

Luca Sophie Engelmann
Dr. med.

Establishment of the 3D-Organotypic Co-Culture - a preclinical model for head and neck squamous cell carcinomas

Fach/Einrichtung: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
Doktorvater: Prof. Dr. rer. nat. Jochen Hess

Kopf-Hals-Plattenepithelkarzinome (HNSCC) sind weltweit häufig, gekennzeichnet durch eine starke inter- sowie intratumorale Heterogenität und zeigen ein schlechtes Langzeitüberleben. Wichtige tumorbiologische Einflussgrößen sind die Humane Papillomaviren (HPV)-induzierte Tumorigenese in Oropharynxkarzinomen sowie das Tumor Mikromilieu. Viele Mechanismen und Signalwege sind allerdings bis heute unzureichend verstanden. Hierbei könnten präklinische HNSCC-Modelle einerseits das Aufdecken komplexer interzellulärer Signalwege erleichtern und zum anderen die Etablierung eines prädiktiven Tests zur Patienten-Stratifizierung ermöglichen. Keines der bisher etablierte Modelle erfüllt alle relevanten Voraussetzungen für einen solchen prädiktiven Test. Diese sind eine hohe Erfolgsquote sowie Repräsentation einerseits der Heterogenität der Tumoren und andererseits wichtiger stromaler und immunologischer Komponenten des Tumor Mikromilieus. Ziel dieser Dissertation ist es, erstmalig das präklinische Modell der dreidimensionalen HNSCC Organotypischen Ko-Kultur (3D-HNSCC-OTC) zu etablieren.

Hierfür wurden Gewebeproben aus resezierten Tumoren von HNSCC-Patienten gewonnen und auf zuvor präparierten Dermalen Äquivalenten ko-kultiviert. Zudem wurde ein Teil der 3D-HNSCC-OTC mit fraktionierter Photonenstrahlung zu je 2 Gy an fünf konsekutiven Tagen bestrahlt. Aus allen generierten 3D-HNSCC-OTC und deren Primären wurden Paraffin-Schnitte hergestellt, welche mittels Hämatoxylin- und Eosin-Färbung, sowie mittels Immunhistochemie mit Antikörpern gegen Pan-Zytokeratin, Ki-67, p16^{INK4a}, vimentin, CD45, Smooth muscle actin alpha und cleaved caspase-3, untersucht wurden. Basierend hierauf wurde der Tumorzell-Anteil, ein Ki-67 Proliferations-Index sowie der Anteil an (CD45-positiven) Immunzellen bestimmt. p16^{INK4a}-positive Tumoren wurden zudem mittels PCR auf Hochrisiko-HPV-DNA untersucht. Klinisch-pathologische Daten zu den Patienten und Verlaufsdaten der Tumornachsorge wurden erhoben.

3D-HNSCC-OTC konnten von insgesamt (n=13) HNSCC-Patienten generiert und bis zu Tag 14 und für (n=6) zusätzlich bis zu Tag 21 in Kultur gehalten werden. Sechs Tumoren (n=6) wurden mittels kombinierter Testung aus p16^{INK4a}-IHC und HPV-PCR als HPV-induziert bestätigt. 3D-HNSCC-OTC nicht-HPV-induzierter Tumore zeigten bis zu Tag 21 vergleichbare histomorphologische Merkmale, niedrige cleaved caspase-3-Positivität, anhaltende Tumorzell- und Immunzell-Anteile sowie, nach initialem Abfall an Tag 7, stabile Ki-67-Proliferationsindizes. Dahingegen zeigte sich bei HPV-induzierten 3D-HNSCC-OTC ein verminderter Ki-67 Proliferationsindex und Immunzell-Anteil. In einem Teil der HPV-induzierten 3D-HNSCC-OTC konnten darüber hinaus Phänomene wie eine reduzierte Zellintegrität, erhöhte cleaved caspase-3-Positivität, eine Reduktion des Tumorzell-Anteils oder p16^{INK4a}-Negativität nachgewiesen werden. Smooth muscle actin alpha-positive Tumor-assoziierte Fibroblasten wurden in HPV-induzierten und nicht-HPV-induzierten 3D-HNSCC-OTC bis Tag 21 nachgewiesen. Drei Wachstumsmuster der Tumorzellen in 3D-HNSCC-OTC an der Grenzfläche zum Dermalen Äquivalent konnten unterschieden werden: Invasiv (n=2), expansiv (n=5) und silent (n=6) wachsende Tumore. Der einzige Patient, welcher in der Nachsorge (mittleres Follow-up 19,3 Monate) ein Tumorrezidiv entwickelte, zeigte einen

invasiv wachsenden Tumor im Modell. Fünf (n=5) 3D-HNSCC-OTC wurden fraktioniert bestrahlt und waren in zwei Fällen (n=2) stärker cleaved caspase-3-positiv, verglichen mit unbehandelten Kontrollen.

Der Bedarf an präklinischen HNSCC Modellen ist bisher nicht ausreichend beantwortet. Als vielversprechendes und neuartiges präklinisches Modell wurde die 3D-HNSCC-OTC in dieser Arbeit erstmals gezeigt. Für nicht HPV-induzierte 3D-HNSCC-OTC zeigte sich eine exzellente Erfolgsrate von 100%, welche die von etablierten Modellen weit übertrifft. Die Beobachtung, dass die erfolgreiche Kultur von HPV-induziertem HNSCC-Gewebe in der 3D-HNSCC-OTC deutlich erschwert ist, deckt sich mit Daten zur Etablierung von HPV-induzierten HNSCC Zelllinien und Tiermodellen und wirft letztendlich die Frage auf, ob HPV-induzierte HNSCC von bisher unbekanntem Faktoren abhängig sind, welche in all diesen Modellen nicht abgebildet werden. Im Gegensatz zu den meisten anderen präklinischen Modellen, sind relevante Komponenten des Tumor Mikromilieus wie Tumor-infiltrierenden Immunzellen und Tumor-assoziierte Fibroblasten in 3D-HNSCC-OTC bis Tag 21 repräsentiert. Die Eignung zu Testung von Therapeutika konnte am Beispiel der fraktionierten Bestrahlung gezeigt werden. Somit bietet die 3D-HNSCC-OTC eine vielversprechende Plattform für zukünftige Studien, erstens zur Aufdeckung interzellulärer Signalkaskaden, zweitens zur Testung neuartiger Therapeutika und drittens um Patienten-individualisiert klinische Verläufe mit Invasionsmustern und perspektivisch mit in-vitro Therapieantworten bei gleicher adjuvanter Therapie zu vergleichen.