsten U, Dressler C, Diederichs JE, Huske S, Weitzel H, Berlien HP (1999): Photodynamic Therapy of Malignant Ovarian Tumours Cultivated on CAM. *Lasers Med Sci* 14, 91-96
- Jakowlew SB (2006): Transforming growth factor-beta in cancer and metastasis. *Cancer Metastasis Rev* 25, 435-457
- Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA (2011): Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol 2000* 57, 19-37
- Kalluri R, Neilson EG (2003): Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 112, 1776-1784
- Kalluri R, Weinberg RA (2009): The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 119, 1420-1428
- Karayiannakis AJ, Syrigos KN, Polychronidis A, Pitiakoudis M, Bounovas A, Simopoulos K (2001): Serum levels of tumor necrosis factor-alpha and nutritional status in pancreatic cancer patients. *Anticancer Res* 21, 1355-1358
- Kim Y, Williams KC, Gavin CT, Jardine E, Chambers AF, Leong HS (2016): Quantification of cancer cell extravasation in vivo. *Nat Protoc* 11, 937-948
- Klingenberg M, Becker J, Eberth S, Kube D, Wilting J (2014): The chick chorioallantoic membrane as an in vivo xenograft model for Burkitt lymphoma. *BMC Cancer* 14, 339

- Knighton D, Ausprunk D, Tapper D, Folkman J (1977): Avascular and vascular phases of tumour growth in the chick embryo. *Br J Cancer* 35, 347-356
- Koo BS, Lim YC, Lee JS, Choi EC (2006): Management of contralateral N0 neck in oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck* 28, 896-901
- Kreppel M, Drebber U, Eich HT, Dreiseidler T, Zoller JE, Muller RP, Scheer M (2011): Combined-modality treatment in advanced oral squamous cell carcinoma: Primary surgery followed by adjuvant concomitant radiochemotherapy. *Strahlenther Onkol* 187, 555-560
- Krippner-Heidenreich A, Tubing F, Bryde S, Willi S, Zimmermann G, Scheurich P (2002): Control of receptor-induced signaling complex formation by the kinetics of ligand/receptor interaction. *J Biol Chem* 277, 44155-44163
- Lacroix M, Leclercq G (2004): Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat* 83, 249-289
- Landis MD, Lehmann BD, Pietenpol JA, Chang JC (2013): Patient-derived breast tumor xenografts facilitating personalized cancer therapy. *Breast Cancer Res* 15, 201
- Larsen SR, Johansen J, Sorensen JA, Krogdahl A (2009): The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 38, 657-662
- Leeson TS, Leeson CR (1963): The chorio-allantois of the chick: light and electron microscopic observations at various times of incubation. *J Anat* 97, 585-595
- Leighton J (1964): Invasion and metastasis of heterologous tumors in the chick embryo. *Prog Exp Tumor Res* 4, 98-125
- Lejeune FJ, Ruegg C, Lienard D (1998): Clinical applications of TNF-alpha in cancer. *Curr Opin Immunol* 10, 573-580
- Li C, Li Q, Cai Y, He Y, Lan X, Wang W, Liu J, Wang S, Zhu G, Fan J et al. (2016): Overexpression of angiopoietin 2 promotes the formation of oral squamous cell carcinoma by increasing epithelial-mesenchymal transition-induced angiogenesis. *Cancer Gene Ther* 23, 295-302
- Li Y, Bai S, Carroll W, Dayan D, Dort JC, Heller K, Jour G, Lau H, Penner C, Prystowsky M et al. (2013): Validation of the risk model: high-risk classification and tumor pattern of invasion predict outcome for patients with low-stage oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol* 7, 211-223
- Lim SC, Zhang S, Ishii G, Endoh Y, Kodama K, Miyamoto S, Hayashi R, Ebihara S, Cho JS, Ochiai A (2004): Predictive markers for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Cancer Res* 10, 166-172
- Listl S, Jansen L, Stenzinger A, Freier K, Emrich K, Holleczeck B, Katalinic A, Gondos A, Brenner H (2013): Survival of patients with oral cavity cancer in Germany. *PLoS One* 8, e53415

- Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ (2001): The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501
- Lokman NA, Elder AS, Ricciardelli C, Oehler MK (2012): Chick chorioallantoic membrane (CAM) assay as an in vivo model to study the effect of newly identified molecules on ovarian cancer invasion and metastasis. *Int J Mol Sci* 13, 9959-9970
- Lu T, Stark GR (2004): Cytokine overexpression and constitutive NFkappaB in cancer. *Cell Cycle* 3, 1114-1117
- Luo JL, Maeda S, Hsu LC, Yagita H, Karin M (2004): Inhibition of NF-kappaB in cancer cells converts inflammation- induced tumor growth mediated by TNFalpha to TRAIL-mediated tumor regression. *Cancer Cell* 6, 297-305
- Madhusudan S, Foster M, Muthuramalingam SR, Braybrooke JP, Wilner S, Kaur K, Han C, Hoare S, Balkwill F, Talbot DC et al. (2004): A phase II study of etanercept (Enbrel): a tumor necrosis factor alpha inhibitor in patients with metastatic breast cancer. *Clin Cancer Res* 10, 6528-6534
- Madhusudan S, Muthuramalingam SR, Braybrooke JP, Wilner S, Kaur K, Han C, Hoare S, Balkwill F, Ganesan TS (2005): Study of etanercept: a tumor necrosis factor-alpha inhibitor in recurrent ovarian cancer. *J Clin Oncol* 23, 5950-5959
- Mangir N, Raza A, Haycock JW, Chapple C, Macneil S (2018): An Improved In Vivo Methodology to Visualise Tumour Induced Changes in Vasculature Using the Chick Chorionic Allantoic Membrane Assay. *In Vivo* 32, 461-472
- Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B et al. (1995): Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 268, 1336-1338
- Massague J (2008): TGFbeta in Cancer. *Cell* 134, 215-230
- Mattijssen V, Peters HM, Schalkwijk L, Manni JJ, Van 'T Hof-Grootenboer B, De Mulder PH, Ruiter DJ (1993): E-cadherin expression in head and neck squamous-cell carcinoma is associated with clinical outcome. *Int J Cancer* 55, 580-585
- Mehendiratta M, Solomon MC, Boaz K, Guddattu V, Mohindra A (2014): Clinicopathological correlation of E-cadherin expression at the invasive tumor front of Indian oral squamous cell carcinomas: An immunohistochemical study. *J Oral Maxillofac Pathol* 18, 217-222
- Michaelson JE, Huang H (2012): Cell-cell junctional proteins in cardiovascular mechanotransduction. *Ann Biomed Eng* 40, 568-577
- Muller T, Choidas A, Reichmann E, Ullrich A (1999): Phosphorylation and free pool of beta-catenin are regulated by tyrosine kinases and tyrosine phosphatases during epithelial cell migration. *J Biol Chem* 274, 10173-10183
- Nagaraj NS, Datta PK (2010): Targeting the transforming growth factor-beta signaling pathway in human cancer. *Expert Opin Investig Drugs* 19, 77-91

- Neville BW, Day TA (2002): Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 52, 195-215
- Ng JH, Iyer NG, Tan MH, Edgren G (2017): Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. *Head Neck* 39, 297-304
- Otsuki S, Inokuchi M, Enjoji M, Ishikawa T, Takagi Y, Kato K, Yamada H, Kojima K, Sugihara K (2011): Vimentin expression is associated with decreased survival in gastric cancer. *Oncol Rep* 25, 1235-1242
- Palasz P, Adamski L, Gorska-Chrzastek M, Starzynska A, Studniarek M (2017): Contemporary Diagnostic Imaging of Oral Squamous Cell Carcinoma: A Review of Literature. *Pol J Radiol* 82, 193-202
- Papageorgis P (2015): TGFbeta Signaling in Tumor Initiation, Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Metastasis. *J Oncol* 2015, 587193
- Pectasides E, Rampias T, Sasaki C, Perisanidis C, Kouloulias V, Burtness B, Zaramboukas T, Rimm D, Fountzilas G, Psyrri A (2014): Markers of epithelial to mesenchymal transition in association with survival in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *PLoS One* 9, e94273
- Perkins ND (2004): NF-kappaB: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol* 14, 64-69
- Pikarsky E, Porat RM, Stein I, Abramovitch R, Amit S, Kasem S, Gutkovich-Pyest E, Urieli-Shoval S, Galun E, Ben-Neriah Y (2004): NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 431, 461-466
- Poniatowski LA, Wojdasiewicz P, Gasik R, Szukiewicz D (2015): Transforming growth factor Beta family: insight into the role of growth factors in regulation of fracture healing biology and potential clinical applications. *Mediators Inflamm* 2015, 137823
- Rajwar YC, Jain N, Bhatia G, Sikka N, Garg B, Walia E (2015): Expression and Significance of Cadherins and Its Subtypes in Development and Progression of Oral Cancers: A Review. *J Clin Diagn Res* 9, 05-07
- Raymond WA, Leong AS (1989): Vimentin: a new prognostic parameter in breast carcinoma? *J Pathol* 158, 107-114
- Ribatti D (2014): The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology. *Exp Cell Res* 328, 314-324
- Ribatti D (2016): The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM). A multifaceted experimental model. *Mech Dev* 141, 70-77
- Ribatti D, Urbinati C, Nico B, Rusnati M, Roncali L, Presta M (1995): Endogenous basic fibroblast growth factor is implicated in the vascularization of the chick embryo chorioallantoic membrane. *Dev Biol* 170, 39-49

- Richmond A, Su Y (2008): Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Dis Model Mech* 1, 78-82
- Robbins KT, Clayman G, Levine PA, Medina J, Sessions R, Shaha A, Som P, Wolf GT (2002): Neck dissection classification update: revisions proposed by the American Head and Neck Society and the American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 128, 751-758
- Robbins KT, Shaha AR, Medina JE, Califano JA, Wolf GT, Ferlito A, Som PM, Day TA (2008): Consensus statement on the classification and terminology of neck dissection. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 134, 536-538
- Rodgers LW, Jr., Stringer SP, Mendenhall WM, Parsons JT, Cassisi NJ, Million RR (1993): Management of squamous cell carcinoma of the floor of mouth. *Head Neck* 15, 16-19
- Rosenquist K (2005): Risk factors in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: a population-based case-control study in southern Sweden. *Swed Dent J Suppl* 179, 1-66
- Rosfjord E, Lucas J, Li G, Gerber HP (2014): Advances in patient-derived tumor xenografts: from target identification to predicting clinical response rates in oncology. *Biochem Pharmacol* 91, 135-143
- Rothman K, Keller A (1972): The effect of joint exposure to alcohol and tobacco on risk of cancer of the mouth and pharynx. *J Chronic Dis* 25, 711-716
- Saito H, Tsujitani S, Oka S, Kondo A, Ikeguchi M, Maeta M, Kaibara N (2000): An elevated serum level of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) significantly correlated with lymph node metastasis and poor prognosis in patients with gastric carcinoma. *Anticancer Res* 20, 4489-4493
- Santamaria PG, Moreno-Bueno G, Portillo F, Cano A (2017): EMT: Present and future in clinical oncology. *Mol Oncol* 11, 718-738
- Savagner P, Yamada KM, Thiery JP (1997): The zinc-finger protein slug causes desmosome dissociation, an initial and necessary step for growth factor-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Biol* 137, 1403-1419
- Semenzato G (1990): Tumour necrosis factor: a cytokine with multiple biological activities. *Br J Cancer* 61, 354-361
- Shi Y, Massague J (2003): Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* 113, 685-700
- Shingaki S, Suzuki I, Nakajima T, Kawasaki T (1988): Evaluation of histopathologic parameters in predicting cervical lymph node metastasis of oral and oropharyngeal carcinomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 66, 683-688
- Shingaki S, Takada M, Sasai K, Bibi R, Kobayashi T, Nomura T, Saito C (2003): Impact of lymph node metastasis on the pattern of failure and survival in oral carcinomas. *Am J Surg* 185, 278-284

- Smith A, Teknos TN, Pan Q (2013): Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 49, 287-292
- Soria G, Ofri-Shahak M, Haas I, Yaal-Hahoshen N, Leider-Trejo L, Leibovich-Rivkin T, Weitzenfeld P, Meshel T, Shabtai E, Gutman M et al. (2011): Inflammatory mediators in breast cancer: coordinated expression of TNF α & IL-1 β with CCL2 & CCL5 and effects on epithelial-to-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 11, 130
- Stope MB, Ronnau C, Schubert T, Staar D, Bradl J, Ziegler P, Streitberger A, Kroeger N, Zimmermann U, Walther R et al. (2013): "Transforming growth factor beta" im Prostatakarzinom: Zelluläre Wirkungen und molekulare Grundlagen. *Urologe A* 52, 378-383
- Storgard C, Mikolon D, Stupack DG (2005): Angiogenesis assays in the chick CAM. *Methods Mol Biol* 294, 123-136
- Szarvas T, Hoffmann F, Becker M, Schenck M, Vom Dorp F, Rubben H, Jager T (2011): Plasmakonzentrationen von E-Cadherin bei Tumorerkrankungen der Harnblase : Kann die Prognoseabschätzung hiermit verbessert werden? *Urologe A* 50, 64-70
- Szlosarek PW, Balkwill FR (2003): Tumour necrosis factor alpha: a potential target for the therapy of solid tumours. *Lancet Oncol* 4, 565-573
- Tarin D, Thompson EW, Newgreen DF (2005): The fallacy of epithelial mesenchymal transition in neoplasia. *Cancer Res* 65, 5996-6001
- Techasen A, Namwat N, Loilome W, Bungkanjana P, Khuntikeo N, Puapairoj A, Jearanaikoon P, Saya H, Yongvanit P (2012): Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) stimulates the epithelial-mesenchymal transition regulator Snail in cholangiocarcinoma. *Med Oncol* 29, 3083-3091
- Tentler JJ, Tan AC, Weekes CD, Jimeno A, Leong S, Pitts TM, Arcaroli JJ, Messersmith WA, Eckhardt SG (2012): Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Rev Clin Oncol* 9, 338-350
- Thiery JP (2002): Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer* 2, 442-454
- Troeltzsch M, Haidari S, Boser S, Probst FA, Ehrenfeld M, Otto S (2018): What Factors Are Associated With Regional Recurrence After Operative Treatment of Oral Squamous Cell Carcinoma? *J Oral Maxillofac Surg* 76, 2650-2659
- Tsai JH, Donaher JL, Murphy DA, Chau S, Yang J (2012): Spatiotemporal regulation of epithelial-mesenchymal transition is essential for squamous cell carcinoma metastasis. *Cancer Cell* 22, 725-736
- Vincent F, Hagiwara K, Ke Y, Stoner GD, Demetrick DJ, Bennett WP (1996): Mutation analysis of the transforming growth factor beta type II receptor in sporadic human cancers of the pancreas, liver, and breast. *Biochem Biophys Res Commun* 223, 561-564

- Vishnubalaji R, Atteya M, Al-Nbaheen M, Oreffo ROC, Aldahmash A, Alajezi NM (2015): Angiogenic Potential of Human Neonatal Foreskin Stromal Cells in the Chick Embryo Chorioallantoic Membrane Model. *Stem Cells International* 2015, 11
- Voskoglou-Nomikos T, Pater JL, Seymour L (2003): Clinical predictive value of the in vitro cell line, human xenograft, and mouse allograft preclinical cancer models. *Clin Cancer Res* 9, 4227-4239
- Wang H, Fang R, Wang XF, Zhang F, Chen DY, Zhou B, Wang HS, Cai SH, Du J (2013): Stabilization of Snail through AKT/GSK-3beta signaling pathway is required for TNF-alpha-induced epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer PC3 cells. *Eur J Pharmacol* 714, 48-55
- Wang H, Wang HS, Zhou BH, Li CL, Zhang F, Wang XF, Zhang G, Bu XZ, Cai SH, Du J (2013): Epithelial-mesenchymal transition (EMT) induced by TNF-alpha requires AKT/GSK-3beta-mediated stabilization of snail in colorectal cancer. *PLoS One* 8, e56664
- Wang S, Bai Z, Han J, Tian Y, Shang X, Wang L, Li J, Wu Y (2014): Improving the prediction of HLA class I-binding peptides using a supertype-based method. *J Immunol Methods* 405, 109-120
- Wang X, Zhang J, Fan M, Zhou Q, Deng H, Aisharif MJ, Chen X (2009): The expression of E-cadherin at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: immunohistochemical and RT-PCR analysis with clinicopathological correlation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 107, 547-554
- Wellner UF, Keck T, Brabletz T (2010): Lebermetastasen: Pathogenese und Onkogenese. *Chirurg* 81, 551-556
- Westbrook AM, Szakmary A, Schiestl RH (2010): Mechanisms of intestinal inflammation and development of associated cancers: lessons learned from mouse models. *Mutat Res* 705, 40-59
- Wittekind C: TNM: Klassifikation Maligner Tumoren. 8. Auflage; John Wiley & Sons, Incorporated, Weinheim 2017
- Wolfe F, Michaud K (2004): Lymphoma in rheumatoid arthritis: the effect of methotrexate and anti-tumor necrosis factor therapy in 18,572 patients. *Arthritis Rheum* 50, 1740-1751
- Wolff KD, Follmann M, Nast A (2012): Diagnostik und Therapie des Mundhöhlenkarzinoms. *Dtsch Arztebl Int* 109, 829-835
- Woolgar JA (2006): Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 42, 229-239
- Woolgar JA, Triantafyllou A (2009): Pitfalls and procedures in the histopathological diagnosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma and a review of the role of pathology in prognosis. *Oral Oncol* 45, 361-385

- Wu Y, Deng J, Rychahou PG, Qiu S, Evers BM, Zhou BP (2009): Stabilization of snail by NF-kappaB is required for inflammation-induced cell migration and invasion. *Cancer Cell* 15, 416-428
- Wu Y, Zhou BP (2010): TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion. *Br J Cancer* 102, 639-644
- Xiao L, Wang J, Li J, Chen X, Xu P, Sun S, He D, Cong Y, Zhai Y (2015): RORalpha inhibits adipocyte-conditioned medium-induced colorectal cancer cell proliferation and migration and chick embryo chorioallantoic membrane angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 308, 385-396
- Yamashita N, Tokunaga E, Kitao H, Hisamatsu Y, Taketani K, Akiyoshi S, Okada S, Aishima S, Morita M, Maehara Y (2013): Vimentin as a poor prognostic factor for triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 139, 739-746
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA (2004): Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117, 927-939
- Yang YL, Chen MW, Xian L (2014): Prognostic and clinicopathological significance of downregulated E-cadherin expression in patients with non-small cell lung cancer (NSCLC): a meta-analysis. *PLoS One* 9, e99763
- Zeisberg M, Neilson EG (2009): Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 119, 1429-1437
- Zheng H, Kang Y (2014): Multilayer control of the EMT master regulators. *Oncogene* 33, 1755-1763
- Zhou JP, Gao ZL, Zhou ML, He MY, Xu XH, Tao DT, Yang CC, Liu LK (2015): Snail interacts with Id2 in the regulation of TNF-alpha-induced cancer cell invasion and migration in OSCC. *Am J Cancer Res* 5, 1680-1691

Danksagung

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Henning Schliephake und Herrn PD Dr. Dr. Philipp Kauffmann, die mir die Möglichkeit für diese Dissertationsarbeit gaben. Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Dr. Philipp Kauffmann, der mir zu jeder Zeit als Ratgeber und Ansprechpartner zur Seite stand. Für das großartige Arbeitsklima und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung möchte ich mich herzlich bedanken.

Weiterhin möchte ich mich bei den MTAs der Abteilung Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, besonders Frau Ute Kant, für die technische Hilfe bei der Anfertigung der histologischen Präparate bedanken.

Ebenso danke ich Herrn Dr. Hannibal Bohnenberger und dem restlichen Institut der Pathologie (UMG) für die angenehme Zusammenarbeit und die Färbung der histologischen Präparate.