



Ein dreidimensionales kutanes Melanommodell für den Einsatz in der präklinischen Testung

A three-dimensional cutaneous melanoma model for use in preclinical
testing

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,
Klasse Biomedizin

Vorgelegt von

Freia Florina Schmidt, geb. Schmid

aus

Kirchheim/Teck

Würzburg 2022



Eingereicht am:
Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Christian Janzen

1. Betreuer: Prof. Dr. Heike Walles

2. Betreuer: Prof. Dr. Matthias Goebeler

3. Betreuer: Prof. Dr. Jan Hansmann

4. Betreuer: Dr. Florian Groeber-Becker

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

**Success is not final, failure is not fatal:
It is the courage to continue that counts.**

Nach Winston Churchill

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation ‚*Ein dreidimensionales kutanes Melanommodell für den Einsatz in der präklinischen Testung*‘ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Würzburg,

(Freia Schmidt)

Zusammenfassung

Das maligne Melanom nimmt als Tumorerkrankung mit hoher Metastasierungsrate und steigenden Inzidenzraten bei höchster Mortalität aller Hauttumoren eine zunehmende Bedeutung in der modernen Onkologie ein. Frühzeitige Diagnosemöglichkeiten und moderne Behandlungen konnten das Überleben der Patienten bereits erheblich verbessern. Jedoch besteht nach wie vor Bedarf an geeigneten Modellen, um die Melanomprogression vollständig zu verstehen und neue wirksame Therapien zu entwickeln. Hierfür werden häufig Tiermodelle verwendet, diese spiegeln jedoch nicht die menschliche Mikroumgebung wider. Zweidimensionalen Zellkulturen fehlen dagegen entscheidende Elemente der Tumormikroumgebung. Daher wurde in dieser Arbeit ein dreidimensionales epidermales Tumormodell des malignen Melanoms, welches aus primären humanen Keratinozyten und verschiedenen Melanomzelllinien besteht, entwickelt. Die eingesetzten Melanomzelllinien variieren in ihren Treibermutationen, wodurch das Modell in der Lage ist, Wirkstoffe zu untersuchen, die spezifisch auf diese Mutationen wirken. Mit Techniken des Tissue Engineerings konnte ein dreidimensionales Hautmodell aufgebaut werden, das alle charakteristischen Schichten der Epidermis aufweist und im Bereich des *stratum basale* Melanomcluster ausbildet. Diese reichen je nach Größe und Ausdehnung bis in suprabasale Epidermisschichten hinein. Die Tumor-Histopathologie, der Tumorstoffwechsel sowie tumorassoziierte Proteinsekretionen ließen sich im *in vitro* Modell nachweisen. Darüber hinaus konnte ein Protokoll entwickelt werden, mit dem einzelne Zellen aus den Modellen reisolieren werden können. Dies ermöglichte es, den Proliferationszustand innerhalb des jeweiligen Modells zu charakterisieren und die Wirkung von Antitumortheraipen gezielt zu bewerten. Die Anwendbarkeit als Testsystem im Bereich der Tumortheraipen wurde mit dem in der Klinik häufig verwendeten v-raf-Maus-Sarkom-Virus-Onkogen-Homolog B (BRAF)-Inhibitor Vemurafenib demonstriert. Der selektive BRAF-Inhibitor reduzierte erfolgreich das Tumorstwachstum in den Modellen mit BRAF-mutierten Melanomzellen, was durch eine Verringerung der metabolischen Aktivität, der proliferierenden Zellen und des Glukoseverbrauchs gezeigt wurde. Für die Implementierung des Modells in die präklinische Therapieentwicklung wurde B-B-Dimethylacrylshikonin, ein vielversprechender Wirkstoffkandidat, welcher einen Zellzyklusarrest mit anschließender Apoptose bewirkt, im Modell getestet.

Bei einer Anwendung der Modelle im Bereich der Testung topischer Behandlungen ist eine Barrierefunktion der Modelle notwendig, die der *in vivo* Situation nahe kommt. Die

Barriereeigenschaften der Hautäquivalente wurden durch die Melanomzellen nachweislich nicht beeinflusst, sind aber im Vergleich zur *in vivo* Situation noch unzureichend. Eine signifikante Steigerung der Hautbarriere konnte durch die Bereitstellung von Lipiden und die Anregung hauteigener Regenerationsprozesse erreicht werden. Über den Nachweis des transepidermalen Wasserverlusts konnte eine Messmethode zur nicht-invasiven Bestimmung der Hautbarriere etabliert und über den Vergleich zur Impedanzspektroskopie validiert werden. Hierbei gelang es, erstmals die Korrelation der Hautmodelle zur *in vivo* Situation über ein solches Verfahren zu zeigen. Das entwickelte epidermale Modell konnte durch die Integration eines dermalen Anteils und einer Endothelzellschicht noch weiter an die komplexe Struktur und Physiologie der Haut angepasst werden um Untersuchungen, die mit der Metastierung und Invasion zusammenhängen, zu ermöglichen. Die artifizielle Dermis basiert auf einem Kollagen-Hydrogel mit primären Fibroblasten. Eine dezellularisierte Schweinedarmmatrix ließ sich zur Erweiterung des Modells um eine Endothelzellschicht nutzen. Dabei wanderten die primären Fibroblasten apikal in die natürliche Schweindarmmatrix ein, während die Endothelzellen basolateral eine geschlossene Schicht bildeten.

Die in dieser Arbeit entwickelten Gewebemodelle sind in der Lage, die Vorhersagekraft der *in vitro* Modelle und die *in vitro* - *in vivo* Korrelation zu verbessern. Durch die Kombination des Melanommodells mit einer darauf abgestimmten Analytik wurde ein neuartiges Werkzeug für die präklinische Forschung zur Testung von pharmazeutischen Wirkstoffen geschaffen.

Abstract

Malignant melanoma, as a tumor disease with a high metastasis rate and rising incidence rates with the highest mortality of all skin tumors, is assuming increasing importance in modern oncology. Early diagnosis and modern treatments significantly improved patient survival. There is still an unmet need for appropriate models to fully understand melanoma progression and to develop new effective therapies. Animal models are widely used but do not reflect the human microenvironment, while two-dimensional cell cultures lack crucial elements of this tumor microenvironment. Therefore, a three-dimensional epidermal tumor model of malignant melanoma consisting of primary human keratinocytes and various melanoma cell lines was developed in this work. The melanoma cell lines vary in their driver mutations, enabling the model to investigate compounds specifically designed to target one mutation. Tissue engineering techniques were used to generate a three-dimensional skin model that shows all characteristic layers of the epidermis and forms melanoma clusters in the *stratum basale*. Depending on size and extension, these extend into suprabasal epidermal layers. Tumor histopathology, tumor metabolism, and tumor-associated protein secretions could be demonstrated in the *in vitro* model. In addition, a protocol could be developed to reisolate single cells from the models. This made it possible to characterize the proliferation state within the respective model and to specifically evaluate the effect of antitumor therapies. Applicability as a test system in the field of tumor therapeutics was demonstrated with the v-raf mouse sarcoma virus oncogene homolog B (BRAF) inhibitor commonly used in the clinic. This selective BRAF inhibitor successfully reduced tumor growth in models with BRAF-mutated melanoma cells, indicated by a reduction in metabolic activity, proliferating cells, and glucose consumption. For the implementation of the model in preclinical development, B-B-dimethylacrylshikonin, a promising drug candidate, which induces cell cycle arrest followed by apoptosis, was tested in the model.

An application of the models in the field of testing topical treatments requires a barrier function of the models close to the *in vivo* situation. The barrier properties of the skin equivalents were demonstrably not influenced by the melanoma cells, but are still insufficient compared to the *in vivo* situation. A significant increase in the skin barrier could be achieved by providing lipids and stimulating the skin's own regeneration processes. A measurement method for the non-invasive determination of the skin barrier was established by detection of transepidermal water loss and validated by

comparison with impedance spectroscopy. For the first time, the correlation of the skin models to the *in vivo* situation was demonstrated by such a method. The developed epidermal model could be further adapted to the complex structure and physiology of the skin by integrating a dermal portion and an endothelial cell layer to allow studies related to metastasis and invasion. The artificial dermis is based on a collagen hydrogel with primary fibroblasts. A decellularized porcine intestinal matrix could be used to extend the model with an endothelial cell layer. Here, the primary fibroblasts migrated apically into the natural porcine intestinal matrix, while the endothelial cells formed a closed layer basolaterally.

The tissue models developed in this work are able to improve the predictive power of the *in vitro* models and the *in vitro* - *in vivo* correlation. By combining the melanoma model with matched analytics, a novel tool for preclinical research for testing of pharmaceutical agents was established.

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung	I
Zusammenfassung	II
Abstract	IV
Inhaltsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	IX
1. Einleitung.....	1
1.1. Malignes Melanom – Ursprung und Epidemiologie	1
1.1.1. Stoffwechselforgänge von Tumorzellen	5
1.1.2. Beitrag der Tumormikroumgebung an der Karzinogenese	6
1.1.3. Klassifikation und Diagnosemethoden des malignen Melanoms	7
1.1.4. Therapieformen des malignen Melanoms	9
1.1.5. Therapieentwicklung im Bereich der Onkologie	11
1.2. <i>In vitro</i> Testsysteme	13
1.2.1. Dreidimensionale <i>in vitro</i> Testsysteme zur Tumorforschung	14
1.2.2. Limitationen des Tissue Engineerings	20
1.3. Zielsetzung.....	21
2. Material.....	23
2.1. Biologisches Material	23
2.1.1. Humanes Biopsatmaterial.....	23
2.1.2. Melanomzelllinien	23
2.1.3. Dezellularisierte porcine Matrix.....	23
2.2. Antikörper.....	24
2.3. Zusammensetzung der verwendeten Lösungen	24
2.3.1. Enzymlösungen.....	24
2.3.2. Lösungen und Medien für die Zellkultur	25
2.3.3. Lösungen für histologische Untersuchungen	26
2.4. Verwendete Kits	26
2.5. Chemikalienliste	26
2.6. Materialien.....	28
2.6.1. Labormaterialien	28
2.6.2. Verbrauchsmaterialien	29

2.7. Laborgeräte.....	30
2.8. Software.....	31
3. Methoden.....	32
3.1. Isolierung und Kultivierung von primären humanen Hautzellen.....	32
3.2. Kultivierung von humanen Melanomzelllinien.....	33
3.3. Passagieren von Zellkulturen.....	34
3.4. Zellzahlbestimmung durch Trypanblaufärbung.....	34
3.5. Kryokonservierung der Zellkulturen.....	35
3.6. Kultur von Zellen auf Chamber Slides.....	35
3.7. Aufbau von dreidimensionalen Hautäquivalenten.....	36
3.8. Reisolierung von Zellen aus epidermalen Gewebeäquivalenten.....	38
3.9. Viabilitäts- und Proliferationsassays.....	38
3.9.1. Bestimmung der Stoffwechselaktivität mittels MTT-Assay.....	38
3.9.2. Messung des Glukose- und Laktatmetabolismus.....	39
3.10. Durchflusszytometrische Zellzyklus-Analyse.....	39
3.11. Herstellung von Zytospots.....	39
3.12. Die Impedanzspektroskopie und Bestimmung des TEER-Werts.....	40
3.13. Messung des transepidermalen Wasserverlusts.....	40
3.14. Multiplex-Assay.....	41
3.15. Methoden zur histologischen Bewertung von Gewebeäquivalenten.....	41
3.15.1. Fixierung von Gewebeäquivalenten.....	41
3.15.2. Histochemische Färbungen.....	41
3.15.3. Immunfärbung.....	43
3.16. Behandlung von Melanomzellen und epidermalen Melanommodellen.....	44
3.17. Detektion der Glukoseaufnahme über 2-NBDG.....	44
3.18. Bestimmung der dermalen Absorption von Testsubstanzen <i>in vitro</i>	45
3.19. Statistik und Auswertung.....	45
4. Ergebnisse.....	46
4.1. Entwicklung eines epidermalen Melanom-Gewebeäquivalents.....	46
4.1.1. Nachweis histopathologischer Melanom-Marker in zweidimensionalen Zellkulturen.....	47
4.1.2. Aufbau und Charakterisierung von epidermalen Melanommodellen.....	49
4.2. Entwicklung und Etablierung spezieller Analytik für die Untersuchung von Gewebeäquivalenten.....	60

4.2.1. Reisolierung von Zellen aus Gewebeäquivalenten	60
4.2.2. Monitoring des Glukosemetabolismus	67
4.2.3. Etablierung eines nicht-invasiven Messverfahrens zur Testung der Hautbarrierefunktion	70
4.3. Testung von Tumorthapeutika an Gewebeäquivalenten	75
4.3.1. Validierung des Testsystems durch ein etabliertes Tumorthapeutikum	75
4.3.2. Qualifizierung der <i>in vitro</i> Melanommodelle für die präklinische Therapie-Entwicklung	87
4.4. Steigerung der Prädiktivität der Gewebeäquivalente	93
4.4.1. Steigerung der Hautbarriere	93
4.4.2. Integration eines dermalen Anteils sowie eines Endothels	98
5. Diskussion	102
5.1. Entwicklung eines <i>in vitro</i> Modells des malignen Melanoms	104
5.2. Weitere Annäherungen des Melanommodells an die <i>in vivo</i> Situation	120
6. Fazit und Ausblick	127
7. Abbildungsverzeichnis	131
8. Tabellenverzeichnis	133
9. Literaturverzeichnis	134
10. Publikationen und Konferenzbeiträge	148
Publikationen	148
Veröffentlichungen in Sachbüchern	149
Konferenzbeiträge	149
11. Curriculum Vitae	151
12. Danksagung	152

Abkürzungsverzeichnis

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
2-NBDG	2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose
AJCC	American Joint Committee on Cancer
BRAF	v-raf murines Sarkom virales Onkogen Homolog B
BSA	Bovine Serum Albumine
CK	Zytokeratin
CT	Computertomographie
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten-assoziiertes Antigen
DAB	3,3'-Diaminobenzidine
DAPI	4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMAS	B-B-dimethylacrylshikonin
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Desoxyribonucleinsäure
E1	EpiLifemedium 1
E2	EpiLifemedium 2
E3	EpiLifemedium 3
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
ERK	<i>Extracellular signal-regulated Kinase</i>
EtOH	Ethanol
FCS	Fetales Kälberserum
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FDG	2-F-18-Fluores-Desoxyglukose
GNL	Gelneutralisationslösung
hdF	humane dermale Fibroblasten
HE	Hämatoxylin-Eosin
heK	humane epidermale Keratinozyten
HKGS	Human keratinocyte growth supplement
HMB45	<i>human melanoma, black</i>
IC50	Konzentration, bei der eine 50%ige Inhibierung erreicht wurde
IF	Immunfluoreszenzfärbung
IL	Interleukin
KGF	Keratinocyte Growth Factor
LDH	Laktatdehydrogenase
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MET	<i>mesenchymal-epitheliale Transition</i>

MIA	<i>melanoma inhibitory activity</i>
MMP	Matrix-Metalloproteasen
M-RHE	Melanom-Reconstructed Human Epidermis
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NRAS	Neuroblastoma RAS
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
PARK7	Parkinson disease protein 7
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD-1	<i>programmed death</i> Rezeptor
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PFA	Paraformaldehyd
pH	Potentia hydrogenii
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAS	<i>rat sarcoma</i>
RHE	Reconstructed Human Epidermis
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
SCD-1	Stearoyl-CoA-Desaturase 1
SIS-muc	small intestinal submucosa with preserved mucosa
TEER	transepithelialer elektrischer Widerstand
TEWL	transepidermaler Wasserverlust
TNM	Tumor; Lymphknoten; Metastasen
UV	Ultraviolett
VE	vollentsalzt
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VHM	Vollhautmodell

1. Einleitung

Diese Thesis behandelt und verbindet zwei Forschungsbereiche – zum einen das maligne Melanom als Tumor mit steigender Inzidenz und zum anderen das Tissue Engineering als Werkzeug zur Herstellung dreidimensionaler *in vitro* Testsysteme für die Tumorforschung. Der erste Teil der Einleitung gibt einen Überblick über das Melanom und seine aktuellen therapeutischen Herausforderungen. Der zweite Teil befasst sich mit dreidimensionalen *in vitro* Testsystemen und ihrer Stellung in der Tumorforschung im Vergleich zu herkömmlichen zweidimensionalen Kulturen und Tiermodellen.

1.1. Malignes Melanom – Ursprung und Epidemiologie

Das maligne Melanom entsteht durch Transformation pigmentbildender Zellen, den Melanozyten, welche die Haut vor Ultraviolett (UV)-induzierten Schäden schützen. Melanozyten bilden nach Keratinozyten die zweitgrößte Zellpopulation innerhalb der Epidermis und sind in der Basalschicht der Epidermis lokalisiert und konsistent verteilt [1]. Durch eine nestartige Aggregation von Melanozyten kommt es zur Entstehung *melanozytärer Nävi*, die durch eine lokale Braunfärbung der Haut makroskopisch sichtbar sind (Abbildung 1-1). Melanozyten produzieren, verstärkt durch UV-Strahlung, das Pigment Melanin in spezialisierten Organellen, den Melanosomen, die auf benachbarte Keratinozyten übertragen werden [2]. Einmal in die Keratinozyten verlagert, reichert sich das Pigment um den Zellkern herum an und bildet eine photoprotektive Barriere gegen UV-induzierte Desoxyribonukleinsäure (DNA) Schäden [3]. Neben dem Schutz vor UV-Licht hat die Haut noch eine Reihe weiterer Aufgaben. Sie stellt eine effektive Barriere gegen äußere Einflüsse dar und schützt den Organismus vor Austrocknung, Verletzungen und Infektionen. Die Haut spielt eine wichtige Rolle bei der Temperaturregulation des Körpers und durch Rezeptoren, die gewissermaßen als Sinnesorgane fungieren, können Temperatur, Schmerz und Druck wahrgenommen werden [4, 5]. Die Haut besteht aus drei Schichten, der Epidermis, der darunterliegenden Dermis und der Subkutis, die hauptsächlich aus Fett und lockerem Bindegewebe besteht. Mit einer Dicke zwischen 0,5 mm bis 4 mm und einer Fläche von 1-2 m² stellt sie das größte Organ des menschlichen Organismus dar [6]. Der pathologische Zustand des Melanoms ist durch die maligne Transformation von Melanozyten gekennzeichnet und beinhaltet eine schrittweise Tumorprogression. In

der frühen radialen Wachstumsphase gewinnt das Melanom an Größe, dringt aber noch nicht in tiefergelegene Schichten vor. Erst beim Übergang in die vertikale Wachstumsphase infiltrieren Melanomzellen durch die Basalmembran in die Dermis. Nicht selten kommt es zur Metastasierung (Abbildung 1-1) [7, 8]. In seinem metastasierten Zustand zeigt das maligne Melanom trotz großer Fortschritte in der Therapie noch immer eine beträchtliche Mortalitätsrate. Zu >95% tritt das maligne Melanom in der Haut auf, der Rest entfällt auf andere klinische Varianten wie das Schleimhautmelanom, das Aderhautmelanom oder das meningeale Melanom.

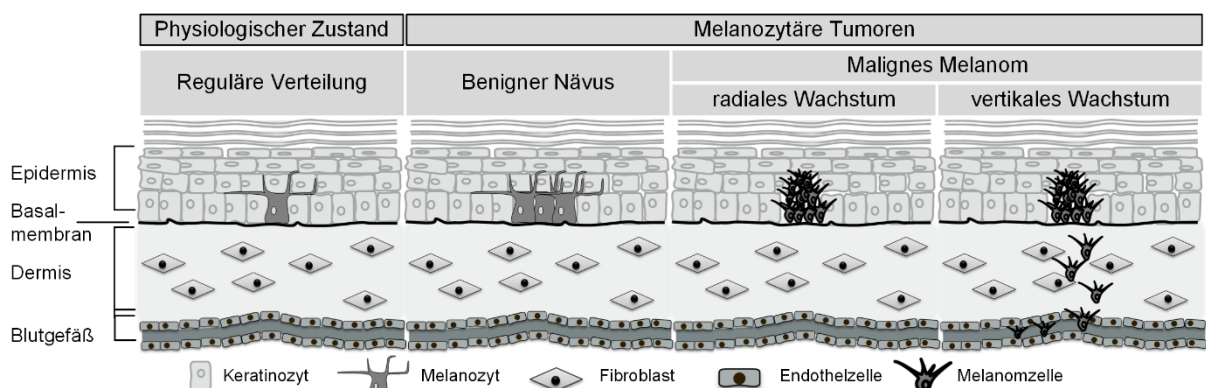


Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau der Haut im physiologischen Zustand und melanozytären Tumoren

Die Epidermis ist durch eine Basalmembran von der Dermis getrennt. Im physiologischen Zustand besteht die basale epidermale Schicht aus undifferenzierten und selbsterneuernden Keratinozyten und Melanozyten. Keratinozyten in zunehmenden Stadien der terminalen Differenzierung finden sich in den oberen epidermalen Schichten. Die Melanozyten liegen im *stratum basale* in der Regel homogen verteilt vor. Kommt es zu einer Häufung von Melanozyten wird dies als benigner Nävus bezeichnet. Die Dermis, vorwiegend aus Bindegewebe und Kollagen aufgebaut, beinhaltet als zelluläre Hauptkomponente Fibroblasten. Im Gegensatz zur Epidermis ist die Dermis vaskularisiert. Maligne Melanome im Primärstadium sind zunächst in der radialen Wachstumsphase und breiten sich dabei horizontal entlang der Hautoberfläche in der Epidermis aus. Beim Übergang von der radialen zur vertikalen Wachstumsphase durchdringen die Melanomzellen die Basalmembran und dringen in tiefere Schichten der Haut ein. Nach der Invasion von Melanomzellen in das umliegende Gewebe können diese ebenfalls in Blut- oder Lymphbahnen eindringen, sich so über den Körper verteilen und in weit entfernten Geweben zur Ausbildung von Metastasen führen.

Nur 4% aller dermatologischen Tumorarten gehen auf das maligne Melanom zurück, es ist jedoch für ca. 90% der damit verbundenen Todesfälle verantwortlich, stellt somit eine aggressive Krankheitsentität dar [7, 9]. Die hohe Letalität wird zum einen auf die hohe Resistenz gegen die derzeit üblichen Therapien und zum anderen auf die früh auftretende Metastasierung über das Lymph- und Blutsystem zurückgeführt.

Die Ursachen der Erkrankung sind multifaktoriell und beinhalten sowohl Umwelteinflüsse als auch genetische Dispositionen. Als Risikofaktoren gelten eine erhöhte Anzahl an erworbenen melanozytären oder dysplastischen Nävi, ein Melanom

in der eigenen oder familiären Krankheitsgeschichte, sowie niedrige Hauttypen nach Fitzpatrick (helle Haut, blonde oder rote Haare und blaue Augen). Als wichtiger exogener Einfluss gilt die natürliche oder künstliche UV-Exposition, insbesondere in der Kindheit und Jugend [7]. Daneben sind toxische, medikamentöse oder endokrine Einflüsse als weitere Ursachen zu nennen.

Das maligne Melanom entsteht durch Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen. Besonders oft ist bei einer malignen Transformation von Melanozyten der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Signalweg betroffen, der auch eine essentielle Signalkaskade der Melanogenese darstellt und in der Regel wesentliche Zellfunktionen wie Zellwachstum, -proliferation und -differenzierung reguliert [10, 11]. Entsteht eine Mutation in der MAPK-Signalkaskade, so kann dies zu einer unkontrollierten Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges führen. Durch eine daraus resultierende unkontrollierte Zellproliferation und Apoptoseresistenz kommt es zur Tumorentwicklung und -progression. Der MAPK Signalweg wird durch das Binden extrazellulärer Wachstumsfaktoren an Rezeptortyrosinkinasen aktiviert und setzt eine Kaskade, bestehend aus den Signalmolekülen RAS (englischsprachige Abkürzung für: *rat sarcoma*), RAF (englischsprachige Abkürzung für: *rapidly accelerated fibrosarcoma*), MEK (englischsprachige Abkürzung für: *mitogen-activated protein kinase kinase*) und ERK (englischsprachige Abkürzung für: *extracellular signal-regulated kinase*), in Gang.

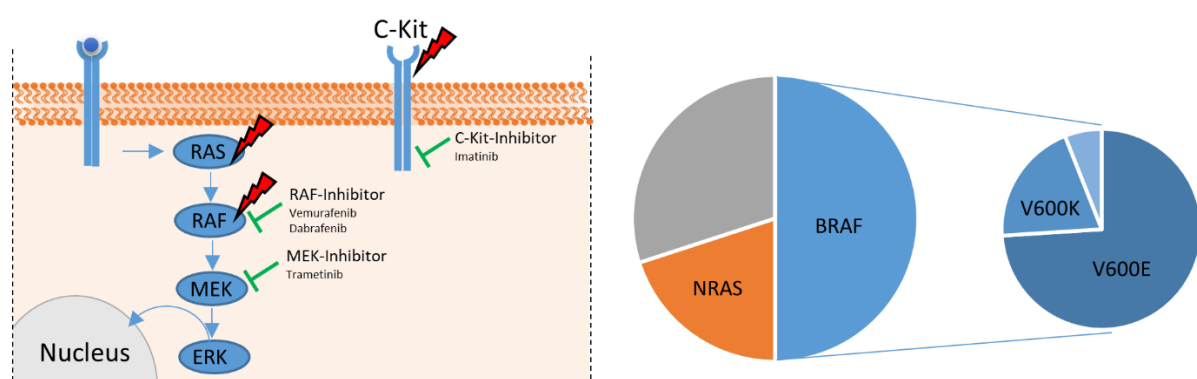


Abbildung 1-2: Häufige Mutationen und Angriffspunkte zielgerichteter Therapie des malignen Melanoms

Die gängigsten Mutationen finden sich in den Signalmolekülen RAF und RAS sowie in der Tyrosinkinase KIT. Bei 40%-60% der Patienten wird eine BRAF-Mutation und bei ca. 15% eine NRAS-Mutation diagnostiziert. Vorwiegend finden sich V600E und V600K Mutationen von BRAF. Eine zielgerichtete Therapie steht zur Inhibierung von RAF, MEK sowie C-Kit zur Verfügung.

Bei 40-60% aller Patienten mit metastasiertem Melanom findet sich eine BRAF (v-raf murines Sarkom virales Onkogen Homolog B) -Mutation, ca. 15% weisen eine Neuroblastoma RAS (NRAS)-Mutation auf [12, 13]. Etwa 70% der Fälle mit BRAF-Mutation zeigen eine spezifische Substitution von Valin durch Glutaminsäure an Codon 600 (V600E), während bei 20% der Patienten das exakt gleiche Valin durch Lysin (V600K) ersetzt ist [14]. Es entfallen nur ca. 6% auf andere Genotypen. Damit stellt die RAS / RAF-Achse einen der wichtigsten Signalpunkte im MAPK-Signalweg dar, der die maligne Transformation bei unkontrollierter Hyperaktivierung fördert [10]. Aktivierende Mutationen der Tyrosinkinase KIT kommen im Vergleich seltener vor und finden sich am häufigsten in akralen und mukosalen Melanomen. Durch Bindung eines Liganden an diesen Transmembranrezeptor kommt es zur Dimerisierung, Autophosphorylierung und schließlich zur Aktivierung mehrerer Signalwege, die die Proliferation, Invasion, Metastasierung und Hemmung der Apoptose stimulieren [15]. Das maligne Melanom weist weltweit eine deutlich steigende Inzidenz auf [16]. In Deutschland haben sich seit den 1980er-Jahren die Erkrankungsraten sowohl von Frauen wie von Männern mehr als verdreifacht, bei den Mortalitätsraten war ebenfalls ein Anstieg in den letzten vier Dekaden zu verzeichnen (Abbildung 1-3) (RKI 2015). Ein Rückgang der Steigerung oder sogar eine Revision ist derzeit nicht erkennbar, vielmehr ist eine Verdopplung der Inzidenzraten bei Männern und Frauen in den nächsten 20 bzw. 30 Jahren zu erwarten.

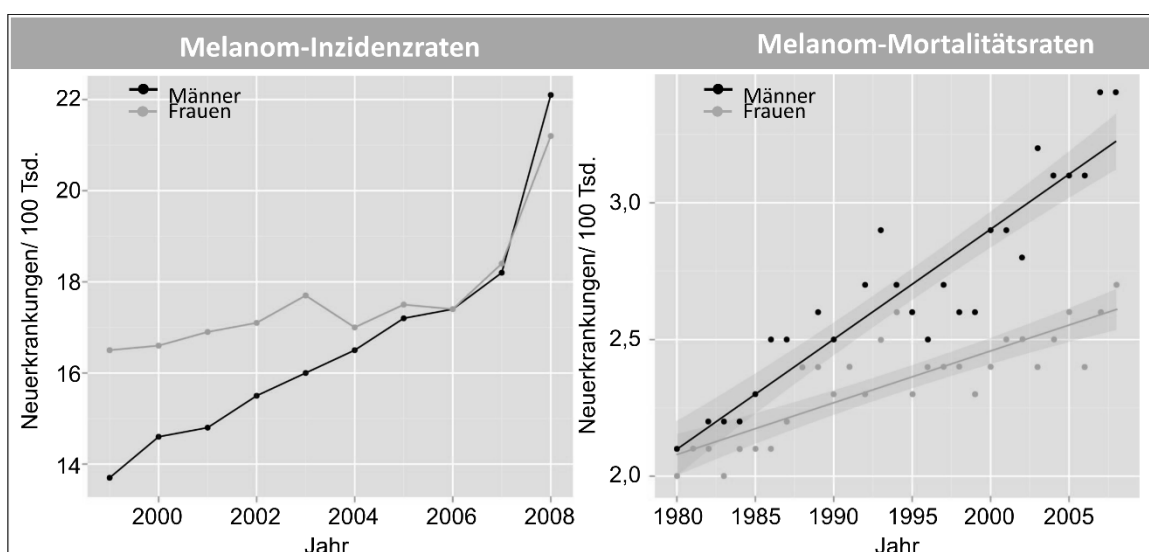


Abbildung 1-3: Inzidenz- sowie Mortalitätsraten des malignen Melanoms in Deutschland

Die Daten basieren auf nicht altersstandardisierten „rohen“ Inzidenz- und Mortalitätsraten des Robert Koch-Instituts (verändert nach [17])

Durch eine verbesserte Frühdiagnose, wie dem 2008 eingeführten gesetzlichen Hautkrebs-Screening, soll sich die Steigerung der Inzidenzrate nicht im gleichen Maß auf die Letalität auswirken [18].

1.1.1. Stoffwechselforgänge von Tumorzellen

Die Entstehung von Tumoren ist mit einer Veränderung des Zellstoffwechsels verbunden. Diese Veränderungen bestimmter Stoffwechselfparameter führen zur Ausbildung eines biochemischen Phänotyps, auch als Tumor-Metabolom bekannt [19]. Ein gemeinsames Merkmal dieses veränderten Metabolismus ist eine erhöhte Glukoseaufnahme und die Umsetzung dieser zu Laktat. Otto Heinrich Warburg beschrieb 1924 dieses Phänomen zum ersten Mal, welches seither als Warburg-Effekt bekannt ist [20, 21]. Der Glukosestoffwechsel ermöglicht die Bereitstellung von Energie in Form von Adenosintriphosphat durch die Oxidation seiner Kohlenstoffbindungen. Das Endprodukt kann Laktat oder, bei vollständiger Oxidation von Glukose über die Atmungskette in Mitochondrien, Kohlenstoffdioxid (CO_2) sein. In Tumoren nimmt die Geschwindigkeit der Glukoseaufnahme drastisch zu und Laktat wird selbst in Gegenwart von Sauerstoff und voll funktionsfähigen Mitochondrien vermehrt produziert (Abbildung 1-4).

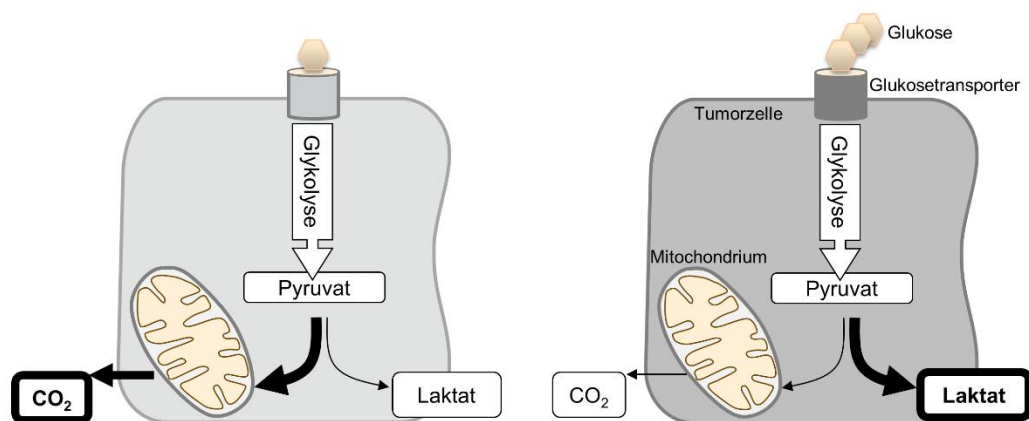


Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Unterschiede im Glukose-Stoffwechselweg von normalen Zellen zu Tumorzellen

Im Vergleich nimmt die Glukoseaufnahme in Tumorzellen stark zu und trotz funktionsfähiger Mitochondrien wird aus Pyruvat vermehrt Laktat gebildet. Diese Veränderung des Zellstoffwechsels im Tumor ist als Warburg-Effekt bekannt.

Obwohl sich unzählige Wissenschaftler mit diesem Phänomen beschäftigen und es verschiedene veröffentlichte Hypothesen dazu gibt, bleibt die vollständige Aufklärung der Funktion des Warburg-Effekts bislang aus [22]. Weitere Veränderungen von

Stoffwechselfvorgängen betreffen die Fettsäuresynthese, die Proteinkinetik, die Glutaminolyse sowie die gesteigerte Nukleinsäurebildung. Diese veränderten Stoffwechselwege sind alle auf die verstärkte Proliferation von Tumorzellen ausgerichtet und für das Überleben dieser essentiell notwendig [23].

Viele derzeit auf dem Markt befindliche Tumorthapeutika haben bereits metabolische Ziele innerhalb der Zellen, jedoch sollen neue Kenntnisse über tumorspezifische Stoffwechseleigenschaften vielversprechende Ansätze zur Früherkennung, zur Therapieprognose sowie zur Entwicklung neuer Therapiekonzepte eröffnen [24, 25]. Der veränderte metabolische Phänotyp von Tumorzellen ist sowohl durch intrinsische onkogene Signalwege als auch durch extrinsische Faktoren aus der Mikroumgebung des Tumors beeinflusst [26]. Gleichzeitig verändern die Tumorzellen die metabolische Zusammensetzung des umgebenden extrazellulären Milieus und beeinflussen so die Tumormikroumgebung. Durch die extrazelluläre Anreicherung von Laktat wird die Polarisierung von residenten Makrophagen in den M2-Zustand, der eine Rolle bei der Immunsuppression und Wundheilung spielt, stimuliert. Darüber hinaus ist die Laktatakkumulation für die Förderung der Angiogenese von Bedeutung [27].

1.1.2. Beitrag der Tumormikroumgebung an der Karzinogenese

Tumoren bestehen neben malignen Zellen auch aus einer Reihe nicht-maligner Zellen sowie extrazellulärer Matrix und bilden gemeinsam die Tumormikroumgebung. Innerhalb der Tumormikroumgebung kommt es zu interzellulärer autokriner und / oder parakriner Kommunikation, welche durch ein komplexes und dynamisches Netzwerk aus Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und Matrix-Remodeling-Enzymen gesteuert wird [28]. Die nicht-malignen Zellen sowie deren Crosstalk untereinander und die Interaktionen mit den malignen Zellen haben tumorfördernde Funktionen in allen Stadien der Karzinogenese. Beteiligt sind Zellen des Immunsystems, des Gefäßsystems wie Endothelzellen und Perizyten, Fibroblasten und Adipozyten sowie die extrazelluläre Matrix, bestehend aus Strukturproteinen oder auch Proteoglykanen [29].

Beim malignen Melanom stehen die Tumorzellen in engem Kontakt zu den Keratinozyten. Während diese eine strikte Kontrolle auf die Proliferation von Melanozyten ausüben, können Melanomzellen dieser Kontrolle durch Herunterregulieren von Zelladhäsionsmolekülen wie zum Beispiel E-Cadherin, P-Cadherin, Desmogleinen und Connexinen entgehen. Es kommt jedoch auf der

anderen Seite zu einer Hochregulierung von N-Cadherin, wodurch die Interaktion mit Fibroblasten und Endothelzellen gefördert wird [30]. Der direkte Kontakt von Melanomzellen zu differenzierten epidermalen Schichten aktiviert die vertikale Invasion über Notch-Signalwege. Dafür wird die Veränderung der Mikroumgebung verantwortlich gemacht, die während des radialen Wachstums des Melanoms auftritt. Zunächst befinden sich Melanomzellen in der nativen notch-liganden-freien Mikroumgebung. Radiales Wachstum der Melanomzellen bringt diese jedoch in Kontakt zu distal differenzierten Keratinozyten, die Notch-Liganden exprimieren. Erst diese Interaktion zwischen den Zellen initiiert die Invasion durch die Basalmembran und ermöglicht die Migration in die Dermis [31].

Die Tumormikroumgebung hat eine bedeutende Rolle bei der Karzinogenese, der Metastasierung, aber auch bei der Reaktion auf eine Behandlung. Im Allgemeinen sind Tumoren durch erhöhte Ablagerung von extrazellulärer Matrix, welche durch tumorassoziierte Fibroblasten gebildet wird, steifer als das umgebende gesunde Gewebe [29]. Bei manchen Tumorarten lässt diese Veränderung der Gewebeeigenschaften eine erste Verdachtsdiagnose zu.

1.1.3. Klassifikation und Diagnosemethoden des malignen Melanoms

Die Klassifikation von Tumoren ist entscheidend für das spätere Behandlungskonzept und die abgeleitete Prognose. Die Bewertung der Tumorschichtdicke (T) des malignen Melanoms wurde 1970 von Alexander Breslow eingeführt und ist seither als Breslow-Index bekannt [32]. Ebenso wird die Anzahl metastatisch befallener Lymphknoten (N) und die Art der Fernmetastasierung (M) in der seit 2009 als der geltenden TNM-Klassifikation des *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* berücksichtigt [33].

Neben den TNM-Aspekten werden in der histopathologischen Befundung auch die Ulzeration sowie die Mitoserate bewertet und zur Klassifikation miteinbezogen.

Zur Diagnosefindung sind zudem immunhistologische Untersuchungen der Standardmarker S100 β , HMB45 und Melan-A zur melanozytären Differenzierung eines malignen Tumors hilfreich [34]. Die Proteinfamilie S100 umfasst 17 bekannte Untereinheiten calciumbindender Proteine, die bei der Entfaltung der intrazellulären Botenfunktion von Calcium eine Rolle spielen. Für die Tumordiagnostik ist die Untereinheit S100 β bedeutsam, die Dimere bildet. Die $\beta\beta$ -Homodimere werden hauptsächlich in Schwann-Zellen, Astrozyten und Gliazellen gebildet, $\alpha\beta$ -Heterodimere dagegen in Melanozyten, Adipozyten und Chondrozyten.

HMB45 (*human melanoma, black*) bindet an das Protein gp100-cl und hat sich als Marker für aktive Melanosomen herausgestellt und zur Differenzierung von Melanozyten etabliert. Es konnte gezeigt werden, dass HMB45 nicht nur spezifisch an Tumorzellen bindet, sondern auch an fetale und neonatale Melanozyten, nicht aber an adulte ruhende Melanozyten [35]. HMB45-Färbungen sind hilfreich, um Melanome von Nävi abzugrenzen. Während in Melanomen in der Regel der gesamte Tumor eine Immunreaktivität aufweist, sind im Nävus oft nur oberflächliche Anteile der Läsion HMB45 positiv [36].

Melan-A, auch bekannt als *Melanoma-associated antigen recognized by T cells* (MART-1), ist ein Melanozyten-Differenzierungsmarker, der von autologen zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt wird. Sollten Standardmarker negativ sein, können Ausweichmarker wie der Mikrophthalmie-assoziierte Transkriptionsfaktor (MiTF) oder SOX-10 verwendet werden [34, 37].

Neben allen Früherkennungsprogrammen ist das Interesse an Laboruntersuchungen und bildgebenden Verfahren zur Untersuchung sehr groß und dient vor allem der Erkennung asymptomatischer Patienten. Als Tumormarker sind die drei Serumproteine S100 β , *melanoma inhibitory activity* (MIA) und Laktatdehydrogenase (LDH) von klinischer Relevanz [38]. Heute sind schnittbildgebende Verfahren zur Bestimmung der Ausdehnung maligner Melanome Standard. Die Kombination von Positronen-Emissions-Tomographie und Computertomographie (PET/CT) stellt derzeit das Verfahren mit der größten diagnostischen Genauigkeit dar [39]. Grundlage ist der erhöhte Glukoseverbrauch im Melanom gegenüber gesunden Zellen [40]. Durch die Aufnahme des radioaktiv markierten Glukoseanalogons 2-F-18-Fluordes-Desoxyglukose (FDG) können in der PET stoffwechselaktive Areale dargestellt werden [41]. Durch die Kombination mit der CT ist eine bessere räumliche Zuordnung der stoffwechselaktiven Bereiche möglich.

Die molekularpathologische Diagnostik weist Mutationen in Onkogenen nach. Eine Rolle spielen auch Proto-Onkogene bei der normalen zellulären Homöostase. Sie können zu tumorspezifischen Onkogenen aktiviert werden. Eine Aktivierung erfolgt durch genetische Veränderungen, wie beispielsweise Punktmutationen oder Translokationen und löst onkogene Effekte aus. Mehr als 70 Onkogene wurden bereits identifiziert und sind an Zellproliferation, Differenzierung, Seneszenz und Apoptose beteiligt [42]. Eine Inhibierung der Onkogene durch Gabe zielgerichteter Medikamente

stellt eine vielversprechende Möglichkeit zur Therapie des malignen Melanoms dar [43].

1.1.4. Therapieformen des malignen Melanoms

Obwohl frühe Stadien durch chirurgische Resektion weitgehend heilbar sind, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate von fortgeschrittenen Erkrankungen bei nur 5%-19% und spiegelt das Fehlen von adäquaten Therapien für das metastasierte Melanom wider [44]. Die Bemühungen des vergangenen Jahrzehnts, genetische Veränderungen in menschlichen Krebsarten zu charakterisieren, führte zu einem besseren Verständnis der molekularen Treiber dieser komplexen Krankheit und damit zur Entwicklung zielgerichteter Therapieansätze. Durch die Entdeckung der Treibermutationen in Schlüsselpunkten von Signalwegen konnten Inhibitoren gefunden werden, die die Aktivierung dieser Signalwege blockieren [45]. Bei Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung und inoperabler Metastasierung steht nach Feststellung einer BRAF-, NRAS- oder c-kit-Mutation eine therapeutisch spezifische Inhibierung zur Verfügung [46]. Als erstes zielgerichtetes Medikament wurde im August 2011 der BRAF-Inhibitor Vemurafenib (Zelboraf®, Synonym: PLX4032) durch die *Food and Drug Administration* (FDA) auf dem amerikanischen Markt zugelassen [47]. Im Februar 2012 folgte die Zulassung auf dem europäischen Markt durch die europäische Arzneimittelbehörde EMA. Mittlerweile ist Dabrafenib als weiterer B-RAF Inhibitor zugelassen, außerdem stehen die beiden MEK-Inhibitoren Trametinib und Cobimetinib zur Verfügung. Vemurafenib bewirkt einen initialen G1-Zellzyklus-Arrest gefolgt vom konsekutiven Zelltod [48].

Selbst wenn die Ansprechraten bei dieser zielgerichteten Therapie mit 50%-60% sehr hoch ausfallen, kommt es nach durchschnittlich 7 Monaten zu einem erneuten Tumorwachstum. Es konnten Resistenzmechanismen identifiziert werden, die zu dieser erneuten Progression führen. Durch die kombinierte Therapie von RAF- mit MEK-Inhibitoren kann die doppelte Blockierung des MAPK Signalwegs eine im Vergleich zur Monotherapie verlängerte Remissionsphase bewirken [49].

Ein zweiter Ansatzpunkt in der Entwicklung therapeutischer Behandlungen hat die Aktivierung körpereigener Immunzellen zum Ziel [50, 51]. In der Regel findet keine Tumorabwehr statt, weil sich Tumorzellen häufig die „Immun-Checkpoints“ zum Schutz vor dem Immunsystem zu Nutze machen. Im Normalfall bewirken die Immun-Checkpoints eine Herabregulierung der T-Zellaktivierung und ihrer Effektorfunktion

und dienen der Regulierung der Immunantwort, wodurch beispielsweise Autoimmunreaktionen vermieden werden. Regulatorische T-Zellen exprimieren den *programmed Death* Rezeptor (PD-1). Eine Bindung an PD-1 durch den zugehörigen Liganden auf den Tumorzellen verhindert die T-Zell induzierte Einleitung der Apoptose. Als weiteres Schüsselmolekül auf T-Zellen gilt das zytotoxische T-Lymphozyten-assoziierte Antigen (CTLA-4).

Eine spezifische immunonkologische Therapie kann dazu führen, dass die inhibitorischen Signale auf T-Zellen durch spezifische Antikörper blockiert werden. Eine Aktivierung des Immunsystems kann eintreten und es kommt zu einer Tumorabwehr. Der Antikörper Ipilimumab, der 2011 zugelassen wurde, bindet und blockiert CTLA-4, was zu einer Aktivierung und Proliferation von T-Zellen [52]. Die Immuntherapeutika Nivolumab und Pembrolizumab haben den Rezeptor PD-1 als Zielstruktur [53, 54]. Kommt es durch die Bindung der therapeutischen Antikörper zur Blockade von PD-1, so wird die Antitumor-Immunität enthemmt und eine Immunantwort gegen den Tumor kann erfolgen.

Die zielgerichtete Therapie mit BRAF/MEK-Inhibitoren oder Antikörpern gegen PD-1 und CTLA-4 gilt als überlegene Behandlungsmethode fortgeschrittener Tumorerkrankungen des malignen Melanoms. Sollte diese nicht in Betracht kommen, kann auf klassische Chemotherapeutika wie Dacarbazin, Cisplatin, Paclitaxel usw. zurückgegriffen werden. Die für die Chemotherapie eingesetzten Zytostatika greifen in den Zellzyklus ein und verhindern, z.B. durch eine DNA-Interkalation, eine Hemmung der Zellteilung. Zytostatika wirken jedoch nicht spezifisch, sondern richten sich auf alle Zellen mit erhöhter Teilungsgeschwindigkeit. Dies betrifft vorwiegend die Zellen der Schleimhäute, der Haarwurzeln und des Knochenmarks. Die drastischen Nebenwirkungen gehen mit einer Reihe von Störungen des Verdauungstraktes, Veränderungen des blutbildenden und lymphatischen Systems sowie ausgeprägtem Haarausfall einher.

Obwohl die Hoffnung war, dass durch die Entdeckung von Treibermutationen effektivere Medikamente gefunden werden, profitieren letztlich nur Patienten, die diese spezifischen genetischen Mutationen tragen. Durch sekundäre Mutationen kommt es anschließend dennoch in vielen Fällen zu Arzneimittelresistenzen, oft gefolgt von einer Tumorprogression und schließlich dem Tod des Patienten [55]. Die nach wie vor trotz neuer Erkenntnisse und spezifischer Therapieoptionen hohe Letalität impliziert, dass eine bessere Übertragbarkeit der Forschung auf den klinischen Erfolg erstrebenswert

ist. Es besteht ein dringendes wissenschaftliches sowie medizinisches Bedürfnis nach einem tiefergreifenden Verständnis der Tumorbilogie und zur Erforschung weiterer vielversprechender Therapieoptionen zur Behandlung des malignen Melanoms.

1.1.5. Therapieentwicklung im Bereich der Onkologie

Die Entwicklung von Medikamenten ist ein langwieriger, komplexer und kostspieliger Prozess, der mit einer hohen Unsicherheit in Bezug auf den tatsächlichen Erfolg des Medikaments verbunden ist. Die Therapieentwicklung untergliedert sich in mehrere Phasen. Auf die Wirkstoffsuche folgen präklinische Forschung und klinische Studienphasen. Gestalten sich diese positiv, endet die Entwicklung schließlich mit der Zulassung durch eine entsprechende Behörde. Im Schnitt dauert dieser Prozess pro Wirkstoff ca. 12-15 Jahre und ist mit durchschnittlichen Kosten von 800 Millionen US-Dollar vergesellschaftet [56, 57].

Im Rahmen der Wirkstoffsuche muss zunächst ein Ziel determiniert werden, gegen das sich ein spezifischer Wirkstoff richten kann. Idealerweise ist dieses Ziel („Target“) direkter Auslöser einer Erkrankung, im weitestgehend Sinn kann dieses Target aber auch im Zusammenhang mit dem Auslöser einer Erkrankung stehen. Es kann sich dabei um Proteine, aber auch um Sequenzen von DNA oder Ribonukleinsäure (RNA) handeln. Im Anschluss an die Suche eines Wirkstoffes muss ein Test entwickelt werden, der es ermöglicht, potentielle Wirkstoffe auf ihre therapeutischen Effekte zu überprüfen.

Bis bei der Wirkstoffsuche ein vielversprechender Leitkandidat gefunden wird, ist die Testung von tausenden von Molekülen erforderlich [58]. Eine Automatisierung dieser Screenings ist daher unerlässlich und ermöglicht die Testung von 10.000 bis 100.000 Proben pro Tag mittels Hochdurchsatzverfahrens [59, 60].

Klinische Studien in der Onkologie zeigen, im Vergleich zu anderen therapeutischen Bereichen, die höchsten Ausfallraten. Die Einschränkungen von präklinischen Werkzeugen, wie unzureichende Krebszell- und Mausmodelle, könnten hierfür verantwortlich sein [61]. Dennoch werden in Deutschland jährlich etwa 2,7 Millionen und in der EU bis zu 12 Millionen Tiere zu Forschungszwecken eingesetzt. Auf die Krebsforschung entfallen 12,8% [62]. In der Grundlagenforschung nimmt der onkologische Bereich mit knapp 6,6% einen mittleren Rang ein. Mit 34%, und somit mit Abstand am meisten Tiere, dienen der Erforschung von Krebserkrankungen des Menschen (BMEL 2015). Obwohl Mausmodelle technisch immer weiter entwickelt

werden, z.B. indem sie spezifische Gen-Defekte der menschlichen Erkrankung reflektieren, ist eine Translation der Daten aus dem Tierexperiment auf den Menschen immer noch schwierig und nur in etwa 45% der Fälle möglich [63]. Bemerkenswerte 96% aller in der Präklinik ermittelten wirksamen Substanzen scheiterten bislang in der späteren klinischen Anwendung, was auf eine unzureichende Vorhersage der Erfolgsraten deutet [64, 65]. Dies zeigt den dringenden Bedarf von Tumormodellen, die besser auf den Menschen übertragbar sind. Neue wissenschaftliche Erkenntnisse wurden bislang hauptsächlich durch zweidimensionale Zellkulturen aus Melanom-Zelllinien und genetisch modifizierten Mausmodellen erlangt. Durch die Verwendung von zweidimensionalen Zellkulturen können zwar sowohl ethische als auch wissenschaftliche Bedenken des Tiermodells berücksichtigt werden, jedoch kann eine zweidimensionale Zellkultur die komplexen Umgebungsbedingungen der *in vivo* Situation nicht abbilden. Es fehlt die dreidimensionale Ausrichtung, die den interzellulären Crosstalk zwischen verschiedenen Melanomzellsubtypen und anderen gewebespezifischen Zellen ermöglicht. Dies führt zu einem unnatürlichen Zellverhalten bei einer zweidimensionalen Kultivierung der Zellen. So konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen in konventionellen zweidimensionalen Kulturen eine deutlich erhöhte Teilungsrate aufweisen sowie Signalwege und Therapieeffekt verändert sind [66, 67]. Da die *in vivo* Teilungsrate in der Regel viel niedriger ist als in diesen Testsystemen, zeigen Substanzen, die die Zellteilung hemmen, in diesen zweidimensionalen Modellen einen stärkeren Effekt als in der Klinik. Zudem kann das Ansprechen einer Therapie durch die Mikroumgebung des Tumors wie extrazelluläre Komponenten und stromale Zellen beeinflusst werden, an der es in einer zweidimensionalen Kultur mangelt. Veränderungen in der Keratinozyten-Melanozyten-Homöostase werden als möglicher Auslöser für die Bildung von Melanomen diskutiert [68]. Es konnte belegt werden, dass Melanozyten in Abwesenheit von Keratinozyten stärker proliferieren sowie Melanomzell-Adhäsionsmoleküle (Mel-CAM / MUC18) exprimieren, die mit der Melanombildung zusammenhängen [69]. Dies zeigt, dass die Interaktionen zwischen den Zelltypen von entscheidender Wichtigkeit sein können. Zwar spiegelt das Maus-Xenograft-Modell das Tumorstroma besser wider, da Melanomzellen in das intakte Gewebe von narkotisierten Mäusen injiziert werden, doch auch Mausmodelle sind in ihrer Aussage für die Klinik limitiert, da die Unterschiede zwischen Mensch und Maus nicht nur im Hinblick auf die Abbildung von Tumor-Stroma-Interaktionen erheblich sind [63]. Die Differenzen zwischen den

Spezies sind bekannt und führten bereits zu erheblichen Problemen beim Eintritt in die klinische Phase [70]. Die Weiterentwicklung von *in vitro* Testsystemen ist daher von entscheidender Bedeutung.

1.2. *In vitro* Testsysteme

Tiermodelle stellen in vielen Bereichen der Forschung und toxikologischen Bewertung den Goldstandard dar, jedoch sind zahlreiche Probleme und heftige Kritik mit dieser Art des Testsystems verbunden. Alternative *in vitro* Methoden sollen dazu dienen, diese Limitationen zu überwinden und die hohen Ausfallraten in klinischen Studien zu reduzieren. *In vitro* Testsysteme fassen Methoden zusammen, die als Alternativen zu Tierversuchen verwendet werden können. Dafür kommen vorwiegend zellbasierte und biochemische Methoden zum Einsatz, jedoch können auch *in silico* Verfahren Tierversuche vermeiden. Anwendung finden *in vitro* Testsysteme sowohl in der Grundlagenforschung in der Medizin als auch in der Kosmetikindustrie [71, 72].

Ein limitierender Faktor bei Tierversuchen stellt der genetische und phänotypische Unterschied zwischen Mensch und Tier dar. Selbst bei Schimpansen führt die geringe Variation der DNA von nur 1%-2% in Bezug auf die menschliche DNA zu einer Abweichung der Proteinexpression von 80%. Daher lassen sich in Tierversuchen Krankheiten des Menschen oder menschliche Reaktionen auf neue Therapieverfahren nur eingeschränkt untersuchen [73, 74].

Eine Rolle bei der Kritik an Tierstudien spielen ethische Bedenken sowie ein hoher Kosten- und Zeitaufwand [75, 76]. Deshalb stellten Russell und Burch bereits 1959 das 3R-Prinzip – *Replace, Reduce, Refine* für die Verwendung von Tiermodellen vor. Eine Verbesserung (Refine) und Reduzierung (Reduce) von Tierversuchen steht im Mittelpunkt [77]. Im besten Fall sollen Tierversuche durch alternative Verfahren komplett ersetzt werden können (Replace).

Zunehmende Einschränkungen bei Tierversuchen gibt es ebenfalls von regulatorischer Seite. So trat beispielsweise 2007 eine neue EU-Chemikalienverordnung (REACH-Verordnung) in Kraft, die die Verwendung von Alternativen zu Tierversuchen in der Testung von Chemikalien vorschreibt, wenn diese vorhanden sind. REACH steht für Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals und soll ein hohes Schutzniveau für die menschliche Gesundheit und die Umwelt sicherstellen.

Eine ganze Reihe von *in vitro* Testsystemen haben sich bereits auf dem Markt etabliert und sind erfolgreich validiert. Für die Validierungen von *in vitro* Testsystemen ist auf europäischer Ebene das Europäische Zentrum zur Validierung alternativer Methoden (ECVAM) zuständig. Den „Goldstandard“ für die Testungen stellen die standardisierten und international abgestimmten Prüfmethoden der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) dar. Es gibt bereits einige *in vitro* Testsysteme, die von der OECD zugelassen sind (eine Auflistung der regulatorisch anerkannten *in vitro* Tests findet sich in der Veröffentlichung von Kanderova und Letasiova [78]).

In der Regel laufen *in vitro* Experimente in zweidimensionalen Kulturen ab. Eine Modellierung der *in vivo* Umgebung findet in Bezug auf die zelluläre Kommunikation, die Gen- und Proteinexpression sowie die Diffusion von löslichen Faktoren nicht statt [79]. Es kommen vermehrt dreidimensionale *in vitro* Testsysteme zum Einsatz, um die Physiologie des menschlichen Körpers besser widerspiegeln zu können.

1.2.1. Dreidimensionale *in vitro* Testsysteme zur Tumorforschung

Ein ideales Bindeglied zwischen herkömmlichen zweidimensionalen Zellkulturen und den komplexen Tiermodellen stellen dreidimensionale *in vitro* Testsysteme dar. Neben Sphäroiden, die eine dreidimensionale Anordnung, aber keine Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) oder Basalmembran und keine Kompartimentierung der unterschiedlichen Zelltypen aufweisen, haben sich in den letzten Jahren die Methoden des Tissue Engineerings so weiterentwickelt, dass es heute möglich ist, dreidimensionale humane Gewebemodelle herzustellen.

1.2.1.1. Tumorsphäroide

Der dreidimensionale Aufbau von globulären Zellaggregaten, den sogenannten multizellulären Tumorsphäroiden, spiegelt die *in vivo* Tumorarchitektur und Mikroumgebung deutlich besser wider als adhärente zweidimensionale Zellkulturen [80, 81]. So weicht die Homogenität der zweidimensionalen Kultur einer Heterogenität, die durch einen Sauerstoff- und Nährstoffgradient hervorgerufen wird [82]. Es bildet sich eine stark proliferierende Randschicht, gefolgt von einer hypoxischen Zone, in der sich immer mehr ruhende und apoptotische Zellen finden, ebenso wie ein zentraler nekrotischer Kern. Dieser Verlauf zeigt sich auch in der *in vivo* Situation und treibt dort die Tumorangio-genese an. Die Heterogenität zeigt sich ebenfalls in Unterschieden der

Signaltransduktion und des Expressionsverhaltens innerhalb des Sphäroids. So ließ sich z.B. nachweisen, dass ERK vorwiegend in der proliferierenden peripheren Schicht aktiviert ist [83]. Diese Tumorerogenität spielt eine wichtige Rolle bei der Untersuchung des Wachstums, der Invasion und der Suche nach spezifischen, therapeutisch wirksamen Substanzen. Neben der Wirksamkeit dieser Substanzen kann auch deren Bioverfügbarkeit untersucht werden, da sich aus dem multizellulären Aufbau eine Diffusions- bzw. Penetrationsbarriere ergibt.

Obwohl bereits eine große Ähnlichkeit von Tumorsphäroiden zur *in vivo* Situation besteht und damit realistischere Analysen ermöglicht werden, hat auch dieses Modell Limitationen. Der komplexe Aufbau von Organen kann durch dieses Modell nicht widerspiegelt werden, weil es an Interaktionen mit dem den Tumor umgebenden Normalgewebe, an Komponenten der ECM und auch an einer Basalmembran zur Untersuchung der Invasion mangelt. Zwar gibt es Sphäroide, die neben Tumorzellen weitere Zelltypen enthalten, jedoch können auch diese Modelle die Komplexität von Geweben und Organen der tatsächlichen *in vivo* Situation nicht adäquat nachahmen [84]. Das Gebiet des Tissue Engineerings hat sich die möglichst detailgetreue Nachbildung von Geweben und Organen zur Aufgabe gemacht. Es kann damit Krankheitsmodelle in einer dreidimensionalen Anordnung innerhalb von Organoiden bereitstellen, die die *in vivo* Situation von Krankheiten imitieren.

1.2.1.2. Tissue Engineering

Wenn Gewebe oder Organe durch Krankheiten oder Verletzungen so schwer geschädigt sind, dass herkömmliche pharmazeutische Behandlungen nicht mehr anwendbar sind, müssen diese ersetzt werden. Derzeit sind künstliche Organe oder Organtransplantationen die erste Wahl, bergen jedoch einige Limitationen [85]. Künstliche Organe konnten zwar in den letzten Jahrzehnten durch bemerkenswerte Fortschritte in der Biomedizintechnik verbessert werden, weisen jedoch noch immer große Einschränkungen in Biokompatibilität und Biofunktionalität auf. Der Mangel an gespendeten Organen sowie die Immunabstoßung, die auch durch Verbesserungen der immunsuppressiven Therapie nicht ausgeschlossen werden kann, führt zu Problemen bei der Organtransplantation [86].

Die Limitationen, die mit der Verwendung künstlicher Organe oder Organtransplantationen einhergehen, sollen durch das neuartige Konzept des Tissue Engineerings überwunden werden. Der von Robert Langer und Joseph P. Vacanti

geprägte Begriff des Tissue Engineerings umfasst ein interdisziplinäres Forschungsfeld, welches Prinzipien der Ingenieur- und Biowissenschaft verbindet und zur Entwicklung von artifiziellen Geweben und Organen genutzt wird [87-89]. Diese Äquivalente dienen zum einen dem Ersatz und der Rekonstruktion von geschädigten Organen der Patienten, zum anderen finden sie Anwendung als *in vitro* Testsysteme [90].

Der Kreislauf des Tissue Engineering beginnt mit der Entnahme einer Biopsie am Patienten, aus der Zellen isoliert und anschließend kultiviert werden. Die Aussaat auf speziellen Trägerstrukturen und eine spezielle Kultivierung ermöglicht die Reifung zu artifiziellen Geweben, die dem Patienten reimplantiert oder für Testzwecke genutzt werden können. Der große Vorteil besteht in der Nutzung einer autologen Zellquelle, wodurch keine Einschränkungen in der Biokompatibilität und Biofunktionalität entstehen sowie der vollständigen Vermeidung von Abstoßungsreaktionen.

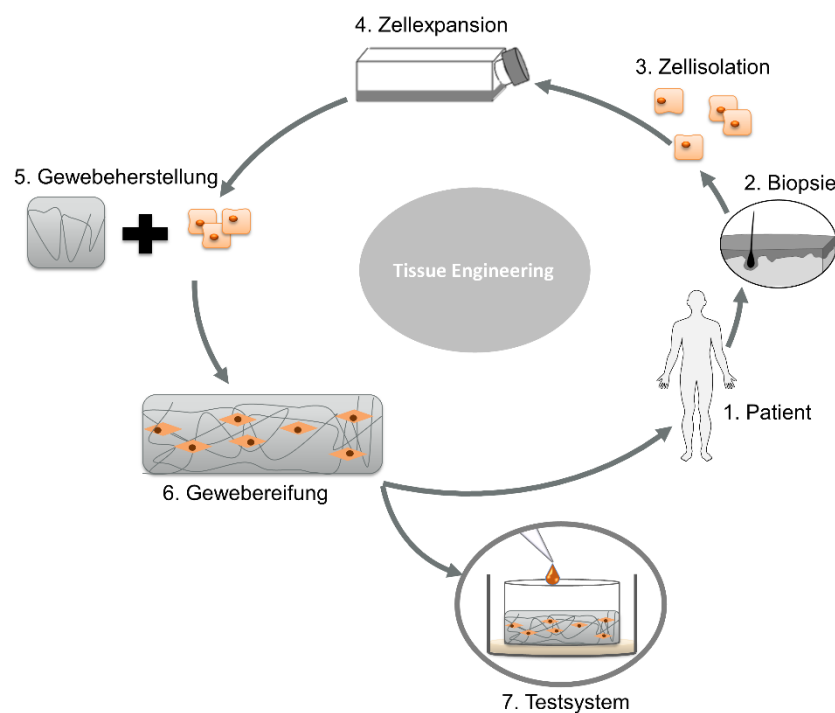


Abbildung 1-5: Kreislauf des Tissue Engineerings

Dargestellt sind die entscheidenden Schritte des Tissue-Engineering-Prozesses zur Herstellung eines Implantats oder eines Testsystems. Zu Beginn erfolgt die Entnahme einer Biopsie. Es schließt sich eine Zellisolation sowie eine Expansionsphase an bis die Zellen auf einer Trägerstruktur ausgesiedelt werden. Nach Reifung des artifizielles Gewebes kann es als Transplantat oder als *in vitro* Testsystem genutzt werden.

Die Anfänge des Tissue Engineerings wurden von Forschern in den 1970er und 1980er Jahren gemacht. Dabei konzentrierten sich die ersten Bemühungen auf die Entwicklung von Hautäquivalenten [91-93]. Neben dem relativ simplen Aufbau der Haut konnten auch im Bereich der komplexeren Organe wie Herz, Lunge und Leber im Tissue Engineering Erfolge erzielt werden [91]. Diese Organe benötigen jedoch auch speziellere Techniken bei der Kultivierung. Neben Zellen, einer geeigneten Matrix und Wachstumsfaktoren tragen äußere Bedingungen in entscheidendem Maße zum erfolgreichen Aufbau dieser Gewebeäquivalente bei. Es gibt einige grundlegende Anforderungen, die für das Gewebewachstum bereitgestellt werden müssen wie bspw. eine Temperatur von 37 °C und eine ausreichende Nährstoffversorgung. In vielen Fällen sind diese grundlegenden Bedingungen jedoch nicht ausreichend und weitere physikalische sowie chemische Faktoren, Hormone oder spezifische Metabolite sind für die Gewebereifung und die funktionelle Entwicklung obligatorisch.

In vitro Hautäquivalente

Im Bereich der Hautforschung konnten in den letzten 25 Jahren große Fortschritte erzielt werden [94, 95]. Hautäquivalente werden durch fortschreitende Optimierungen von Methoden des Tissue Engineerings immer weiter verbessert und kommen heutzutage der *in vivo* Situation sehr nahe [96]. Klinische Anwendung finden die Modelle in der Förderung der Heilung von akuten und chronischen Wunden [97]. Als komplexe organspezifische humane Testsysteme werden sie zudem in der Grundlagen- und angewandten Forschung im Bereich der Hautkorrosion und -irritation, der Hautbarriere sowie der Hautabsorption eingesetzt. Durch die Aufnahme der Hautmodelle in die OECD Richtlinien zur Testung der Irritation und Korrosion ist es möglich, die Modelle zur Prüfung von Kosmetika und Chemikalien zu verwenden [98, 99]. Gegenwärtig sind mehrere Hautmodelle von verschiedenen Herstellern kommerziell erhältlich. Dazu zählt das epiCS™ -Modell von CellSystems, das SkinEthic RHE und EpiSkin™ von L'Oréal, das EpiDerm™ -Modell von Mattek, das LabCyte EPI-Modell von J-Tech und das KeraSkin-VM™ von MCTT Inc. [100-106]. Im Bereich des Haut Tissue Engineerings werden verschiedene biologische und synthetische Materialien mit *in vitro*-kultivierten Zellen kombiniert um ein funktionelles dreidimensionales Gewebe zu erzeugen. In Abhängigkeit der Anwendung und dem biologischen Endpunkt kommen Modelle mit unterschiedlicher Komplexität zur Anwendung. Zum Einsatz kommen epidermale Modelle, die lediglich die oberste

Hautschicht, die Epidermis, nachbilden und Vollhautmodelle, die aus einer epidermalen sowie dermalen Schicht bestehen. Die Interaktionen von Keratinozyten, Fibroblasten, Melanozyten und auch der Zellen des Immunsystems obliegen einer strengen Kontrolle verschiedener Faktoren und Kaskaden. Die Störung bzw. das Ungleichgewicht dieses sensiblen Systems kann eine krankhafte Veränderung des Organs hervorrufen. Die Untersuchung dieser komplexen Prozesse an *in vitro* Hautäquivalenten kann helfen, die den verschiedenen Krankheiten zugrundeliegenden pathologischen Mechanismen besser zu verstehen und zur Entwicklung wirksamer Therapien beizutragen. Durch den Entwicklungsfortschritt von Krankheitsmodellen konnten auch im Bereich der Melanomforschung erste Erfolge erzielt werden. In verschiedenen Studien sind bereits erfolgreich Melanomzellen in Hautäquivalente eingebettet worden [107-110]. Dabei lag der Fokus bisher meist auf der Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Melanomzellen, der Zell-Zell sowie Zell-Matrix assoziierten Interaktionen und der Invasion der Melanomzellen. Erste Versuche im Bereich der Wirkung von Arzneimitteln mit spezifischer Inhibition von Onkogenen in dermalen Hautäquivalenten konnten ebenfalls durchgeführt werden [107]. In diesen Modellen fehlen jedoch die Interaktion der epidermalen Schicht und eine konkrete Zuordnung des Einflusses der Therapie auf krankhafte und gesunde Zellen. Es mangelt derzeit an einem Modell, das die *in vivo* Situation in größerem Umfang widerspiegelt und je nach Fragestellung unterschiedlich komplex aufgebaut ist. Um die entscheidenden Prozesse von Tumorangiogenese und Metastasierung in *in vitro* Modellen abbilden zu können, muss eine Vaskularisierung der Modelle gewährleistet werden. Tumore sezernieren Wachstumsfaktoren, die Endothelzellen anziehen, um Kapillaren zu bilden, die das Melanom mit Nährstoffen versorgen (Tumorangiogenese). Darüber hinaus können Melanomzellen durch die Endothelzellschicht, die die Kapillargefäße auskleiden, dringen und durch die Verteilung über das Blutgefäßsystem im ganzen Organismus Sekundärtumore verursachen. Zur Untersuchung dieser Prozesse ist die Entwicklung eines vaskularisierten Hautäquivalents entscheidend. Ein solches Modell könnte zusätzlich die Barriere, die durch die Endothelzellen gebildet wird, simulieren, und somit eine Untersuchung molekularer Signale, die in der Tumorangiogenese involviert sind, erlauben. Diese Prozesse sind von großer Bedeutung, da sie als neue Ziele für die Entwicklung therapeutisch wirksamer Substanzen für die Therapie des malignen Melanoms dienen können.

1.2.1.3. Bioreaktortechnologie

In der Bioreaktortechnologie kommen vorwiegend Bioreaktoren zum Einsatz, die verbesserte Kulturbedingungen für Zellen und Gewebe bieten [111]. Bioreaktorsysteme wurden erstmals für biotechnologische Anwendungen eingesetzt. Neben enzymatischen und mikrobakteriellen Prozessen dienen Bioreaktoren zur Verarbeitung von Pflanzen- und Säugerzellen. In diesem Bereich ist die größte kommerzielle Anwendung von Bioreaktoren die Herstellung von Substanzen wie Aminosäuren oder Enzymen mit Hilfe von Mikroorganismen oder Zellkulturen.

Im Vergleich zu herkömmlichen statischen Gewebekulturbedingungen können Bioreaktoren *in vivo* ähnliche Bedingungen nachahmen, weshalb sie für das Tissue Engineering eine deutliche Weiterentwicklung bedeuten. Die Kultivierung erfolgt mittels Perfusion des Gewebes und dient somit einer verbesserten Nährstoffversorgung sowie einer gewebespezifischen Kultur unter physikalischen Parametern wie der mechanischen Scherspannung [112].

Bioreaktorsysteme sind derzeit die einzige Technologie, mit der es möglich ist, hochkomplexe und -strukturierte Gewebe aus verschiedenen Zelltypen zu generieren. Zum Aufbau dieser komplexen Modelle wird azellularisiertes natives Gewebe verwendet. Dies bietet die Möglichkeit, die Struktur des vaskulären Systems (BioVaSc®) zu erhalten, wieder zu besiedeln und im Anschluss als Gefäßsystem des artifiziellen Gewebes zu verwenden [113]. Die Vaskularisierung von Gewebe kann helfen, Prozesse, wie die systemische Verfügbarkeit spezifischer Substanzen zu untersuchen. Darüber hinaus stellt das Gefäßsystem für die Progression mancher Erkrankungen und deren Behandlungen eine der Schlüsselkomponenten dar. Im Bereich der Tumorforschung könnte dies eine exaktere Untersuchung des kritischen Schrittes der Metastasierung ermöglichen, indem einzelne Tumorzellen im Anschluss an den Prozess der mesenchymal-epithelialen Transition (MET) in das artifizielle Blutgefäß eindringen können [114].

Aufgrund erhöhter technischer Anforderungen im Vergleich zu Standard-Zellkulturtechniken wird zusätzliche Ausrüstung wie z.B. Pumpen, Sensoren und Rückkopplungssteuerungssysteme benötigt. Dies erhöht den Platzbedarf, steigert die Fehleranfälligkeit und begrenzt die Möglichkeit der Parallelisierung. Darüber hinaus steht derzeit eine große Vielfalt von Bioreaktorsystemen unterschiedlicher Bauart zur Verfügung, wodurch die Vergleichbarkeit der Forschung schwierig ist.

1.2.2. Limitationen des Tissue Engineerings

Die größte Einschränkung des Tissue Engineerings von komplexeren Geweben und Organen ist, eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen sicherzustellen. Schon bei Geweben, die dicker als wenige Millimeter sind, reicht die Diffusion zur Versorgung zentraler Teile nicht aus und eine Vaskularisierung des artifiziellen Gewebes ist unumgänglich [115].

Bei der Nutzung dreidimensionaler *in vitro* Testsysteme spielt dieser Faktor eine untergeordnete Rolle. Im Gegensatz zur Nutzung als Implantat ist für die Anwendung als Testsystem die Herstellung miniaturisierter Organe ausreichend und damit eine Vaskularisierung oftmals überflüssig. In den frühen Stadien des Tissue Engineering herrschte die Ansicht, dass Zellen in der Lage seien, zu nativen Geweben zu reifen, sobald sie in enger Nachbarschaft zueinander stehen und untereinander kommunizieren [116]. Dieses Konzept ließ sich bis zu einem gewissen Grad zwar für simple Gewebeäquivalente beweisen, in den meisten Fällen führte das einfache Anordnen von Zellen auf einem Gerüst jedoch nicht zur Bildung komplexer Gewebe oder Organe. Die Rolle und die Merkmale des Biomaterialgerüsts rücken immer mehr in den Fokus der Wissenschaft, um mit Hilfe nano-/makro- poröser-, -topographischer-Eigenschaften die Rekonstruktion weiter zu verbessern [117].

Im Bereich des Haut Tissue Engineerings kann derzeit eine Differenzierung und Bildung aller epidermalen Schichten erreicht werden, jedoch gibt es kritische Bereiche, die sich deutlich von der *in vivo* Situation unterscheiden. Insbesondere die Barrier von Hautäquivalenten weist im Gegensatz zum nativen Zustand eine erhöhte Permeabilität auf [118]. Dies ist der Grund, dass bislang für die Testung der Hautabsorption keine Alternativmethode von regulatorischer Seite zugelassen ist. Eine veränderte Lipidzusammensetzung des *stratum corneum* sowie des enzymatischen Systems, das diese Lipide reguliert, produziert und verarbeitet, die Luftfeuchtigkeit während der Zellkultur sowie die Calcium-Homöostase werden derzeit als mögliche Ursachen diskutiert [119-123].

Viele Endpunkte, die derzeit für die Testung an alternativen Methoden etabliert sind, stellen ein invasives Verfahren dar und führen zur Destruktion der Kulturmodelle, was sie für weitere Experimente unbrauchbar macht. Auch die standardisierten Methoden der OECD-Testleitlinien für Hautkorrosion und Hautirritationen nutzen solche Verfahren [98, 99]. Diese Einschränkung führt zu experimentellen Ansätzen, die eindimensionale Ergebnisse liefern, während sie äußerst hilfreich und wichtig sind, um

mehrdimensionale Ergebnisse bei der Analyse komplexer Gewebestrukturen zu beurteilen. Daher liegt die Limitation nicht allein in den Modellen sondern auch in den Analyseverfahren begründet [124]. Die Entwicklung und Etablierung von neuen und vor allem nicht-invasiven Analyseverfahren zur Beurteilung der dreidimensionalen *in vitro* Testsysteme ist daher von großer Wichtigkeit.

1.3. Zielsetzung

Das maligne Melanom ist eine der am häufigsten diagnostizierten Krebserkrankungen. Durch eine oft auftretende Metastasierung ist es mit einer vergleichsweise hohen Letalität verbunden. Auch wenn in den letzten Jahren bereits große Fortschritte in der Behandlung des Melanoms erzielt werden konnten, bleiben auf Grund der hohen Rate von Resistenzen gegenüber zielgerichteten Medikamenten, nachhaltige Therapieerfolge in fortgeschrittenen Stadien meist aus.

Wissenschaftliche Erkenntnisse wurden bislang hauptsächlich durch zweidimensionale Zellkulturen aus Melanom-Zelllinien und genetisch modifizierten Mausmodellen erlangt. Durch die Verwendung von zweidimensionalen Zellkulturen können zwar sowohl ethische als auch wissenschaftliche Bedenken des Tiermodells berücksichtigt werden, jedoch kann eine zweidimensionale Zellkultur nicht die komplexen Umgebungsbedingungen der *in vivo* Situation abbilden. Es fehlt die dreidimensionale Ausrichtung, die den interzellulären Crosstalk zwischen verschiedenen Melanomzellsubtypen und anderen gewebespezifischen Zellen ermöglicht. Ein dreidimensionales Hautäquivalent kann die Limitationen der bisherigen Modelle überwinden. Forschungsschwerpunkt des Projektes ist daher die Entwicklung eines dreidimensionalen Hautmodells, das verschiedene Komplexitäten, je nach späterer Verwendung, abdecken kann. Neben einem einfachen epidermalen Melanommodell, das auf eine synthetische Trägerstruktur aufgebracht wird, soll auf einer natürlichen Matrix ein Vollhautmodell entwickelt werden, welches eine spätere Vaskularisierung des Modells mit Hilfe von Bioreaktortechnologie ermöglicht, um Metastasierungswege exakter nachbilden und untersuchen zu können. Da für die präklinische Testung neuer Medikamente bisher nur unzureichende Modelle zur Verfügung stehen, soll das dreidimensionale Modell auf seine Eignung als Testsystem zur Medikamentenforschung, zunächst unter Verwendung des zielgerichteten Tumorthérapeutikums Vemurafenib, evaluiert werden. Die Implementierung in die

präklinische Therapieentwicklung soll durch die Verwendung von Melanomzellen aus Patientenbiopsien und durch die Testung des neuartigen Tumortheraupeutikums B-B-dimethylacrylsilikonin erfolgen.

2. Material

2.1. Biologisches Material

2.1.1. Humanes Biopsatmaterial

Mit Genehmigung der Ethikkommission der Universität Würzburg (Votum, 182/10, 4. April 2011) wurde humanes juveniles Vorhautgewebe von klinisch gesunden Spendern im Alter zwischen 1-7 Jahren nach der Einverständniserklärung der Erziehungsberechtigten verwendet.

2.1.2. Melanomzelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Melanomzelllinien Skmel28, MM96L, D08, MM127, A11 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Nicolas Hayward des Queensland Institute for Medical Research (Brisbane (AUS)) zur Verfügung gestellt.

Die Melanomzellen MUG-Mel2 stellte Prof. Beate Rinner, Medizinischen Universität Graz (AUT), zur Verfügung.

2.1.3. Dezellularisierte porcine Matrix

Ausgangsmaterial für die dezellularisierte porcine Matrix SIS-Muc (small intestinal submucosa with preserved mucosa) ist jejunales Darmgewebe von 6-8 Wochen alten Schweinen, die aus veterinärkontrollierter Zucht eines örtlichen Schweinehalters stammen. Die Präparation und Dezellularisierung fand am Translationszentrum Regenerative Therapien (Würzburg (D)) statt. Ein detailliertes experimentelles Protokoll wurde von Mertsching et al. veröffentlicht und ist nachfolgend in Kürze beschrieben [125]. Das Darmgewebe wird mit entsprechenden arteriellen und venösen Pedikeln explantiert. Im Anschluss werden Kanülen in das gewebeversorgende Arterien- und Venenpaar eingeführt. In einem chemischen Dezellularisierungsprozess werden Darmzellen durch Lyse und nachfolgende Waschschriffe entfernt. Dazu wird das Gefäßsystem mit Natriumdesoxycholat und gepufferter Kochsalzlösung perfundiert.

2.2. Antikörper

Tabelle 2-1: Verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Spezies	Hersteller	Artikelnummer
Alexa Fluor 647, Anti-Maus	1:400	Esel	Invitrogen, Carlsbad (USA)	A-31571
Alexa Fluor 647, Anti-Kaninchen	1:400	Esel	Invitrogen, Carlsbad (USA)	A-31573
CK14	1:1000	Kaninchen	Sigma-Aldrich, München (D)	HPA023040
CK18	1:500	Maus	Abcam, Cambridge (UK)	ab668
DLL-1	1:500	Kaninchen	Abcam, Cambridge (UK)	ab10554
HMB45	1:50	Maus	Dako, Hamburg (D)	M0634292
Jagged 1	1:200	Kaninchen	Cell Signaling, Cambridge (UK)	70109T
Ki67	1:100	Kaninchen	Abcam, Cambridge (UK)	ab16667
MiTF	1:500	Maus	Abcam, Cambridge (UK)	ab80651
Melan-A	1:50	Maus	Dako, Santa Clara	M7196
S100 β	1:100	Kaninchen	Abcam, Cambridge (UK)	ab52642

2.3. Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

2.3.1. Enzymlösungen

Tabelle 2-2: Verwendete Enzymlösungen

Enzymlösung	Zusammensetzung
Dispase-Lösung	2 U/ml Dispase in PBS-
0,05% Trypsin/EDTA	10% von 0,5%Trypsin-Lösung in PBS-/EDTA-Lösung
Kollagenase-Lösung	500 U/ml in DMEM

2.3.2. Lösungen und Medien für die Zellkultur

Tabelle 2-3: Medien und Lösungen sowie deren Zusammensetzung

Lösung/Medium	Zusammensetzung
Ascorbinphosphat-Lösung	73 mg/ml Ascorbinphosphat in E1-Medium, sterilfiltriert
Calciumchlorid-Lösung	2 U/ml Calciumchlorid Dihydrat in Reinstwasser, sterilfiltriert
Chondroitinsulfat	25 mg Chondroitin-6-sulfate in 5 ml PBS+
E1-Medium	1% Penicillin/Streptomycin 1% HKGS in 500 ml EpiLife
E2-Medium	0,48% Calciumchlorid-Lösung in 500 ml E1-Medium
E3-Medium	0,1% Ascorbinphosphat-Lösung 0,1% KGF-Lösung in 500 ml E2-Medium
Endothelzell-Medium	VascuLife VEGF-Mv
Fibroblasten-Medium	1% Penicillin/Streptomycin 10% FCS in DMEM
Gelneutralisationslösung	0,03% Hapes 3 M 0,05% Chondroitinsulfat 0,03% FCS pH 8,5 in DMEM x2-
KGF-Lösung	10 µg/ml KGF in EpiLife
MTT-Lösung	1 mg/ml MTT in PBS+
RPMI-Medium	1% Penicillin/Streptomycin, 10% FCS in RPMI
Vemurafenib-Medium zur Behandlung	Vemurafenib (0,1 µM; 0,5 µM; 1 µM; 5 µM; 10 µM) in E1-Medium, RPMI-Medium oder E3- Medium

2.3.3. Lösungen für histologische Untersuchungen

Tabelle 2-4: Lösungen für die Histologie

Lösung	Zusammensetzung
Blocklösung	5% BSA in PBS
Citratpuffer 10x	42 mg/ml Citronensäure-Monohydrat 17,6 mg/ml Natriumhydrogencarbonat in VE-Wasser
H ₂ O ₂ -Blocklösung	3% H ₂ O ₂ in VE Wasser
Triton-X Permeabilisierungslösung	0,2% Triton-X 100 in PBS
Waschpuffer	10% PBS-Lösung 0,5% Tween-20 in VE-Wasser

2.4. Verwendete Kits

Tabelle 2-5: Eingesetzte Kits

Kit	Hersteller
Super Vision 2 HRP-Polymer-Kit	DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg (D)
Test-Kit: Glucose Bio	Hoffmann-La Roche, Basel (CH)
Test-Kit: Lactate Bio	Hoffmann-La Roche, Basel (CH)

2.5. Chemikalienliste

Tabelle 2-6: Chemikalienliste mit Angaben des Herstellers

Chemikalie	Hersteller
0,5% Trypsin-EDTA-Lösung	Life Technologies, Darmstadt (D)
2-Propanol	Sigma-Aldrich, München (D)
2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose	Biomol, Hamburg (D)
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)- 2,5diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Serva, Heidelberg (D)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich, München (D)
Accutase	Life Technologies, Darmstadt (D)
Aceton	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Albumin Fraktion V, proteasefrei	Carl Roth, Karlsruhe (D)

Antikörperverdünnungslösung	DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg (D)
Ascorbinphosphat	Sigma-Aldrich, München (D)
Calciumchlorid Dihydrat	Sigma-Aldrich, München (D)
Chlorwasserstoffsäure	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Descosept	Dr. Schumacher, Malsfeld
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München (D)
Eindeckmittel: Entellan Fluoromount-G™, with DAPI Mowiol 4-88	Merck, Darmstadt (D) Invitrogen, Carlsbad (USA) Sigma-Aldrich, München (D)
Eosin 1%, wässrig	Morphisto, Frankfurt am Main (D)
EpiLife	Life Technologies, Darmstadt (D)
Ethanol, absolut	Sigma-Aldrich, München (D)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, München (D)
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich, München (D)
Hämatoxylin nach Meyer	Morphisto, Frankfurt am Main (D)
Human keratinocyte growth supplement (HKGS)	Life Technologies, Darmstadt (D)
Keratinocyte growth factor (KGF)	Life Technologies, Darmstadt (D)
Kollagen type I Lösung (10 mg/ml)	TERM, Würzburg (D)
Paraffin	Carl Roth, Karlsruhe (D)
PBS-Pulver ohne Calcium und Magnesium	BioChrom, Berlin (D)
PBS- -Lösung	Sigma-Aldrich, München (D)
PBS+-Lösung	Sigma-Aldrich, München (D)
Penicillin	Sigma-Aldrich, München (D)
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, München (D)
RNase A	Sigma-Aldrich, München (D)
Roti-Histofix 4% (Formaldehyd)	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Trizma Base (Tris)	Sigma-Aldrich, München (D)
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich, München (D)
Tween-20	Sigma-Aldrich, München (D)
VascuLife VEGF-Mv	CellSystems, Troisdorf (D)
Vemurafenib (PLX4032)	Selleckchem, München (D)
Xylol	Sigma-Aldrich, München (D)

2.6. Materialien

2.6.1. Labormaterialien

Tabelle 2-7: Labormaterialien sowie dessen Hersteller mit Firmensitz

Labormaterial	Hersteller
Becher: 1 L, 250 ml	Schott, Mainz (D)
Edelstahlgussformen zum Einbetten von Gewebe: 24 x 37 x 9 mm	Labonord, Mönchengladbach (D)
Kälteschutzhandschuhe	VWR, Darmstadt (D)
Laborflasche: 1 L, 250 ml, 100 ml, 50 ml	Schott, Mainz (D)
Löffelspatel	Hartenstein, Würzburg (D)
Magnetrührstab	Hartenstein, Würzburg (D)
Magnetrührstäbchen-Angel	Hartenstein, Würzburg (D)
Messkolben mit Stopfen: 1 L, 2 L	Schott, Mainz (D)
Objektträgerhalter: Glas, Stahl	Mercateo, München (D)
Pinzette	Assistent, Sondheim (D)
Reaktionsgefäßeständer	NeoLab, Heidelberg (D)
Schutzbrille	NeoLab, Heidelberg (D)
Skalpell	Bayha, Tuttlingen (D)
Spatel	VWR, Darmstadt (D)
Sprühflasche	Hartenstein, Würzburg (D)
Trichter	Hartenstein, Würzburg (D)
Zellkronen	TERM Würzburg (D)
Zentrifugenröhrchenständer	NeoLab, Heidelberg (D)

2.6.2. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2-8: Verbrauchsmaterial sowie deren Hersteller mit Firmensitz

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Combitips Plus: 0,5 ml, 1 ml, 2,5 ml, 5 ml, 25 ml	Eppendorf, Hamburg (D)
Deckgläschen: 24 x 60 mm	Menzel-Gläser, Braunschweig (D)
Einbettkassetten	Klinipath, Duiven (NED)
Einweg-Pipetten: 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)
Entsorgungsbeutel	Hartenstein, Würzburg (D)
Fettstift	Dako, Hamburg (D)
Filterpapier	Labonord, Mönchengladbach (D)
Handschuhe: Latex Nitrile	Cardinal Health, Kleve (D) Kimberly-Clark, Koblenz (D)
Kryoröhrchen: 1,8 ml	Nunc, Wiesbaden (D)
Mikrotomklingen: Type A35	pfm Medical, Köln (D)
Multiwell-Platten: 6 well, 12 well, 24 well, 96 well	TPP, Trasadingen (D)
Objektträger: unbeschichtet (26 x 76 x1 mm) PolysineTM (25 x 75 x1 mm)	Menzel, Braunschweig (D) Langenbrinck, Emmendingen (D)
Parafilm®	Carl Roth, Karlsruhe (D)
Pasteurpipetten	Brand, Wertheim (D)
Pipettenspitzen: 0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl	Eppendorf, Hamburg (D)
Reaktionsgefäße: 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht (D)
Skalpellklingen, rund	Bayha, Tuttlingen (D)
Spritzen: 5 ml, 10 ml, 20 ml	BD Biosciences, Heidelberg (D)
Sterilfilter für Spritzen: Durchmesser 50 mm, Porengröße 0,2 µm	Sartorius Stedium Biotech, Göttingen (D)
Wägeschale	Hartenstein, Würzburg (D)
Zellkulturflaschen: 25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ²	TPP, Trasadingen (D)
Zellkulturschalen: 145 x 20 mm	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)
Zentrifugenröhrchen: 15 ml, 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen (D)

2.7. Laborgeräte

Tabelle 2-9: Aufführung der verwendeten Geräte mit deren Hersteller und Firmensitz

Laborgerät	Hersteller
Absaugvorrichtung: VacuBoy	Integra Biosciences, Fernwald (D)
Abzug	Prutscher Laboratory Systems, Neudörfl (AUT)
Analysenwaage	Kern, Balingen-Frommern (D)
Autoclav: Tecnoclav Varioklav	Biomedis, Giessen (D) Systec, Wettenberg (D)
Block-Station	Leica, Wetzlar (D)
Brutschrank 37 °C, 5% CO ₂	Heraeus, Hanau (D)
Cedex Bio Analyzer	Hoffmann-La Roche, Basel (CH)
Dampfgarer MultiGourmet	Braun, Kronberg/Taunus (D)
Digitalkamera	Canon, Krefeld (D)
Durchflusszytometer Calibur	BD, Heidelberg (D)
Einbettautomat Microm STP120	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (D)
Eismaschine: „AF-80“	Scotsman, Mailand (ITA)
Flüssigstickstofftank MVE 815 P-190	German-cryo, Jüchen (D)
Gefrierbehälter Mr. Frosty	VWR, Darmstadt (D)
Gefrierschränke -80 °C -20 °C	Thermo Scientific, Waltham (USA) Liebherr, Biberach a.d. Riss (D)
Hand-Stückzähler	NeoLab, Heidelberg (D)
Heißluft-Sterilisator	Memmert, Schwabach (D)
Impedanzmessgerät: LCR HiTESTER 3522-50	(HIOKI E.E. Corporation, Nagano JPN)
Kassettendrucker VCP5001	Vogel Medizintechnik, Gießen (D)
Kühlschränke Kühlraum, 4 °C	Liebherr, Biberach a.d. Riss (D) Genheimer, Höchberg (D)
Magnetrührer mit integrierter Heizung: Type 720-HPS	VWR, Darmstadt (D)
Microplate Reader: Tecan Sunrise	Tecan, Crailsheim (D)
Mikroskope: Bioevo BZ-9000 Evos AMG	Keyence, Neu-Isenburg (D) Life technologies, Darmstadt (D)
Multi-Channel-Pipette Plus	Eppendorf, Hamburg (D)

Neubauer Zählkammer	Hartenstein, Würzburg (D)
Gewebebad: Type 1052	Medax, Kiel (D)
Objektträgerdrucker VSP 5001	Vogel Medizintechnik, Gießen (D)
pH-Meter	Mettler Toledo, Giessen (D)
Pipetten: 0.5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 100 – 1000 µL	Eppendorf, Hamburg (D)
Pipettierhilfe: Pipet Boy	Brand, Wertheim (D)
Reinstwasseranlage	Millipore, Schwalbach (D)
Schaukelplattformschüttler	NeoLab, Heidelberg (D)
Schlittenmikrotom SM 2010 R	Leica, Wetzlar (D)
Sicherheitswerkbank 2020	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (D)
Spülmaschine	Miele, Gütersloh (D)
Timer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Trockenschrank	Memmert, Schwabach (D)
Vortexer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe (D)
Wasserbad	Memmert, Schwabach
Zentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg (D)

2.8. Software

Tabelle 2-10: Liste spezieller Software

Software	Entwickler
Endnote X7	Thomson Reuters, Philadelphia, PA (USA)
Flowing Software	http://flowingsoftware.btk.fi/
GraphPad PRISM	GraphPad Software, La Jolla (USA)
ImageJ	NIH (USA)
LabVIEW	(National Instruments, Austin TX USA)
Tecan-i-control™ 1.7	Tecan, Crailsheim (D)

3. Methoden

Alle Zellkulturverfahren erfolgten in einer sterilen Umgebung unter Verwendung von Sicherheitswerkbänken der Klasse II. Alle verwendeten Einwegmaterialien waren steril, andere Materialien oder Lösungen wurden durch Autoklavieren oder Sterilfiltration sterilisiert. Die Zellen und Gewebeäquivalente wurden in einem Inkubator bei 37 °C, 95% relativer Luftfeuchte sowie 5% CO₂ kultiviert. Eine regelmäßige Kontrolle der Morphologie, der Proliferation sowie von Kontaminationen fand statt.

3.1. Isolierung und Kultivierung von primären humanen Hautzellen

Die Zellisolierung von primären Keratinozyten, primären Fibroblasten und primären Endothelzellen erfolgt aus humanen Hautbiopsaten. Die Gewinnung dieser Primärkulturen ist mittels enzymatischer Dissoziation durchzuführen.

Die Biopsie ist in eine Petrischale zu überführen und anschließend drei Mal mit jeweils 10 ml PBS+ zu waschen. Zunächst müssen Fett- und Bindegewebe mit Hilfe eines Skalpells entfernt werden. Das Gewebe wird anschließend in 1-2 mm dünne Streifen geschnitten und erneut einmalig mit PBS+ gespült. Nun sind die Streifen mit 10 ml Dispase-Lösung zu bedecken. Im Anschluss erfolgt eine Inkubation von 24 Stunden bei 4 °C. Durch den Enzymverdau findet eine Ablösung der Epidermis von der Dermis statt. Nach der Inkubation wird die Dispase-Lösung abgesaugt und das Gewebe zweifach mit jeweils 10 ml PBS+ gespült. Es folgt eine Trennung der Hautschichten mittels einer Pinzette.

Isolierung humaner epidermaler Keratinozyten

Für die Isolierung der Keratinozyten folgt nun die Überführung der Epidermisstücke in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen. Es werden 10 ml warmes Trypsin/EDTA zugegeben und für 5 Minuten bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Zum Hemmen des Enzymverdau folgt die Zugabe von 1 ml FCS. Anschließend werden durch 5-minütiges Resuspendieren die Keratinozyten aus dem Gewebeverband gelöst. Die Gewebereste werden von der erhaltenen Zellsuspension durch ein Zellsieb mit 100 µm Porendurchmesser getrennt. Nach zweimaligem Nachspülen mit je 5 ml PBS+ schließt sich ein Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 300 g an. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 5 ml Medium resuspendiert und nach der Zellzählung mit einer

Konzentration von 10.000-20.000 Zellen/cm² ausgesät. Der erste Medienwechsel erfolgt nach 24-48 Stunden.

Isolierung humaner dermaler mikrovaskulärer Endothelzellen

Der dermale Anteil ist mit PBS- zu waschen und mit 10 ml Trypsinlösung für 40 Minuten bei 37 °C zu inkubieren. Nach der Überführung in 20 ml VascuLife-Medium sind die Endothelzellen durch Ausstreichen der dermalen Streifen mit einer Skalpellklinge herauszulösen. Die entstandene Zellsuspension wird über ein Zellsieb gegeben und für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Das Zellpellet wird in VascuLife-Medium resuspendiert und die Zellsuspension ausgesät. Nach 3 Stunden erfolgt der erste Medienwechsel, um eine reine Endothelzellkultur zu erhalten. Dafür werden eventuell mitisolierte Fibroblasten mittels 10-minütiger PBS-/EDTA Inkubation herausgelöst. Danach ist frisches Medium hinzuzugeben und die Zellen bei 37 °C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ bis zum Erreichen einer ca. 70%igen Konfluenz zu kultivieren. Ein Medienwechsel findet alle 2-3 Tage mit frischem Zellkulturmedium statt.

Isolierung humaner dermaler Fibroblasten

Für die Isolierung der humanen Fibroblasten sind die Dermisstücke in eine frische Petrischale zu überführen und mit einem Skalpell in kleine Stücke zu hacken. In einem 50 ml Zentrifugenröhrchen wird 5 ml warme Kollagenaselösung vorgelegt, die Dermisstücke mit Hilfe des Skalpells in das Röhrchen überführt und mit weiteren 5 ml Kollagenaselösung bedeckt. Im Anschluss erfolgt eine Inkubation für 45 Minuten im Brutschrank. Es folgt ein Zentrifugationsschritt für 5 Minuten bei 300 g. Der Überstand ist zu verwerfen und das Pellet mit 10 ml DMEM-Medium zu resuspendieren. Im Anschluss an eine erneute Zentrifugation bei 300 g für 5 Minuten ist das Pellet mit 2-4 ml DMEM-Medium je Pelletgröße zu resuspendieren und in eine Zellkulturflasche zu überführen. Nach einer Inkubation über Nacht im Brutschrank folgt eine Zugabe von 6 ml Medium.

3.2. Kultivierung von humanen Melanomzelllinien

Alle verwendeten Melanomzelllinien werden mit RPMI-1640 mit 10% (v/v) FCS kultiviert. Ein Medienwechsel findet alle 2 bis 3 Tage statt und das Passagieren der

Zellen erfolgt bei einer Konfluenz der Zellen von ca. 80%-90% wie in Abschnitt 3.3 beschrieben.

3.3. Passagieren von Zellkulturen

Je nach Zelltyp tritt ab einer bestimmten Zelldichte, der sogenannten Konfluenz, eine Kontaktinhibition auf. Dies ist abhängig von der Aussaatdichte und der vorhandenen Fläche des Zellkulturgefäßes. Bei Monolayer-Kulturen sollte daher bei einer für den Zelltyp festgelegten Zelldichte eine Subkultivierung erfolgen. Hierfür werden die Zellen passagiert.

Passagieren mit Trypsin (Melanomzellen, Fibroblasten, Endothelzellen)

Bei der Subkultivierung erfolgt nach dem Absaugen des Mediums und dem Spülen mit PBS- Lösung eine 3-minütige Inkubation mit Trypsin/EDTA (T25 2 ml, T75 4 ml, T175 8 ml) im Brutschrank. Nach vollständiger Ablösung der Zellen ist die Enzymreaktion durch Zugabe von 10% FCS zu stoppen. Nach der Zentrifugation für 5 Minuten bei 300 g wird das Zellpellet in einem entsprechend definierten Volumen Medium resuspendiert. Anschließend erfolgt eine Zellzählung, um eine definierte Aussaat der Zellen vornehmen zu können.

Passagieren mit Accutase (Keratinozyten)

Anstelle der Trypsininkubation findet eine 20-minütige Inkubation mit Accutase statt. Alle restlichen Schritte erfolgen analog zur Passage mittels Trypsin.

3.4. Zellzahlbestimmung durch Trypanblaufärbung

Die Ermittlung der Zellzahl ist durchzuführen, um eine definierte Aussaat zu ermöglichen sowie die Vitalität und die Ausbeute zu bestimmen.

Die Neubauer Zählkammer dient der manuellen Zellzählung. Trypanblau ist ein Azofarbstoff, der eine Unterscheidung von lebenden und toten Zellen ermöglicht. Bei toten Zellen verliert die Zellmembran ihre Integrität, Trypanblau kann in das Zellinnere eindringen und an Proteine binden. Da Trypanblau zytotoxisch für die Zellen ist, muss die Beobachtung unmittelbar nach Farbstoffzugabe erfolgen.

Die Zellsuspension wird in einem bestimmten Verhältnis mit Trypanblau gemischt. Im Anschluss erfolgt mit Hilfe der Neubauer Zählkammer die Bestimmung vitaler Zellen pro Milliliter sowie der Vitalität der Zellsuspension.

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \text{Mittelwert lebender Zellen} \times \text{Volumen der Zählkammer} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

$$\text{Vitalität [\%]} = \frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

3.5. Kryokonservierung der Zellkulturen

Einfrieren von Zellen

Für die Kryokonservierung der Zellen werden diese, wie in Abschnitt 3.3 beschrieben, abgelöst, gezählt und in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml im Einfriermedium resuspendiert und auf Kryoröhrchen verteilt. Das Einfriermedium besteht zu 90% aus zellspezifischem Kulturmedium und zu 10% aus Dimethylsulfoxid (DMSO). Nach einer Lagerung für 24 Stunden bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ in einer Einfrierhilfe findet eine Langzeitlagerung in einem Flüssigstickstofftank statt.

Auftauen von Zellen

Nach der Entnahme aus dem Stickstofftank sind die Zellen mit vorgewärmtem Zellkulturmedium zu verdünnen, um die DMSO-Konzentration des Kryokonservierungsmediums herabzusetzen. Danach folgt das Abzentrifugieren der Zellsuspension bei 300 g für 5 Minuten und das Aufnehmen des Pellets in frischem zellspezifischem Medium. Die so entstandene Zellsuspension wird in Zellkulturflaschen überführt und bis zur gewünschten Konfluenz in einer wasserdampfgesättigten Umgebung mit 5% CO_2 und einer Temperatur von $37 \text{ }^\circ\text{C}$ kultiviert.

3.6. Kultur von Zellen auf Chamber Slides

Für Chamber Slides mit 8 Vertiefungen werden 2×10^4 Zellen in 400 μl des entsprechenden Mediums pro Kammer ausgesät. Sobald die Zellen eine Konfluenz von 50% bis 70% erreichen, werden sie 10 Minuten lang mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert und anschließend zur immunhistochemischen Färbung verwendet.

3.7. Aufbau von dreidimensionalen Hautäquivalenten

Die Herstellung unterschiedlich komplexer Hautäquivalente ermöglicht es, auf verschiedene Fragestellungen einzugehen. Neben einem einfachen Epidermismodell kann auch das dermale Kompartiment mit Hilfe eines Kollagenhydrogels nachgebildet werden, um das zweischichtige Vollhautmodell herzustellen. Bei diesen Modellen findet der Einsatz von künstlichen Trägermembranen statt. Bei der Verwendung dezellularisierter porciner Dünndarmsegmente als dermaler Trägerstruktur können basolateral zusätzlich noch Endothelzellen aufgebracht werden.

Herstellung von Epidermismodellen

Die Keratinozyten sind, wie in Kapitel 3.3 beschrieben, von der Zellkulturoberfläche abzulösen und im Anschluss in der dritten Passage mit einer Zelldichte von 5×10^5 Keratinozyten/cm² in 500 µl auf einer Polycarbonatmembran (Porengröße 0,4 µm) auszusäen. Nach 2 Stunden sind die Modelle mit 1 ml E2-Medium submers zu setzen. Eine ausreichende Nährstoffversorgung der Modelle wird durch die Umsetzung in Deep Well-Platten nach 24 Stunden gewährleistet. Pro Well sind 4,2 ml E3-Medium hinzuzufügen und das Medium innerhalb des Inserts abzusaugen. Es findet eine Kultivierung an der Luft-Flüssigkeits-Grenzflächenkultur für 19 Tage bei 37 °C und 5% CO₂ in einem befeuchteten Inkubator statt, in der das Medium dreimal pro Woche durch frisches ersetzt wird.

Herstellung kollagenbasierter Vollhautmodelle

Zur Herstellung kollagenbasierter Vollhautmodelle werden Inserts im 24-Well-Format mit einer Polycarbonatmembran (Porengröße 8 µm) verwendet. Pro dermale Äquivalent werden 5×10^4 Fibroblasten in 500 µl Hydrogel benötigt. Das Hydrogel besteht aus einem Anteil Gelneutralisationslösung und zwei Anteilen Kollagensuspension. Nach Zugabe der entsprechenden Menge Fibroblasten in die gekühlte Gelneutralisierungslösung wird diese unter Vermeidung von Blasenbildung mit der zuvor auf Eis gelagerten Kollagensuspension resuspendiert. Nach dem Gießen der Suspension in die Inserts ermöglicht die Inkubation für 20 Minuten in einem Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ die Gelation der Suspension. Im Anschluss sind die dermalen Äquivalente mit 2 ml DMEM-Medium submers zu setzen und für 24 Stunden in einem Inkubator bei 37 °C und 5% CO₂ zu inkubieren.

Die Herstellung der epidermalen Komponente des Vollhautmodells erfolgt Analog der Generierung von Epidermismodellen.

Herstellung von Vollhautmodellen auf der biologischen Trägerstruktur SIS-muc

Die etwa 10 cm langen SIS-Muc-Stücke werden längs aufgeschnitten, um eine plane Fläche zu erhalten. Nachfolgend ist die SIS-Muc in ca. 3 cm² große Stücke zu teilen. Diese SIS-Muc-Stücke werden in Zellkronen eingespannt, wobei zu beachten ist, dass die luminale Seite ins Innere der Inserts zeigt.

Eine Sättigung der Matrix mit notwendigen Nährstoffen ist durch das Füllen beider Kompartimente mit Zellkulturmedium und die Inkubation für 24 Stunden bei 37 ° C, 5% CO₂ und 95%iger Luftfeuchtigkeit erreichbar.

Im Anschluss wird das Medium auf und unter den Zellkronen abgesaugt und jeweils 1 x 10⁵ Fibroblasten/cm² in 500 µl auf die biologische Trägerstruktur gegeben. Durch eine dreistündige Inkubation bei 37 °C, 5% CO₂ und 95%iger Luftfeuchtigkeit adhären die Zellen auf der Matrix. Beide Kompartimente sind anschließend mit Zellkulturmedium zu befüllen, sodass ein gleich hoher Füllstand innerhalb und außerhalb der Zellkrone gewährleistet ist.

Die mit Fibroblasten besiedelte Matrix wird bei 37 °C, 5% CO₂ und 95%iger Luftfeuchtigkeit 5 Tage kultiviert, wobei alle 2 bis 3 Tage ein Medienwechsel durchzuführen ist.

Vor der Besiedlung mit Endothelzellen ist das Medium in und um die Zellkrone abzunehmen und die Zellkrone umzudrehen, sodass die Serosa nach oben zeigt. Die Aussaat von 2 x 10⁵ Endothelzellen pro Modell erfolgt in einem Volumen von 50 µl VascuLife-Medium. Eine dreistündige Inkubation bei 37 °C, 5% CO₂ und 95%iger Luftfeuchtigkeit ermöglicht die Adhäsion der Zellen auf den Gefäßstrukturen. Anschließend werden die Zellkronen wieder in ihre ursprüngliche Position gedreht und mit VascuLife-Medium gefüllt. Nach zweitägiger Kultur erfolgt die Herstellung der epidermalen Komponente des Vollhautmodells analog der Generierung von Epidermismodellen.

Herstellung von Melanommodellen

Die Herstellung erfolgt jeweils analog zur Herstellung von Epidermismodellen, kollagenbasierten- bzw. SIS-Muc-basierten Vollhautmodellen, mit dem Unterschied,

dass zu Beginn der Kultur des epidermalen Anteils Melanomzellen in einem pro Melanomzelllinie festgelegten Verhältnis gemeinsam ausgesät werden.

Tabelle 3-1: Aussaatverhältnis von Melanomzellen zu Keratinozyten der jeweiligen Zelllinie

Melanomzelllinie	MM96L	Skmel28	A11	MM127	D08	MUG-Mel2
Aussaat Verhältnis	1:100	1:50	1:50	1:10	1:10	1:25

3.8. Reisolierung von Zellen aus epidermalen Gewebeäquivalenten

Die Gewinnung von Zellsuspensionen aus Gewebeäquivalenten ermöglicht neben durchflusszytometrischen Messungen auch die Untersuchung einer größeren und homogener verteilten Zellpopulation als dies in einem histologischen Dünnschnittpräparat möglich ist. Des Weiteren kann durch die Methodik eine Auftrennung der Zellen in epidermale Keratinozyten und Melanomzellen erfolgen.

Reisolierung von Keratinozyten

Nach Absaugen des Zellkulturmediums und Waschen in PBS-, findet eine Inkubation in 2 U/ml Dispase für 5 Minuten im Brutschrank statt. Im Anschluss folgt die Ablösung des epidermalen Gewebekonstrukts von der Trägermembran mittels Pinzette. Das epidermale Gewebe wird sofort in Trypsinlösung überführt und dort für 10 Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 10% FCS findet das Herauslösen der Zellen aus dem Gewebeäquivalent durch Auf- und Abpipettieren statt.

Reisolierung von Melanomzellen

Bis auf eine enzymatische Trennung mit Accutase für 25 Minuten (anstelle von Trypsin) sind alle Schritte analog zur Isolierung von Keratinozyten.

3.9. Viabilitäts- und Proliferationsassays

3.9.1. Bestimmung der Stoffwechselaktivität mittels MTT-Assay

Die Viabilität von Zellen oder Gewebeäquivalenten kann mittels 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) bestimmt werden. Vitale Zellen reduzieren intrazellulär das MTT-Reagenz zu einem Formazan-Salz, das sich

in den Zellen in Form blauer Kristalle abgelagert. Durch die Lösung mit 2-Propanol und die photometrische Bestimmung ist eine quantitative Bestimmung möglich.

Biologische Proben sind zunächst mit PBS+ zu spülen. Anschließend erfolgt die Inkubation in MTT-Lösung für etwa 3 Stunden bei 37 °C, 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%. Nach der Inkubation wird die überschüssige MTT-Lösung abgenommen. Das Formazan-Salz ist mittels 2-Propanol in Lösung zu bringen und im Anschluss photometrisch bei 570 nm zu bestimmen.

3.9.2. Messung des Glukose- und Laktatmetabolismus

Zellkulturüberstände können im Verlauf der Kultur abgenommen und mittels Cedex Bio von Roche gemessen werden. Die Durchführung erfolgt nach Angabe des Herstellers. Eine Lagerung der Proben bis zur Durchführung der Messung kann bei -20 °C erfolgen.

3.10. Durchflusszytometrische Zellzyklus-Analyse

Das Wachstum von Zellen ist durch die Progression verschiedener Zellzyklusphasen charakterisiert. An die mitotische Teilung (M-Phase) schließt sich die Interphase an, welche sich wiederum in die G1-, S- und G2-Phase gliedert. Das jeweilige Stadium der Zelle lässt sich anhand des DNA-Gehalts über die Durchflusszytometrie bestimmen. Dazu wird mittels Propidiumjodid die nukleäre DNA angefärbt. Dieser Farbstoff interkaliert in die DNA und kann mit einem geeigneten Laser angeregt werden. Das Fluoreszenzsignal ist proportional zum DNA-Gehalt und gibt daher Auskunft über den Zellzyklusstatus einer Zellpopulation.

Nach Ablösen der Zellen (siehe 3.3) oder Isolation aus einem dreidimensionalen Gewebekonstrukt wird die Zellsuspension abzentrifugiert und mit 300 µl Puffer resuspendiert. Im Anschluss findet eine Quantifizierung mit Hilfe des FACSCalibur™ (BD) statt.

3.11. Herstellung von Zytospots

Durch das Zentrifugalprinzip können Zellen aus einer Suspension auf einen definierten Bereich eines Objektträgers aufgebracht werden.

Ein Glasobjektträger wird zusammen mit einer Filterkarte in die Probenkammer gelegt und 50 µl einer Zellsuspension von 5×10^4 Zellen/ml im zellspezifischen Medium aufgegeben. Es folgt ein Zentrifugationsschritt von 120 g für 5 Minuten, um die Zellen

auf dem Glasobjektträger zu sedimentieren. Restflüssigkeit wird über die Filterkarte der Probenkammer absorbiert. Die Objektträger werden bei Raumtemperatur getrocknet und im Anschluss bei -20 °C gelagert. Vor jeder Färbung werden die Zytospots für 10 Minuten mit 4% PFA fixiert.

3.12. Die Impedanzspektroskopie und Bestimmung des TEER-Werts

Die impedanzspektrometrische Messung findet in einer selbstentwickelten Messkammer statt, die gewährleistet, dass sich über und unter dem Gewebeäquivalent ein Messmedium befindet, um einen Kontakt mit den Elektroden sicherzustellen. Für jedes Modell wird die Impedanz über einen Frequenzbereich von 1 Hz bis 100 kHz bei 40 logarithmisch verteilten Messpunkten mittels Impedanzspektrometer LCR HiTESTER 3522-50 (HIOKI EE Corporation, Japan) gemessen. Dieser so bestimmte elektrische Widerstand R dient zur Berechnung des transepithelialen elektrischen Widerstands (TEER). Der TEER ist eine quantitative Technik zur Messung der Integrität von Tight Junctions in Zellkulturmodellen.

$$TEER = (R - R_{(leer)}) \times A$$

R = Gemessener Widerstand der Gewebeäquivalente

$R_{(leer)}$ = Widerstand des Messaufbaus

A = Zellkulturfläche in cm^2

3.13. Messung des transepidermalen Wasserverlusts

Mit der Messung des transepidermalen Wasserverlustes (TEWL) kann die Integrität der Hautbarriere über die Wasserverdunstung bestimmt werden. Dabei wird durch zwei Sondenpaare die Temperatur und die relative Feuchtigkeit direkt gemessen und daraus der TEWL berechnet.

$$Dm/dt = -D \cdot A \cdot dp/dx$$

A = Fläche [m^2]

M = transportiertes Wasser [g]

T = Zeit [h]

D = Diffusionskonstante [=0,0877 g/m(h(mmHg))]

P = Wasserdampfdruck der Atmosphäre [mm Hg]

X = Entfernung zwischen Hautoberfläche und Messpunkt [m]

Zur Messung wird zunächst ein Heizblock auf 37 °C vorgewärmt. Währenddessen findet der Nullabgleich aller Sondenpaare statt. Die Gewebeäquivalente werden aus dem Brutschrank entnommen, auf den Heizblock gestellt und der Deckel der Kulturpatte durch die Elektrodenkassette getauscht. Nach einer 10-minütigen Äquilibrierungsphase findet die Messung für 10 Minuten statt.

3.14. Multiplex-Assay

Der Multiplex-Assay wurde nach Herstellerangaben mit den Zellkulturüberständen nach 21-tägiger Kultur der Modelle an der medizinischen Universität Graz durchgeführt.

3.15. Methoden zur histologischen Bewertung von Gewebeäquivalenten

3.15.1. Fixierung von Gewebeäquivalenten

Die Fixierung der Hautmodelle dient der Stabilisierung des artifiziellen Gewebes sowie der Aufrechterhaltung der Zell- und Gewebemorphologie. Es erfolgt eine Fixierung der Hautmodelle mit einer gepufferten 4% Formaldehydlösung. Dabei handelt es sich um ein proteinvernetzendes Fixans.

Zur Fixierung der Gewebeäquivalente ist das Medium vollständig abzusaugen und die Inserts vollständig mit Fixans zu beschichten. Dieses sollte das fünffache Volumen des Gewebeäquivalents haben. Es schließt sich eine Inkubation von 2 Stunden bei Raumtemperatur an. Nach der Inkubation ist die Überführung in Einbettkassetten erforderlich. Die Kassetten sind bis zur Paraffineinbettung in Wasser zu lagern.

3.15.2. Histochemische Färbungen

Die Hämatoxylin-Eosin (HE) -Färbung ist die gängigste Färbemethode in der Histologie und liefert eine Übersichtsfärbung. Diese Färbung dient dazu unterschiedliche Gewebestrukturen im mikroskopischen Bild besser unterscheiden zu können. Hämalaun färbt alle basophilen Zellbestandteile wie den Zellkern und das endoplasmatische Retikulum blau, während die acidophilen Strukturen, insbesondere die Zytoplasmakomponenten, durch Eosin rot angefärbt werden.

Entparaffinierung

Nach dem Schneiden und Trocknen der Schnittpräparate erfolgt eine Entparaffinierung durch eine absteigende Alkoholreihe. Dies geschieht, um die Schnitte freizulegen und sie für die anschließenden Färbungen zugänglich zu machen. Dazu werden die Schnitte nach folgendem Schema behandelt:

Tabelle 3-2: Durchführung der Entparaffinierung von Schnittpräparaten

Arbeitsschritt	Zeit [min]
Verflüssigung des Paraffins im Wärmeschrank bei 60°C	30
Entfernung des Paraffins in Roticlear I	10
Vollständige Paraffinentfernung in Roticlear II	3
Ethanol 96 % (I)	2
Ethanol 96 % (I)	2
Ethanol 70 %	2
Ethanol 50 %	2
In Aqua dest. (VE) schwenken bis keine Turbulenzen mehr sichtbar sind	-

Nach erfolgreicher Entparaffinierung ist die Färbung der Objektträger nach folgendem Schema durchzuführen:

Tabelle 3-3: Durchführung der Hämatoxylin-Eosin Färbung

Arbeitsschritt	Zeit
Färbevorgang in Hämalaun-Lösung	8 min
Entfernung der überschüssigen Farbe mit schwach fließendem Aqua dest.	-
Zur Differenzierung in HCl-Alkohol geben	2x kurz eintauchen
Mit Aqua dest. spülen	1x kurz eintauchen
Zum Bläuen in warmes Leitungswasser geben	5 min
Färbevorgang mit Eosin	1 min
Mit Aqua dest. spülen	1x kurz eintauchen
Zur Differenzierung in Ethanol 70 % geben	2x kurz eintauchen

Zum Entwässern der Proben durchlaufen diese eine aufsteigende Alkoholreihe:

Tabelle 3-4: Durchführung der aufsteigenden Alkoholreihe

Lösung	Zeit [min]
Ethanol 96 %	2
Ethanol 99 %	2
2-Propanol I	5
2-Propanol II	5

Die noch feuchten Objektträger werden mit Entellan eingedeckt.

3.15.3. Immunfärbung

Die paraffinierten Schnittpräparate sind vor der Färbung, wie in Tabelle 3-2 erläutert, zu entparaffinieren. Zytospots und fixierte Zellen auf Chamber Sildes können direkt in VE Wasser überführt werden.

Die Immunfluoreszenzfärbung ist wie in Tabelle 3-5 beschrieben durchzuführen. Nach der Färbung erfolgt das Eindecken der geschnittenen Präparate oder fixierten Zellen bzw. Zytospots mit DAPI-Fluoromount-G.

Tabelle 3-5: Protokoll zur Immunfluoreszenzfärbung

	Reagenz	Inkubation
Blocken und Permeabilisierung	Blockpuffer	30 min
Primärantikörper	Verdünnt in Antikörperverdünnungslösung	Über Nacht 4°C
Waschen	Waschpuffer	3 x 5 min
Sekundärantikörper	Verdünnt in Antikörperverdünnungslösung	60 min
Waschen	Waschpuffer	3 x 5 min

Die immunohistochemische Färbung ist wie in Tabelle 3-6 beschrieben durchzuführen. Die noch feuchten Objektträger werden mit Entellan eingedeckt.

Tabelle 3-6: Protokoll zur immunohistochemischen Färbung

	Reagenz	Inkubation
Blockierung endogener Peroxidasen	3% H ₂ O ₂	10 min
Waschen	Waschpuffer	3 x 5 min
Blocken und Permeabilisierung	Blockpuffer	30 min
Primärantikörper	Verdünnt in Antikörperverdünnungslösung	Über Nacht 4°C
Waschen	Waschpuffer	3 x 5 min
Link	Polymer Enhancer	60 min
Waschen	Waschpuffer	3 x 5 min
Label	HRP Polymer	20 min
Waschen	Waschpuffer	3 x 5 min
Chromogen	DAB-Lösung	30 sec-5 min
Waschen	Waschpuffer	5 min
Zellkernfärbung	Hämalaun	6 min
Waschen	Wasser	5 min

3.16. Behandlung von Melanomzellen und epidermalen Melanommodellen

Das zellspezifische Medium wird kurz vor Beginn der Behandlung mit dem BRAF-Inhibitor Vemurafenib in der gewünschten Konzentration versetzt. Im Folgenden findet ein Medienwechsel statt. Nach einer 42-stündigen Inkubationszeit findet eine erneute Behandlung statt. Nach weiteren 24 Stunden sind die Modelle bzw. die Zellen dann für anschließende Analysen zu verwenden. Dies entspricht jeweils einer Gesamtbehandlungsdauer von 72 Stunden. Bei jedem Medienwechsel ist der Überstand abzunehmen und bei -20 °C für die Durchführung von Laktat- und Glukosemessungen zu lagern (siehe Kapitel 3.9.2).

3.17. Detektion der Glukoseaufnahme über 2-NBDG

2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose (2-NBDG) wird allgemein als fluoreszierendes Derivat der Glukose bezeichnet und dient der Überwachung und Visualisierung der Glukoseaufnahme in lebende Zellen. Die Stammlösung von 250 mM in DMSO wird in PBS auf eine Endkonzentration von 100µM verdünnt. Nach dreimaligem Waschen der Zellen oder der Gewebeäquivalente

mit PBS, erfolgt die Zugabe der 2-NBDG-Lösung und eine Inkubation im Brutschrank für einen definierten Zeitraum. Im Anschluss kann die Fluoreszenz der Zellen durchflusszytometrisch an Einzelzellsuspensionen untersucht werden oder mikroskopische Aufnahmen der Zellen bzw. Gewebekonstrukte können erfolgen.

3.18. Bestimmung der dermalen Absorption von Testsubstanzen *in vitro*

Zur Bestimmung der Barrierefunktion von Hautäquivalenten kann eine Absorptionsstudie mit Testsubstanzen im Vergleich zu nativer Haut erfolgen.

Dazu werden die epidermalen Gewebe samt Membran aus dem Transwell-Insert ausgeschnitten und in Diffusionskammern gespannt.

Als Vormedium wird 0,9% Kochsalzlösung mit Proteaseinhibitor verwendet und als Validitätskriterien zunächst der Widerstand und der TEWL der Hautmodelle in der Diffusionszelle gemessen. Nach Einbau der Diffusionszellen in die Versuchsanlage findet der Austausch des Vormediums gegen Rezeptorlösung (0,9% Kochsalzlösung) statt und es erfolgt die Applikation der Testsubstanz. Dazu werden je 10 µl von 4,8 mg/ml ¹⁴C-Koffein und 4,8 mg/ml ¹⁴C-Testosteron auf das Hautmodell aufgetragen. Das Donorkompartiment wird direkt nach Applikation der Testsubstanz abgedeckt und das Rezeptormedium unter den Hautmodellen auf 32 °C temperiert. Über einen Zeitraum von 24 Stunden werden für definierte Zeitintervalle Kinetik-Fractionen entnommen. Nach der Expositionszeit von 8 Stunden erfolgt die erste Hautwaschung und nach 24 Stunden die zweite Hautwaschung mit Seifenlösung. Nach Beendigung der Applikationsdauer von 24 Stunden erfolgt ein sechsmaliges Tape-stripping der Hautmodelle. Nach Zugabe des Extraktionsmittels (Ethanol, bzw. Gewebelöser für die Hautmodelle und die Tape-strips) werden die Proben bis zur Messung bei Raumtemperatur gelagert.

3.19. Statistik und Auswertung

Die statistischen Analysen und die graphische Gestaltung wurden mit GraphPad PRISM 6 durchgeführt. Bei angenommener Normalverteilung wurde die einseitige Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Dunnett's Test durchgeführt. Signifikanzwerte (p-Werte) von $p < 0,05$ wurden als signifikant eingestuft und mit einem Stern angegeben. Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Versuche in drei unabhängigen Experimenten mit drei technischen Replikaten durchgeführt.

4. Ergebnisse

Der folgende Ergebnisteil gliedert sich in vier Abschnitte. Der erste Teil beinhaltet die Ergebnisse zur Entwicklung eines epidermalen Melanom-Gewebeäquivalents und umfasst die Charakterisierung der Melanomzellen in einer zweidimensionalen sowie dreidimensionalen Kultur. Dafür wurden immunhistologische Färbungen durchgeführt und die Zellen und Modelle im Hinblick auf den Stoffwechsel und die Sekretion von Proteinen untersucht. Mit der Entwicklung und Etablierung spezieller Analytik für die Untersuchung von Melanomäquivalenten beschäftigt sich der zweite Abschnitt. Im dritten Abschnitt sind die Ergebnisse zur Testung von Tumortherapeutika an Melanomäquivalenten zusammengefasst. Über ein etabliertes Tumortherapeutikum wird das Modell validiert und im Anschluss für die präklinische Therapieentwicklung genutzt. Die Steigerung der Komplexität von Melanomäquivalenten und im Speziellen die Steigerung der Hautbarriere von artifiziellen Modellen, die Integration eines dermalen Anteils sowie einer Endothelzellschicht in das Melanommodell behandelt der letzte Abschnitt des Ergebnisteils.

4.1. Entwicklung eines epidermalen Melanom-Gewebeäquivalents

Zur Entwicklung epidermaler Melanom-Gewebeäquivalente kamen fünf unterschiedliche Melanomzelllinien zum Einsatz, die freundlicherweise von Prof. Nick Hayward (QIMR, Brisbane, AUS) zur Verfügung gestellt wurden. Der Nachweis der Treibermutationen, die Verdopplungszeiten und die Tumor-Wachstumsrate im Mausmodell wurden als Information zu jeder Zelllinie bereitgestellt. Wie in Abbildung 4-1 und Tabelle 4-1 zu erkennen ist, unterscheiden sich diese nicht nur in ihrer Morphologie und Größe, sondern weisen auch ein unterschiedliches Mutationsprofil auf. Sie variieren ebenfalls in ihrer Verdopplungszeit und ihrer Tumor-Wachstumsrate im Mausmodell. Die Treibermutation BRAF^{V600E} kann in den Zelllinien MM96L sowie SKMEL28 nachgewiesen werden. Die Zelllinien A11 und MM127 tragen dagegen eine Mutation im NRAS-Gen (A11:NRAS^{Q61K} / MM127: NRAS^{G13R}). Nur die Linie D08 ist frei von beiden Treibermutationen.

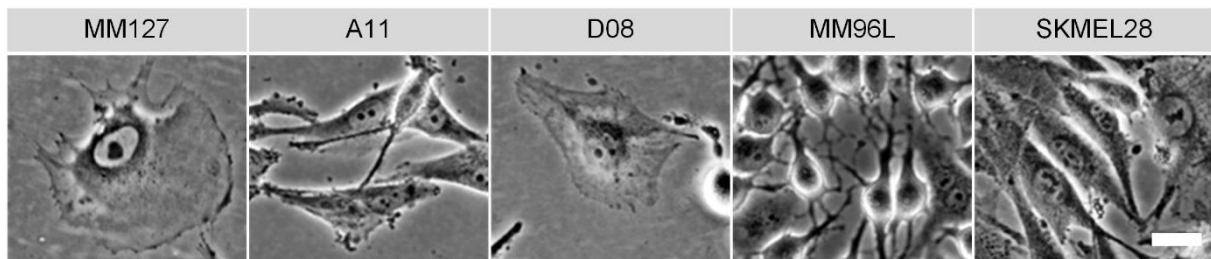


Abbildung 4-1: Mikroskopische Aufnahmen der Melanomzelllinien MM127, A11, D08, MM96L und SKMEL28.

Lichtmikroskopische Aufnahmen der adhärenzgebundenen zweidimensionalen Melanomkulturen. Der Maßstab entspricht 25 μm .

Tabelle 4-1: Eigenschaften der Zelllinien MM127, A11, D08, MM96L und SKMEL28.

Aufgelistet sind die Mutationsprofile von BRAF und NRAS, der Durchmesser, die Verdopplungszeit sowie die Tumor-Wachstumsrate im Mausmodell. (Daten wurden am QIMR Brisbane, AUS generiert)

	MM127	A11	D08	MM96L	SKMEL28
BRAF	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	BRAF ^{WT}	BRAF ^{V600E}	BRAF ^{V600E}
NRAS	NRAS ^{G13R}	NRAS ^{Q61K}	NRAS ^{WT}	NRAS ^{WT}	NRAS ^{WT}
Durchmesser [μm]	88,8 \pm 18,8	69,7 \pm 27,4	94,8 \pm 15,9	22,9 \pm 8,9	101,7 \pm 10,2
Verdopplungszeit [Tagen]	1,1	2,66	5,54	1,6	1,4
Tumor-Wachstumsrate (Maus) [mm^3/Tag]	Kein Wachstum	5,43	1,1	8,51	6,18

4.1.1. Nachweis histopathologischer Melanom-Marker in zweidimensionalen Zellkulturen

Melanome können durch verschiedene histopathologische Marker nachgewiesen werden. Dies soll genutzt werden, um die Melanomzellen in einer dreidimensionalen Umgebung zuverlässig zu identifizieren und eindeutig von den übrigen Zellen abgrenzen zu können. Die Melanom-assoziierten Marker MiTF, Melan-A, S100 und HMB45 wurden, um dieses zu erreichen, mittels immunhistochemischer Färbung in allen Melanomzelllinien sowie als Kontrolle in Keratinozyten zunächst in einer zweidimensionalen Kultur angefärbt (Abbildung 4-2). Zytokeratin 18 (CK18) diente dabei als Marker der Keratinozyten und Ki67 als Nachweis zur Proliferation in der zweidimensionalen Kultur. Die Melanomzelllinien A11, MM96L und SKMEL28 zeigten für alle Melanom-assoziierten Marker eine positive Reaktion, wohingegen für den Antikörper gegen CK18 als Keratinozytenmarker keine positive Färbung nachweisbar war. Die Zelllinie D08 war deutlich positiv für S100 und Melan-A, jedoch nur leicht für MiTF. Für HMB45 war in dieser Zelllinie keine Färbung sichtbar. Alle getesteten Melanom-assoziierten Marker waren bei MM127 durchweg negativ und auch CK18

zeigte keine Färbung. Die Keratinozyten waren hingegen positiv für CK18, alle melanozytenspezifischen Marker blieben negativ.

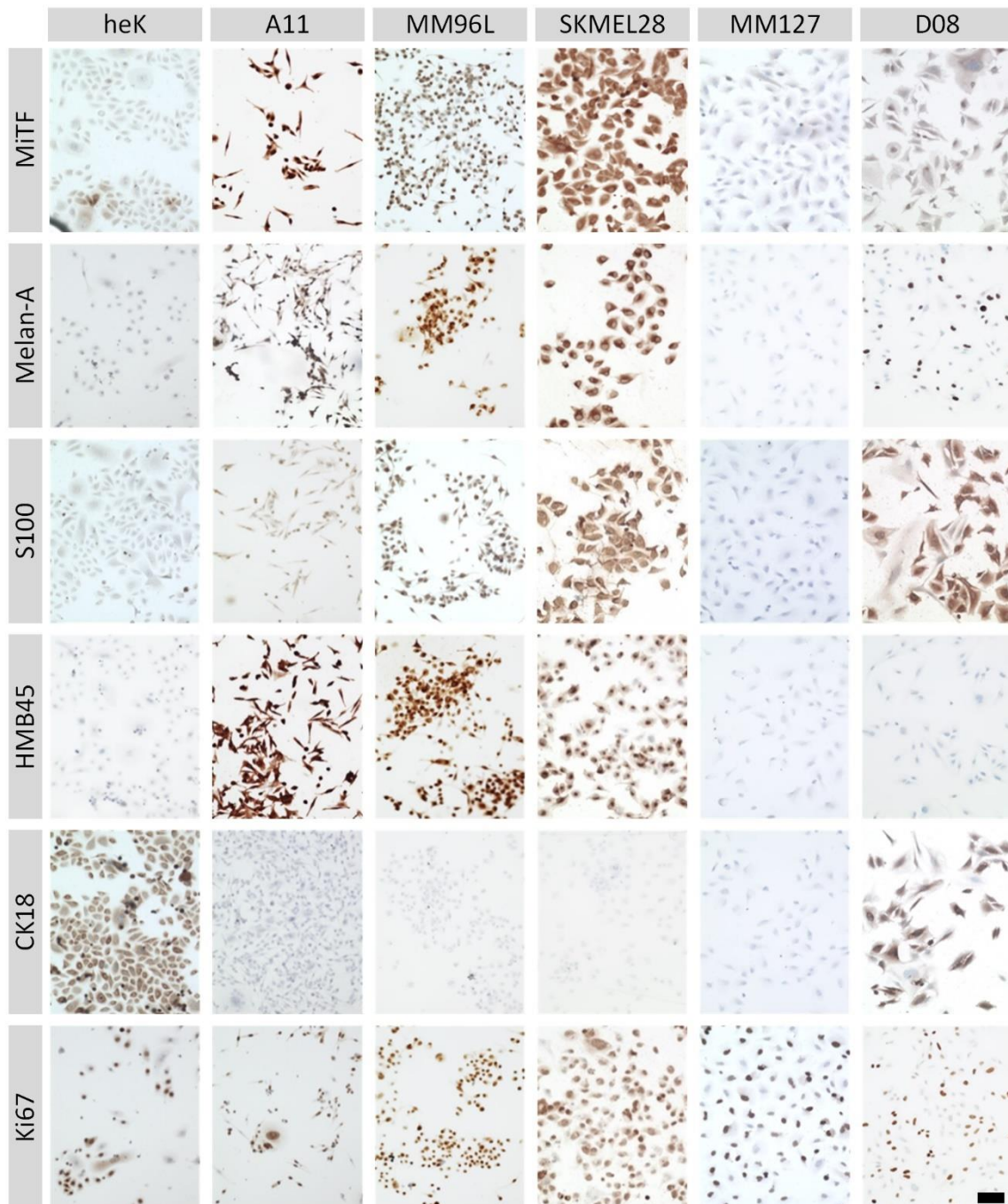


Abbildung 4-2: Immunhistochemische Färbungen der Melanomzelllinien (A11, MM96L, SKMEL28, MM127, D08) sowie Keratinozyten (heK) in zweidimensionaler Kultur.

Als Melanom-assoziierte Marker wurden MITF, Melan-A, S100 sowie HMB45 gefärbt. Zytokeratin 18 (CK18) dient als Marker der Keratinozyten und Ki67 als Nachweis zur Proliferation. Die Gegenfärbung der Zellkerne fand mit Hämatoxylin statt. Der Maßstab entspricht 100 µm.

4.1.2. Aufbau und Charakterisierung von epidermalen Melanommodellen

Der Aufbau beziehungsweise die Charakterisierung eines humanen epidermalen Melanommodells erfolgte, um es als Testsystem für die präklinische Testung von Therapeutika und zur Untersuchung von pathologischen Prozessen nutzen zu können. Der erfolgreiche Aufbau eines humanen epidermalen Melanommodells ist histologisch betrachtet durch die Ausbildung einer mehrschichtigen Epidermis mit einem *stratum corneum* und einem klar auszumachenden Tumor gekennzeichnet. Dafür ist das zum Modellaufbau eingesetzte Verhältnis zwischen humanen epidermalen Keratinozyten und Melanomzellen von großer Bedeutung. Nur bei einem korrekten Verhältnis kommt es zur Ausbildung von einzelnen Tumornestern, die sich basal zwischen der physiologischen Epidermis angesiedelt haben. Bei zu hohen beziehungsweise zu niedrigen Verhältnissen sind entweder keine Melanomzellen im Modell nachweisbar oder eine vollständige Verdrängung der epidermalen Keratinozyten durch die Melanomzellen zu beobachten (vgl. Abbildung 4-3).

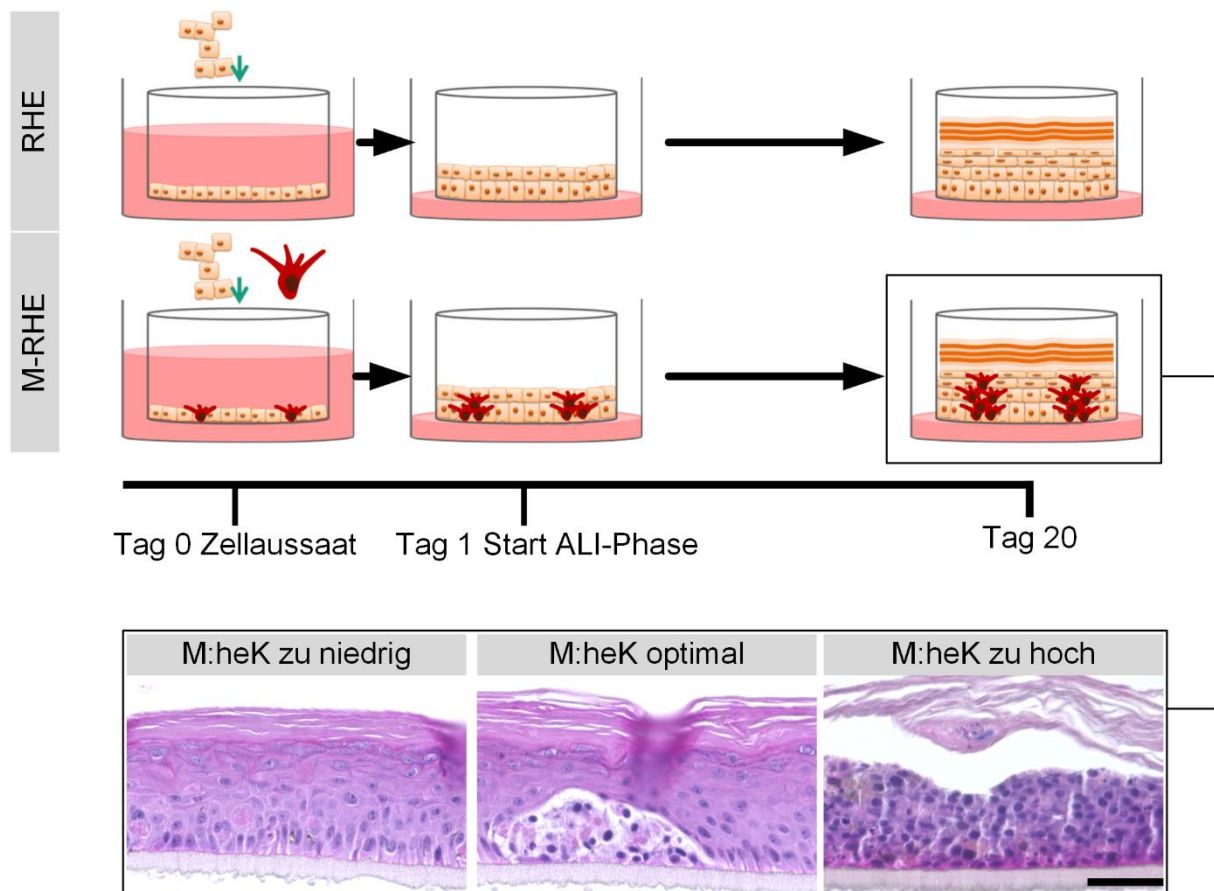


Abbildung 4-3: Schematische Darstellung des Aufbaus humaner epidermaler Melanom Modelle. Nach Zellaussaat und submerser Kultivierung für 24h schließt sich eine Reifungsphase des Gewebeäquivalents an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche (ALI) an. Nach 20 Tagen der Kultivierung findet eine histologische Hämatoxylin-Eosin-Färbung statt. Zu sehen sind ein optimales Verhältnis sowie suboptimale Verhältnisse zwischen Keratinozyten (heK) zu Melanomzellen. Der Maßstab entspricht 50 µm.

Daher war der erste Schritt in der Etablierung des Modells ein für jede Melanomzelllinie geeignetes Zellverhältnis zu bestimmen. Die für die Durchführung dieser Arbeit festgelegten Aussaatverhältnisse zwischen Keratinozyten und der jeweiligen Melanomzelllinie sind Tabelle 3-1 zu entnehmen. Die generierten Gewebeäquivalente wurden mittels HE-Färbung überprüft. Nach 19-tägiger Kultivierung an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche ähnelt das epidermale Modell stark der histologischen Architektur der menschlichen Epidermis (Abbildung 4-4). Die Modelle zeigen ein physiologisches Differenzierungsmuster mit einer prismatischen Basalzellschicht (*stratum basale*), zwei bis drei Schichten *stratum spinosum* mit abgeflachten Keratinozyten und zwei bis drei Schichten *stratum granulosum* mit Keratingranula. Darüber hinaus wurde die Differenzierung durch ein gut ausgebildetes *stratum corneum*, das aus zellkernfreien Korneozyten besteht, nachgewiesen. Im pathologischen Zustand des malignen Melanoms sind die Melanomzellen im *stratum basale* lokalisiert und reichen je nach Größe und Ausdehnung zum Teil bis in suprabasale Epidermisschichten hinein und zeigen somit zunächst eine Aufwärtmigration. Der in Abbildung 4-4 dargestellte pathologische *in vivo* Zustand stimmt mit dem des *in vitro* Modells überein. Auch hier befinden sich die Melanomzellen zu Clustern vereint in Bereichen des *stratum basale* und dehnen sich in suprabasale Epidermisschichten aus.

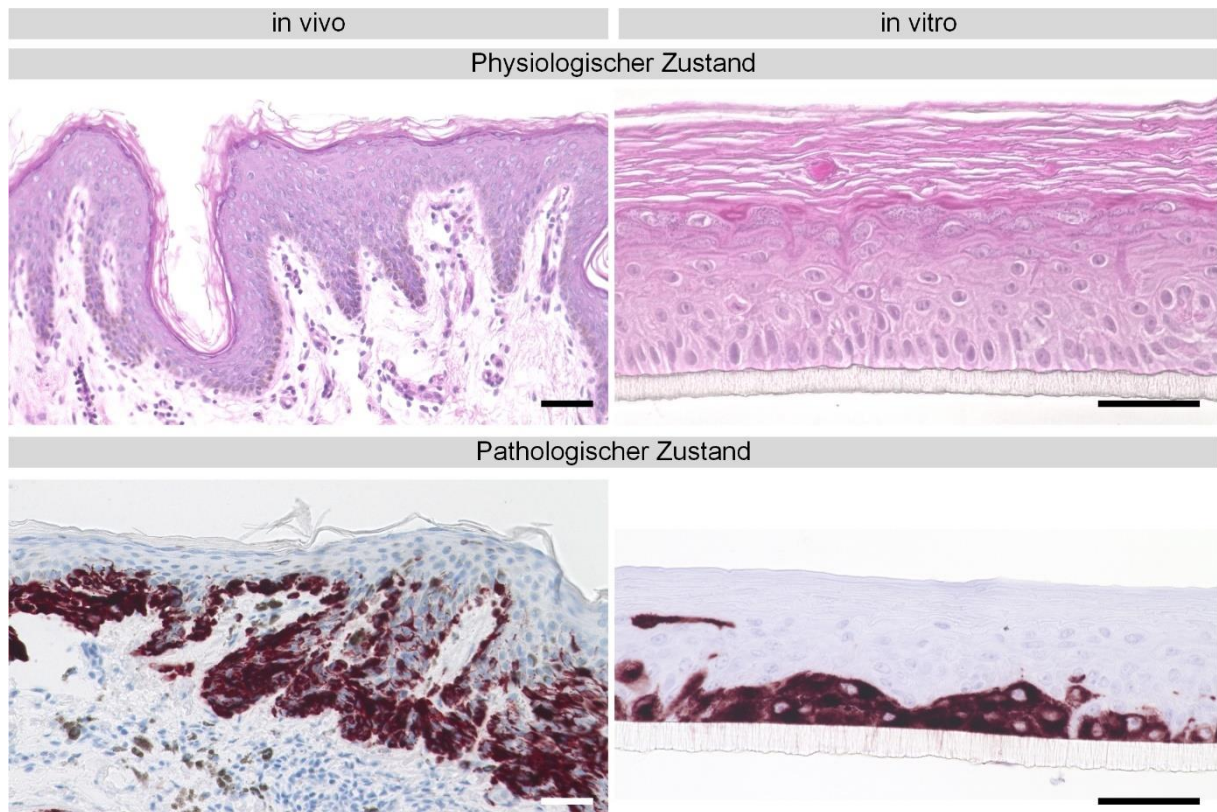


Abbildung 4-4: Vergleich der *in vivo* Situation mit den *in vitro* generierten Modellen im physiologischen und pathologischen Zustand. Der Maßstab entspricht 50 µm

Im Anschluss an die 20-tägige Kultivierung der Haut- bzw. Melanommodelle findet für den physiologischen Zustand eine histologische Hämatoxylin-Eosin-Färbung und für den pathologischen Zustand eine immunhistochemische Färbung von HMB45 mit einer zusätzlichen Kernfärbung mittels Hämalaun statt. Die *in vivo* Proben wurden jeweils äquivalent dazu gefärbt.

Bei einer gemeinsamen Aussaat von Melanomzellen mit Keratinozyten können bei einigen Zelllinien bereits in der histologischen Übersichtsfärbung pathologische Unregelmäßigkeiten festgestellt werden (Abbildung 4-5). Durch immunhistologische Färbungen der Melanom-assoziierten Marker MiTF, Melan-A, S100 und HMB45 lässt sich eine Lokalisierung der Melanomzellen innerhalb des dreidimensionalen Gewebeäquivalents vornehmen (Abbildung 4-5 und Abbildung 4-6). Die Melanomzellnester variieren in Größe und Form und sind über das gesamte Modell verteilt. Sie sind im *stratum basale* lokalisiert und reichen je nach Größe und Ausdehnung zum Teil bis in suprabasale Epidermisschichten hinein und zeigen somit eine Aufwärtsmigration. In den Melanommodellen, und auch hier nur vorwiegend in den Melanomzellnestern, ist eine stärkere Proliferation, die durch eine Ki67 Färbung nachweisbar ist, sichtbar. Im reinen Epidermismodell finden sich Ki67 positive Zellen nur in basalen Regionen. In den Melanommodellen der Zelllinie MM96L, SKMEL28

und A11 können jedoch auch in suprabasalen Bereichen Ki67-positive Melanomzellen detektiert werden (Abbildung 4-5).

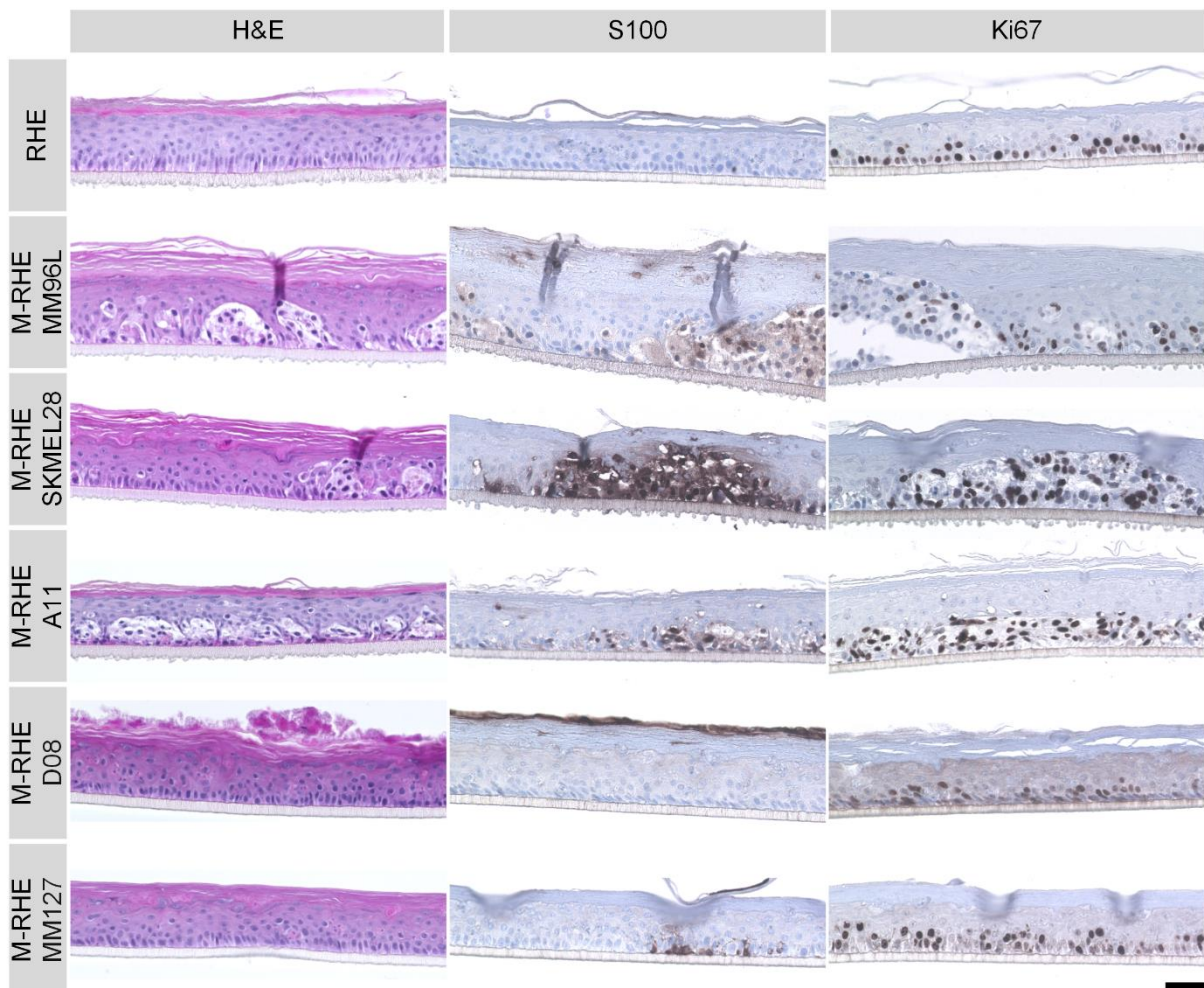


Abbildung 4-5: Histologische Übersichtsfärbung sowie immunhistochemische Färbungen eines epidermalen Modells (RHE) sowie der Melanommodelle (M-RHE)

Für die Melanommodelle wurden die Zelllinien MM96L, SKMEL28, A11, D08 sowie MM127 eingesetzt. Eine Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung dient der Übersicht. Dargestellt ist zudem die immunhistologische Färbung gegen den Melanommarker S100 und den Proliferationsmarker Ki67. Zur Färbung der Zellkerne wurde jeweils Hämatoxylin verwendet. Der Maßstab entspricht 50 µm.

Bei genauer Betrachtung der Lokalisation mit Hilfe einer Färbung von MiTF, Melan-A, S100 und HMB45 zeigt sich eine zelllinienspezifische Verteilung (Abbildung 4-6). Während sich bei den Zelllinien MM96L und SKMEL28 einzelne, stark abgegrenzte Tumornester ausbilden und durch größere Bereiche physiologisch aussehender Epidermis voneinander abgegrenzt sind, ist bei größeren Zellnestern eine sehr starke Tendenz zur Aufwärtsmigration in Bereiche der ausdifferenzierten Keratinozyten zu verzeichnen. Die Zelllinie A11 erstreckt sich über weite Teile des Modells. Bei den größten Tumorzellclustern scheint es zu einer Ausbreitung in lateraler Richtung zu

kommen, jedoch sind hier auch in höher gelegenen Schichten Melanomzellen zu finden. In den dreidimensionalen Modellen der Linie MM127 bleiben die Marker MiTF, HMB45 sowie Melan-A wie auch in der zweidimensionalen Kultur negativ. Für den Marker S100 weisen in der basalen Zellschicht jedoch einzelne Zellen eine positive Immunreaktivität für den spezifischen Antikörper auf. Melanommodelle der Linie D08 zeigen im Vergleich zum epidermalen Modell ein verändertes *stratum corneum*, das eine positive Färbung auf S100 zeigt (Abbildung 4-6). Einzelne für HMB45 und Melan-A positive Zellen können im basalen Bereich des Modells detektiert werden. Die Färbung mit MiTF zeigt keine Bräunung.

Da sich letztlich bei den Zelllinien D08 und MM127 keine zur *in vivo* Situation des Melanoms vergleichbare Histopathologie generieren ließ, wurde im weiteren Verlauf der Arbeit der Fokus auf die Melanommodelle der Linien A11, SKMEL28 und MM96L gelegt.

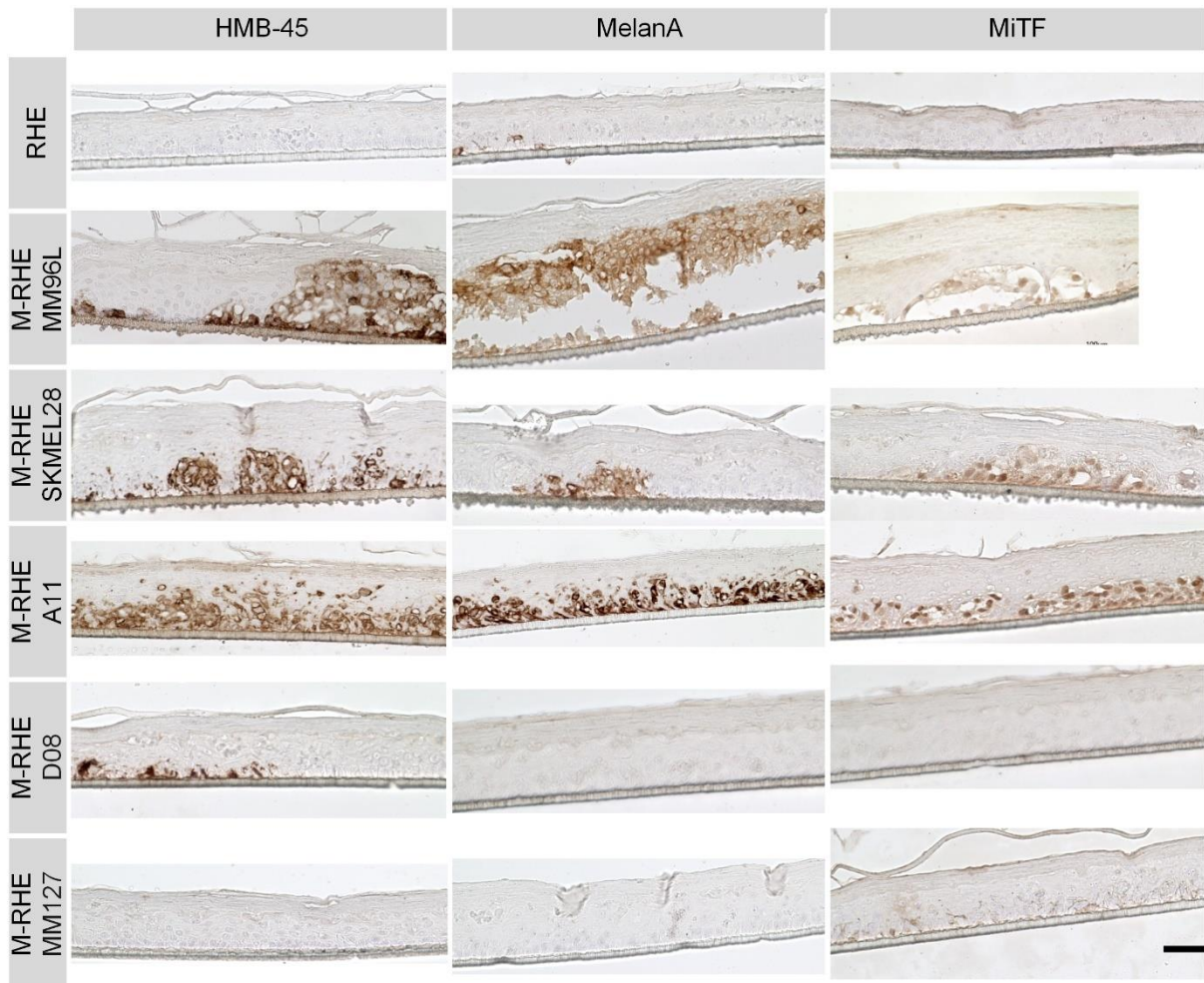


Abbildung 4-6: Immunhistochemische Färbung Melanom-assoziiierter Marker der 3D Modelle.

Zur Herstellung der Melanommodelle wurden die Zelllinien MM96L, SKMEL28, A11, D08 sowie MM127 verwendet. Zum Nachweis der Melanomzellen innerhalb der epidermalen Modelle wurden die Marker HMB45, Melan-A sowie MiTF immunhistochemisch gefärbt. Der Maßstab entspricht 50 μm .

Die Mikroumgebung des Tumors ist für die Progression des Melanoms essentiell. Merkmale dieser Mikroumgebung ergeben sich aus dem molekularen Crosstalk zwischen den Melanomzellen und den umgebenden Zellpopulationen. Die Kultivierung in einer dreidimensionalen Umgebung innerhalb eines RHEs ermöglicht es, den direkten Kontakt von Melanomzellen zu differenzierten epidermalen Schichten zu rekonstruieren. Radiales Wachstum der Melanomzellen bringt diese in Kontakt zu differenzierten Keratinozyten, die auch Notch-Liganden exprimieren. Da die Interaktion von Keratinozyten und Melanomzellen über Notch-Signaling die Invasion initiieren soll, stellt dies einen entscheidenden Prozess im Crosstalk dar und soll daher mittels Immunfärbungen im Modell überprüft werden [31]. Es fand eine Immunfluoreszenzfärbung der Notch-Liganden Jagged1 sowie DLL1 im epidermalen Modell statt, um die Verteilung der Notch-Liganden innerhalb der rekonstruierten

Epidermis zu sehen (Abbildung 4-7). Dabei zeigte sich, dass es vorwiegend in den oberen Schichten, im Bereich der terminal differenzierten Keratinozyten, zu einem Signal und damit auch zur Expression des Notch-Liganden Jagged1 kam. Die Expression von DLL1 beginnt schon bei früherer Differenzierung, jedoch findet hier ebenfalls keine Färbung des *stratum basale* statt. Mittels DAB-Färbung lässt sich die Struktur des Gewebes besser darstellen. Die Melanommodelle wurden in dieser Hinsicht beispielhaft für die Zelllinie MM96L gefärbt. In der DAB-Färbung zeigt sich ein positives Signal über alle epidermalen Schichten, jedoch eine stärkere Färbung im Bereich der differenzierten Keratinozyten. Die Melanomnester zeigen keine positive Immunreaktion. Da sie aber mit den Notch-Liganden exprimierenden Keratinozyten in Kontakt kommen, kann es so zu einer Interaktion zwischen den zwei Zelltypen kommen.

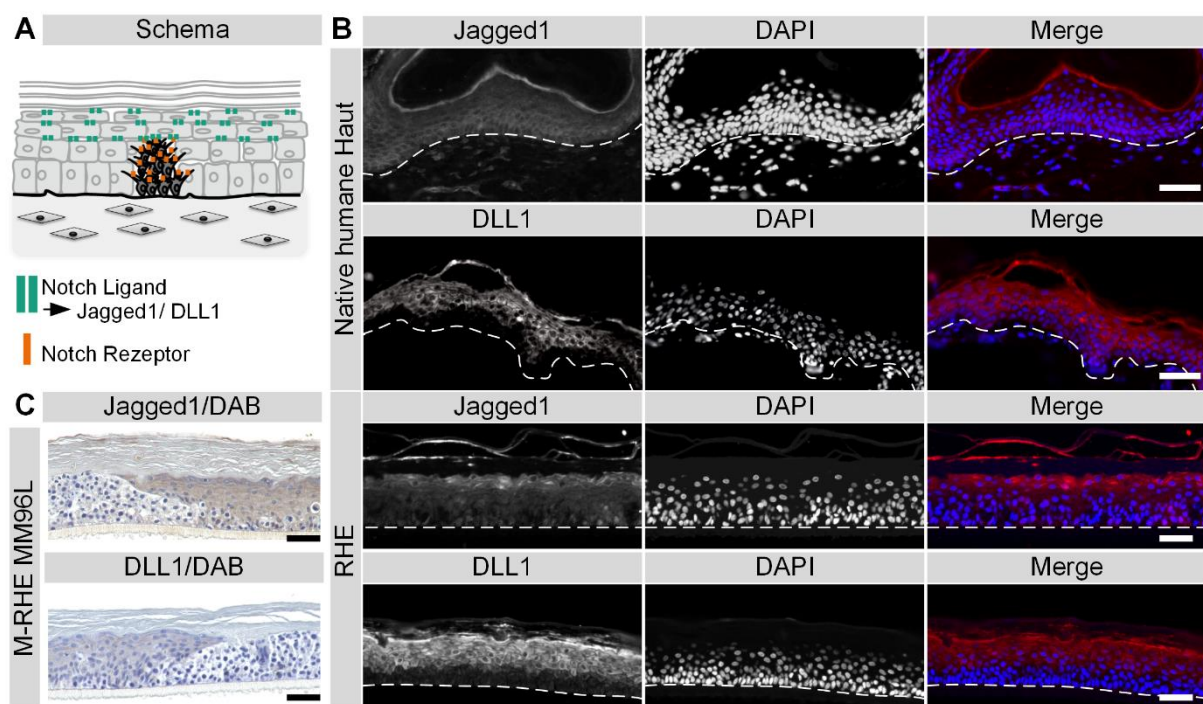


Abbildung 4-7: Interaktionen zwischen Melanomzellen und Keratinozyten über Notch-Signaling
 Neben dem Schema (A) des Notch-Signaling sind Immunfluoreszenzfärbungen (B) gegen die Antikörper von Jagged1 (rot) und DLL1 (rot) bei nativer humaner Haut sowie im rekonstruierten Epidermismodell (RHE) dargestellt. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) gegengefärbt. Zudem ist eine immunhistochemische Färbung (DAB) (C) von Jagged1 und DLL1 für das Melanommodell (M-RHE) der Melanomzelllinie MM96L gezeigt. Die Zellkerne sind mit Hämatoxylin gegengefärbt. Der Maßstab entspricht 50 µm.

Multiplex Assays sind immunologische Nachweisverfahren zur Erkennung und Quantifizierung des Expressionsspiegels mehrerer sekretorischer Proteine wie beispielsweise von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren. Durch die Entstehung von malignen Zellen kann sich die Proteinsekretion verändern. Um zu überprüfen, ob dies auch in den artifiziellen Modellen detektiert werden kann, wurde die Expression der Matrix-Metalloproteasen (MMP) 2 und 7, Syndecan 1 und 4, Interleukin 1 alpha (IL-1 alpha) und Interleukin 8 (IL-8), Angiogenin, des *Parkinson disease protein 7* (PARK7), Tenascin, *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) sowie von Fibronectin gemessen. Dafür wurde der Überstand der Modelle an Tag 20 der Kultur abgenommen und die Proteinmengen darin gemessen (Abbildung 4-8).

Eine der wichtigsten Auswirkungen von MMPs auf die Progression von Krebserkrankungen ist ihre Rolle bei der Degradierung der extrazellulären Matrix, da es Tumorzellen die Invasion ermöglicht. Eine leicht erhöhte Expression von MMP7 wurde in den Melanommodellen der Linien MM96L und A11 detektiert, wohingegen MMP2 eine sehr starke Erhöhung im Vergleich zum epidermalen Modell zeigt. Die ins Modell integrierten SKMEL28 Zellen zeigen keine Verstärkung der MMP7 Expression und nur eine leichte gegenüber MMP2. Die Syndecan-Familie besteht aus vier Transmembran-Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPGs), die hauptsächlich auf der Zelloberfläche vorhanden sind. Syndecane sind an einer Vielzahl von biologischen Prozessen beteiligt, darunter Wachstum, Differenzierung, Zellausbreitung, Zelladhäsion, Zellmigration, Organisation des Zytoskeletts, Infiltration und Angiogenese. Syndecan1 wurde in den Linien SKMEL28 und MM96L gegenüber dem epidermalen Modell etwas verstärkt ausgeschüttet. Für Syndecan4 kommt es bei den Modellen aller drei Melanomzelllinien zu einer Herabregulierung. Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-8 (IL-8) sind proinflammatorische Zytokine. Eine leichte Erhöhung der Expression von IL1 alpha konnte bei den Linien SKMEL28 und MM96L verzeichnet werden, wohingegen A11 eine geringere Expression als das epidermale Modell aufweist. Für die Linie A11 kann jedoch eine stark erhöhte Sekretion von IL8 gemessen werden. Bei der Linie MM96L kommt es lediglich zu einer leichten Erhöhung. Die Werte der Linie SKMEL28 sind mit dem epidermalen Modell vergleichbar. Angiogenin ist ein potentes angiogenes Protein, das von Tumorzellen und infiltrierenden Zellen im Tumorgewebe erzeugt wird. Es konnte in den Modellen der Linien SKMEL28 und MM96L verstärkt gemessen werden. Die Linie A11 zeigt Messwerte, die im Bereich des epidermalen Modells liegen. Im Rahmen von Tumorerkrankungen wirkt DJ-1 /

PARK7 als Onkogen, das das akt-vermittelte Überleben der Zellen steuert. PARK7 wird durch die Integration aller verwendeten Melanomzelllinien verstärkt ausgeschüttet, am stärksten jedoch durch die Linie A11. Eine geringfügige Verstärkung der Expression von Tenascin, einem extrazellulären Matrixprotein von Stammzellnischen, zeigen die Linien SKMEL28 und MM96L, A11 hingegen zeigt eine leichte Reduzierung. Der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) ist der Schlüsselmediator der Angiogenese bei Tumorerkrankungen. Dieser Schlüsselmediator ist in allen Linien hochreguliert, die stärkste Expression zeigt die Linie MM96L. Im epidermalen Modell und im Melanommodell der Linie MM96L kann kein Fibronectin gemessen werden. Bei den Linien SKMEL28 und A11 ist eine sehr starke Expression nachweisbar.

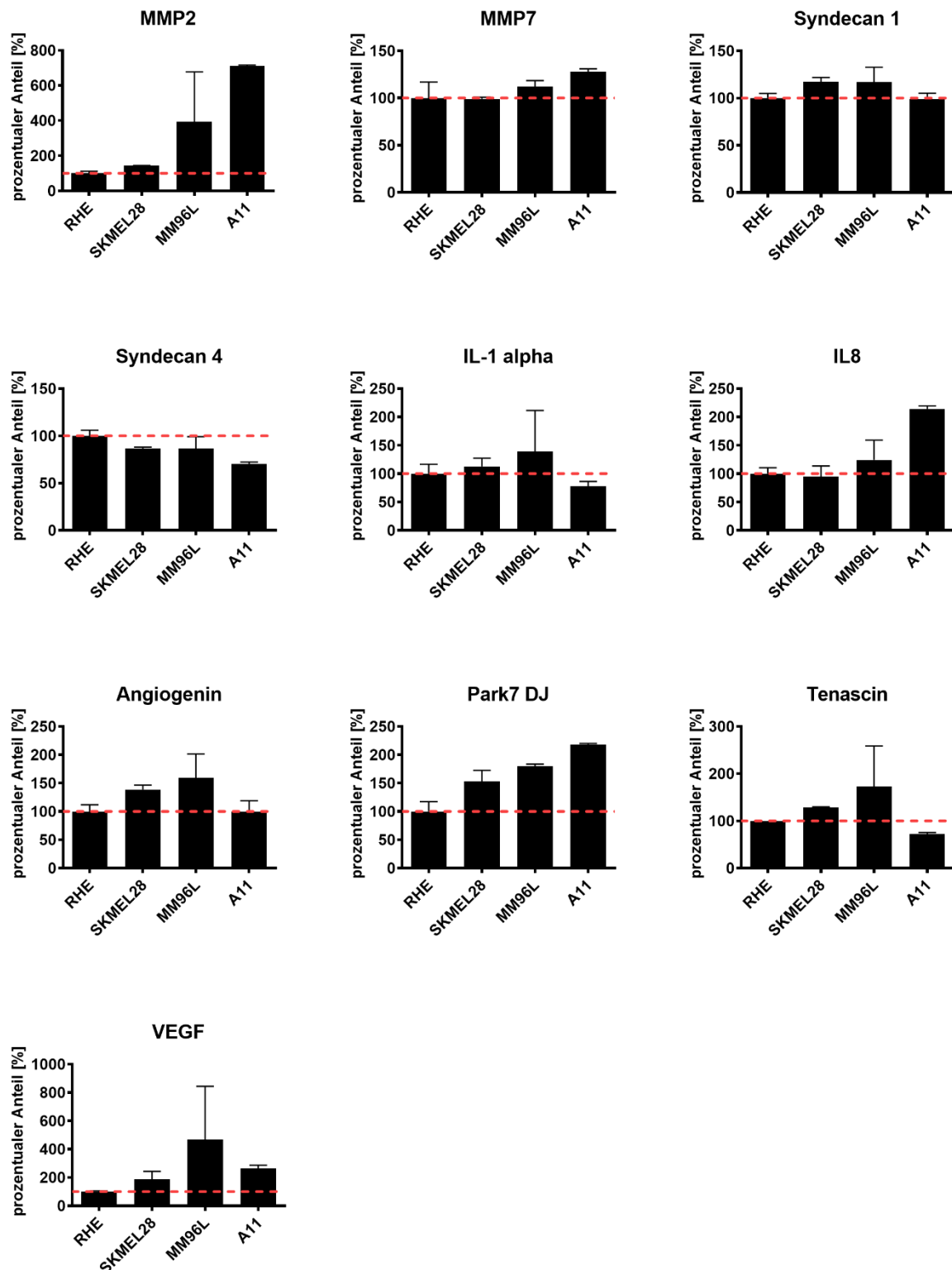


Abbildung 4-8: Multiplex Assay zur Bestimmung tumorassoziierter Proteine.

Gemessen wurde die Expression der Matrix-Metalloproteasen (MMP) 2 und 7, Syndecan 1 und 4, Interleukin 1 alpha (IL-1 alpha) und Interleukin 8 (IL-8), Angiogenin, das *Parkinson disease protein 7* (PARK7), Tenascin sowie Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Melanommodellen der Linien SKMEL28, MM96L und A11 sowie in epidermalen Modellen (RHE). Die durchgezogene rote Linie verdeutlicht den Wert der Expression im epidermalen Modell. (n=1 mit drei technischen Replikaten)

Tumorgewebe zeigt oftmals einen veränderten Stoffwechsel und damit verbunden gemeinsame Charakteristika. Über einen gesteigerten Glukoseverbrauch ist es so beispielsweise möglich, im klinischen Bereich Tumorgewebe zu identifizieren und zu lokalisieren. Nach 20-tägiger Kultur der Modelle ist ein gesteigerter Glukoseverbrauch im Medium aller Melanomzelllinien zu detektieren. Der Anstieg der Laktatproduktion ist im Vergleich zum Glukoseverbrauch drastisch erhöht. Jedoch zeigt sich eine Übereinstimmung der Zelllinien untereinander, was das Verhältnis des Glukoseverbrauchs zur Laktatproduktion betrifft. Melanommodelle der Linie A11 zeigen den stärksten Glukoseverbrauch und auch die größte Laktatproduktion, gefolgt von der Linie MM96L. Die geringste Veränderung des Stoffwechselweges konnte in Modellen der Zelllinie SKMEL28 detektiert werden (Abbildung 4-9).

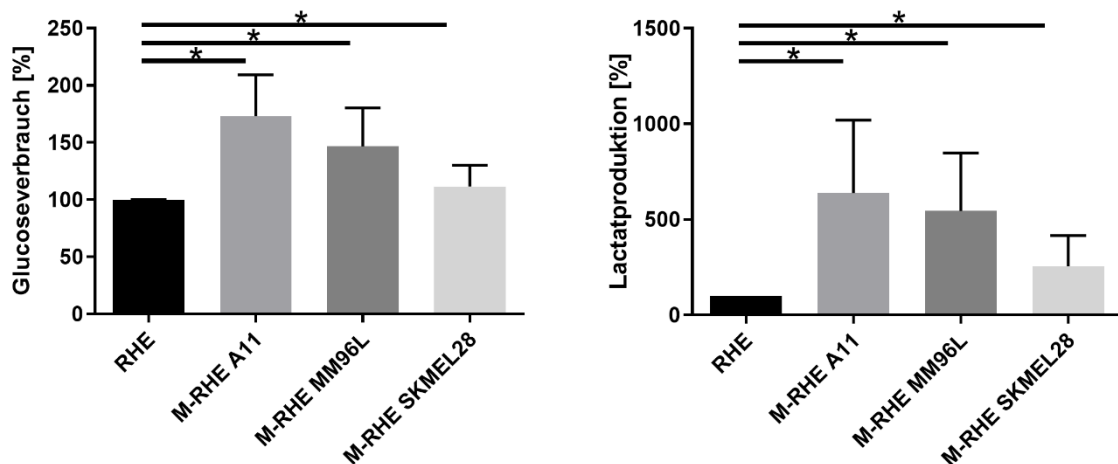


Abbildung 4-9: Veränderter Glukoseverbrauch und Laktatproduktion in Melanommodellen im Vergleich zu epidermalen Modellen (RHE)

4.2. Entwicklung und Etablierung spezieller Analytik für die Untersuchung von Gewebeäquivalenten

Die Nutzung dreidimensionaler Modelle und die Kokultivierung mit anderen Zellen bietet den Vorteil einer Rekonstruktion der Tumormikroumgebung und ermöglicht den Crosstalk der Zellen, was letztendlich zu einer Simulation der *in vivo* Situation führt. Viele für die Tumorforschung etablierte Methoden eignen sich jedoch nur für die Kultivierung zweidimensionaler Zellkulturen. Ein Ziel dieser Arbeit liegt deshalb in der Entwicklung von Methoden, die sich für die Analyse von dreidimensionalen Gewebeäquivalenten eignen und anhand derer eine spätere Wirkung von Therapeutika getestet werden kann.

4.2.1. Reisolierung von Zellen aus Gewebeäquivalenten

Die Kokultivierung, und dabei insbesondere der dreidimensionale Aufbau, erschwert die quantitative Analyse der verschiedenen im Modell vorliegenden Zellarten. Daher war es notwendig, ein Verfahren zu entwickeln, mit dessen Hilfe die jeweiligen Zellarten einzeln untersucht werden können.

Zunächst wurde eine Methode für die Reisolierung von Keratinozyten aus epidermalen Modellen etabliert. Nach enzymatischer Trennung des Modells von der synthetischen Membran mit Dispase fand ein anschließender Verdau mittels Accutase oder Trypsin statt. Von den so isolierten Zellen wurden Zytospots und eine anschließende HE Färbung angefertigt, um diese Zellsuspensionen histologisch begutachten zu können. Ferner fand die Fixierung und Paraffineinbettung des restlichen Gewebes statt. Nach Accutaseverdau ist deutlich zu sehen, dass es zu einer Degeneration der Keratinozyten mit Bildung von Vakuolen kommt. Auf den histologisch gefärbten Zytospots der Zellsuspension nach Accutaseverdau finden sich kaum zelluläre Strukturen. Im Gegensatz dazu sind nach Trypsinverdau viele Zellen mit einem deutlich ausgebildeten Zellkern (blau) und mit umgebendem Cytoplasma (rot) auf den Zytospots sichtbar.

Zur weiteren Charakterisierung wurden durchflusszytometrische Analysen nach Zellzyklusfärbung mittels Propidiumjodid durchgeführt. Schon die Auftragung der Seitwärtsstreuung (*Side scatter*, SSC) gegen die Vorwärtsstreuung (*Forward scatter*, FSC) zeigt eine Veränderung zwischen dem Trypsin- und Accutaseverdau.

Dabei ermöglicht die Vorwärtsstreuung die Beurteilung der Zellgröße. Die FSC-Intensität ist proportional zum Durchmesser der Zelle und beruht hauptsächlich auf der Lichtbeugung um die Zelle.

Die Seitwärtsstreuungsmessung liefert Informationen über die interne Komplexität bzw. Granularität einer Zelle. Die Grenzfläche zwischen Laser und intrazellulären Strukturen bewirkt, dass das Licht bricht oder reflektiert wird. Granula und Zellkern gehören zu den zellulären Komponenten, die die Seitenstreuung erhöhen. Die Größe der gemessenen Partikel ist nach dem Verdau mit Trypsin größer als nach dem mit Accutase, was auf die verstärkte Bildung von Zell-Detritus hindeutet, da sie tendenziell niedrigere Vorwärtsstreuwerte haben und sich meistens in der unteren linken Ecke des FSC-vs.-SSC-Dichtediagramms finden. Die Messung des zellulären DNA-Gehalts über eine Propidiumjodidfärbung erlaubt die Unterteilung des Zellzyklus in drei verschiedene Phasen (G0/G1, S, G2/M). Zur Bestimmung des Zellzyklus wird aus der Fluoreszenzintensität ein Histogramm erstellt. Nur nach Verwendung von Trypsin zur Generierung von Einzelzellsuspensionen kommt es zur Ausbildung eines deutlichen G0/G1 Peaks.

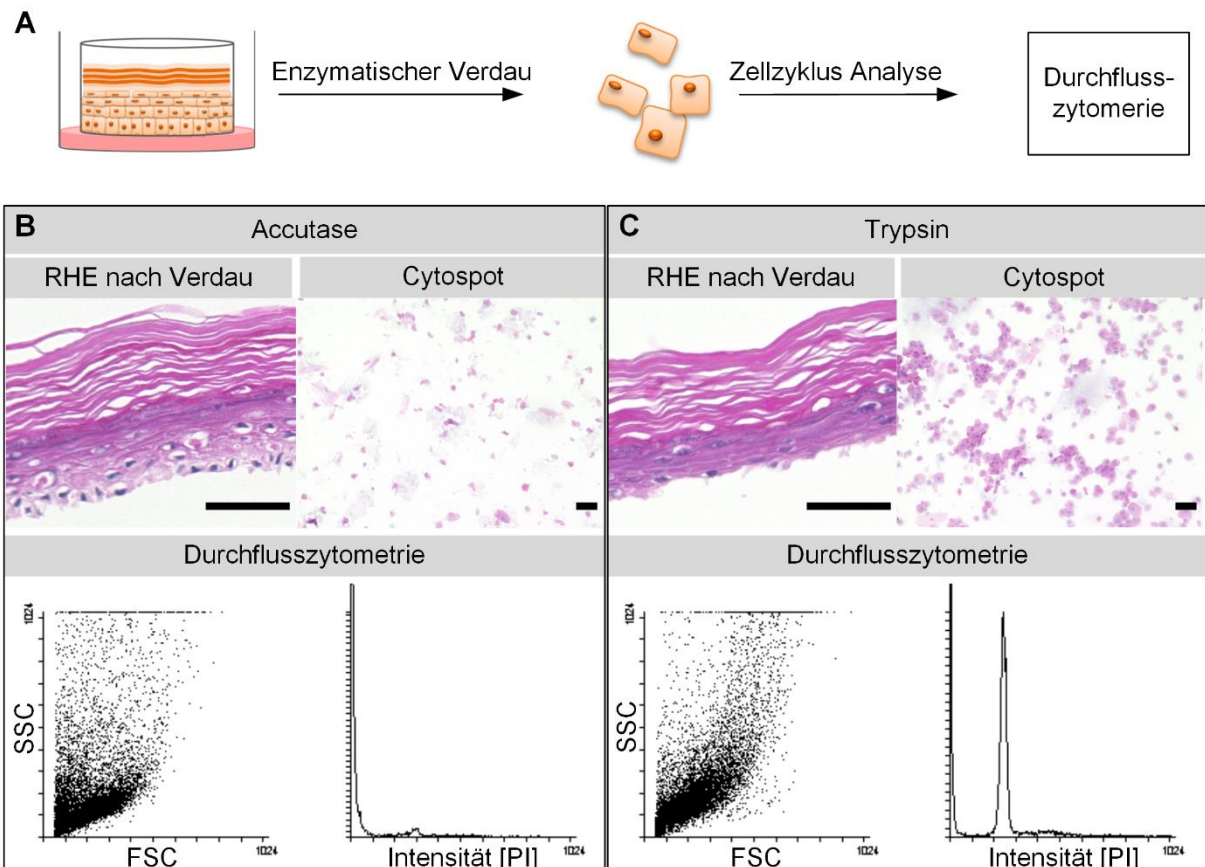


Abbildung 4-10: Isolierungserfolg von Einzelzellsuspensionen nach enzymatischem Verdau mittels Accutase und Trypsin.

(A) Schematische Darstellung des erfolgten Prozesses. (B) Nach enzymatischem Verdau mittels Accutase (B) und Trypsin (C) erfolgt eine durchflusszytometrische Bestimmung des Zellzyklus und die Erstellung von Zytospots und Histologien. Der Maßstab entspricht 50 μm .

Durch die aus der Literatur bereits bekannte veränderte Expression von Zelladhäsionsmolekülen bei malignen Zellen liegt der Schluss nahe, dass es durch die Nutzung von Accutase zwar nicht möglich ist, Keratinozyten aus den Modellen herauszulösen, jedoch Melanomzellen. Zur Überprüfung dieser Hypothese und zum Nachweis, ob sich dieses Verfahren als Aufreinigungsschritt nutzen lässt, wurden Einzelzellsuspensionen durch Accutaseverdau aus Melanommodellen und durch Trypsinverdau aus epidermalen Modellen generiert und Zytospots angefertigt. Um die Effektivität der Aufreinigung zu beurteilen, wurden neben einer HE Übersichtsfärbung die hergestellten Zytospots immunhistologisch begutachtet. Eine Anfärbung und anschließende quantitative Bestimmung des Keratinozytenmarkers Zytokeratin 14 und des Melanommarkers Melan-A zeigte, dass die Zellen des epidermalen Modells zu 98,7% positiv für Zytokeratin 14 und zu 100% negativ für Melan-A sind. Durch den Accutaseverdau konnten aus den Melanommodellen aller drei Zelllinien mit über 90%

Reinheit Melanomzellen isoliert werden (A11: 1,4% positiv für CK14, 95,6% positiv für Melan-A; MM96L: 1,5% positiv für CK14, 94,7% positiv für Melan-A; SKMEL28: 4,2% positiv für CK14, 94,2% positiv für Melan-A). Diese hohe Reinheit ermöglicht die Nutzung der generierten Einzelzellsuspensionen für weitere Analysen, wie der Färbung mit Ki67 (vgl. Abbildung 4-12) oder der Bestimmung des Zellzyklus (vgl. Abbildung 4-13 und Abbildung 4-14).

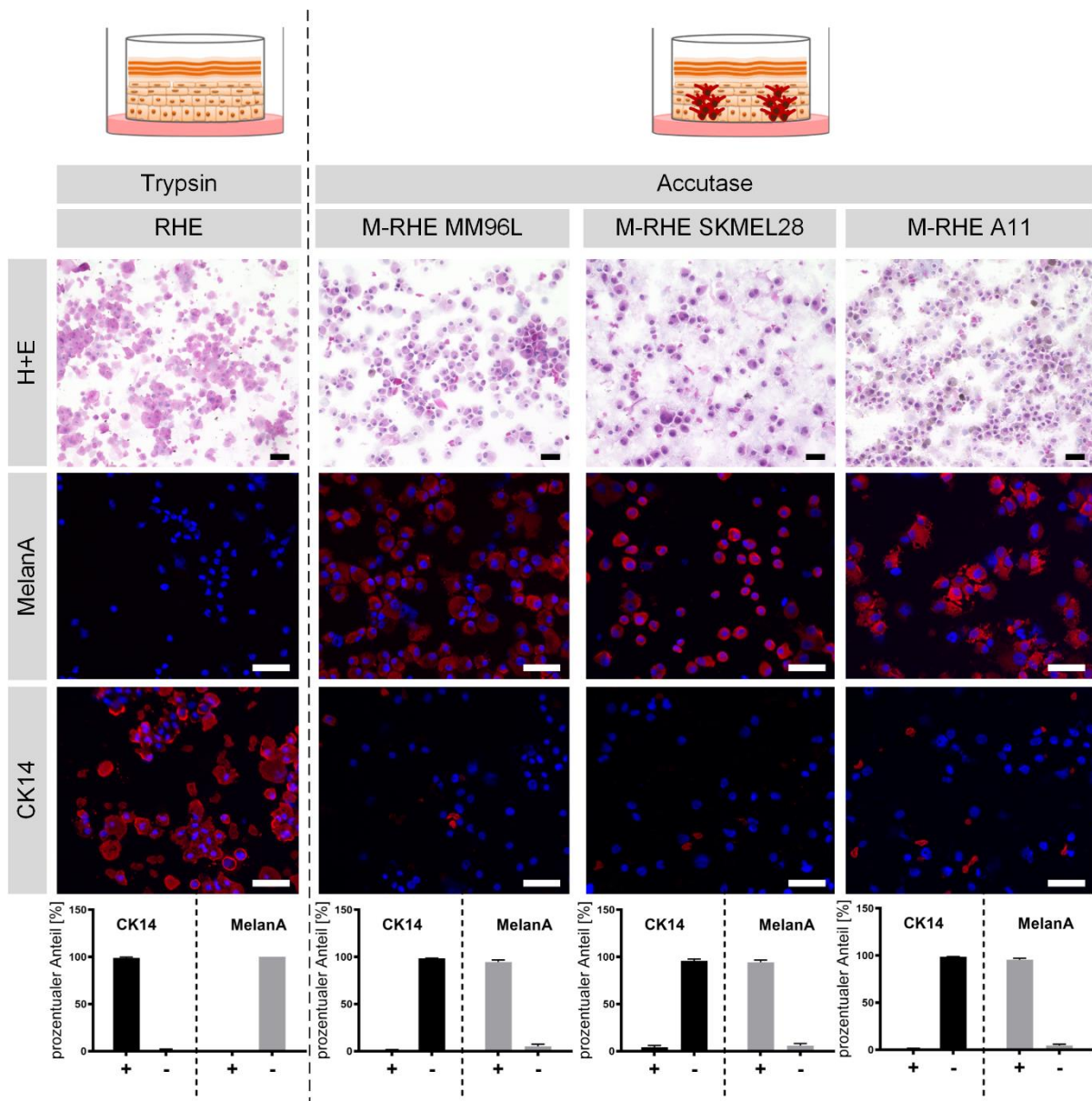


Abbildung 4-11: Effektivität der Aufreinigung der isolierten Zellen aus 3D Gewebeäquivalenten. Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung der nach der Isolation generierten Zytospots. Die Immunfluoreszenzfärbung der Einzelzellsuspensionen mit Melan-A und Zytokeratin 14 (CK14) sowie deren quantitative Auszählung zeigt die erfolgreiche Aufreinigung der Melanomzellen aus Melanommodellen. Mittels DAPI wurde eine Gegenfärbung der Zellkerne erreicht. Der Maßstab entspricht 50 µm.

Die Untersuchung des Einflusses der dreidimensionalen Umgebung sowie die Kokultur mit Keratinozyten auf die Proliferation der Melanomzellen erfolgt durch eine Ki67 Färbung. Dazu wurden Zellen aus einer zweidimensionalen Monokultur sowie Melanomzellen, die aus einem dreidimensionalen Zellverband isoliert wurden, mittels eines Antikörpers gegen Ki67 angefärbt und der Zellkern durch DAPI gegengefärbt (Abbildung 4-39). Die deutlichste Reduktion der Proliferation, die durch einen Rückgang der Ki67 positiv gefärbten Zellkerne zu verzeichnen ist, konnte im epidermalen Modell beziehungsweise in den Keratinozyten detektiert werden. Nach der Isolation der Keratinozyten aus dem Gewebeverband können nur noch sehr vereinzelt Ki67-positive Zellkerne beobachtet werden. Die zweidimensionale Keratinozytenkultur zeigt hingegen fast ausschließlich positiv gefärbte Zellkerne. Bei allen drei Melanomzelllinien ist der Rückgang der Proliferation in der dreidimensionalen Kultur zwar nicht so drastisch, aber ebenfalls deutlich erkennbar. Sowohl die Anzahl als auch die Intensität der Färbung im dreidimensionalen Modell zur zweidimensionalen Kultivierung ist reduziert.

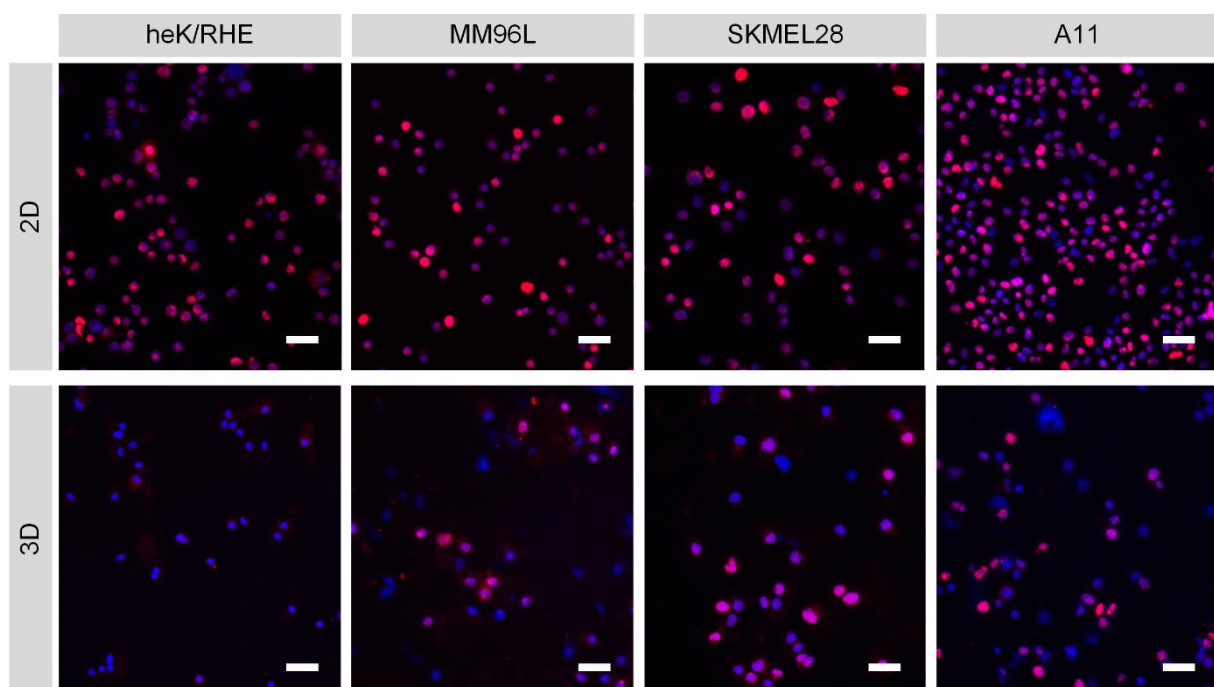


Abbildung 4-12: Unterschiede in der Expression von Ki67 zwischen einer 2D zu 3D Kultivierung der Zellen

Die Immunfluoreszenzfärbung von Ki67 (rot) zeigt eine Reduktion der Ki67 positiven Zellkerne nach der Kultivierung im dreidimensionalen Gewebeverband. Der Unterschied ist am deutlichsten bei den isolierten Keratinozyten zu beobachten. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte durch DAPI (blau). Der Maßstab entspricht 50 μm .

Eine weitere Methode zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens von Zellen ist die Messung des Zellzyklus. Das aktuelle Zellzyklusstadium lässt sich anhand des DNA-Gehalts mittels Durchflusszytometrie nach Propidiumjodid-Färbung bestimmen. Zunächst war es wichtig, den Zellzyklus im epidermalen Modell zu bestimmen, um einen Vergleich mit dem Melanommodell vornehmen zu können. Der Zellzyklus wurde aus Biopsaten frisch isolierter Keratinozyten zur näheren Beschreibung des epidermalen Modells in Bezug auf die Vergleichbarkeit der Zellzyklen mit der *in vivo* Situation der Epidermis sowie mit der zweidimensionalen Zellkultur primärer Keratinozyten bestimmt. Nach Passage 0, 1 und 2 sowie nach dreidimensionaler Reifung des artifiziellen epidermalen Modells wurde ebenfalls eine Zellzyklusanalyse durchgeführt (Abbildung 4-13). Parallel wurden Zytospots zur histologischen Beurteilung angefertigt. Beim Vergleich des Zellzyklus der unterschiedlichen Kulturbedingungen zur *in vivo* Situation wird deutlich, dass es in allen Passagen der zweidimensionalen Kultur zu einem signifikanten Abfall in der G0/1 sowie zu signifikanten Anstiegen der S und G2/M Phase gegenüber der *in vivo* Situation kommt. Der größte Unterschied der Zellzyklen war für die Passage 1 nachweisbar. Das epidermale Modell gleicht sich im Zellzyklusverhalten wieder stark der natürlichen Epidermis an. Lediglich für die S-Phase war noch eine leichte Erhöhung im Vergleich zu den frisch isolierten Zellen nachweisbar. Die histologische Betrachtung der Zytospots zeigt eine Veränderung der Zellen von der Isolation über die zweidimensionale Kultivierung hin zum Modell. Nach der Isolation aus der Epidermis sind die Zellen deutlich kleiner als nach dem Ablösen aus der zweidimensionalen Kultur, dafür ist die Größenverteilung homogener als bei den zweidimensionalen Kulturen. Das Herauslösen der Zellen aus dem artifiziellen Gewebeverband führt zu Zellen mit leicht ungleichmäßigem Erscheinungsbild des Cytoplasmas im Vergleich zur zweidimensionalen Kultur. Die Zellen aus den dreidimensionalen Modellen sind weniger rund und einheitlich als bei den Passagen.

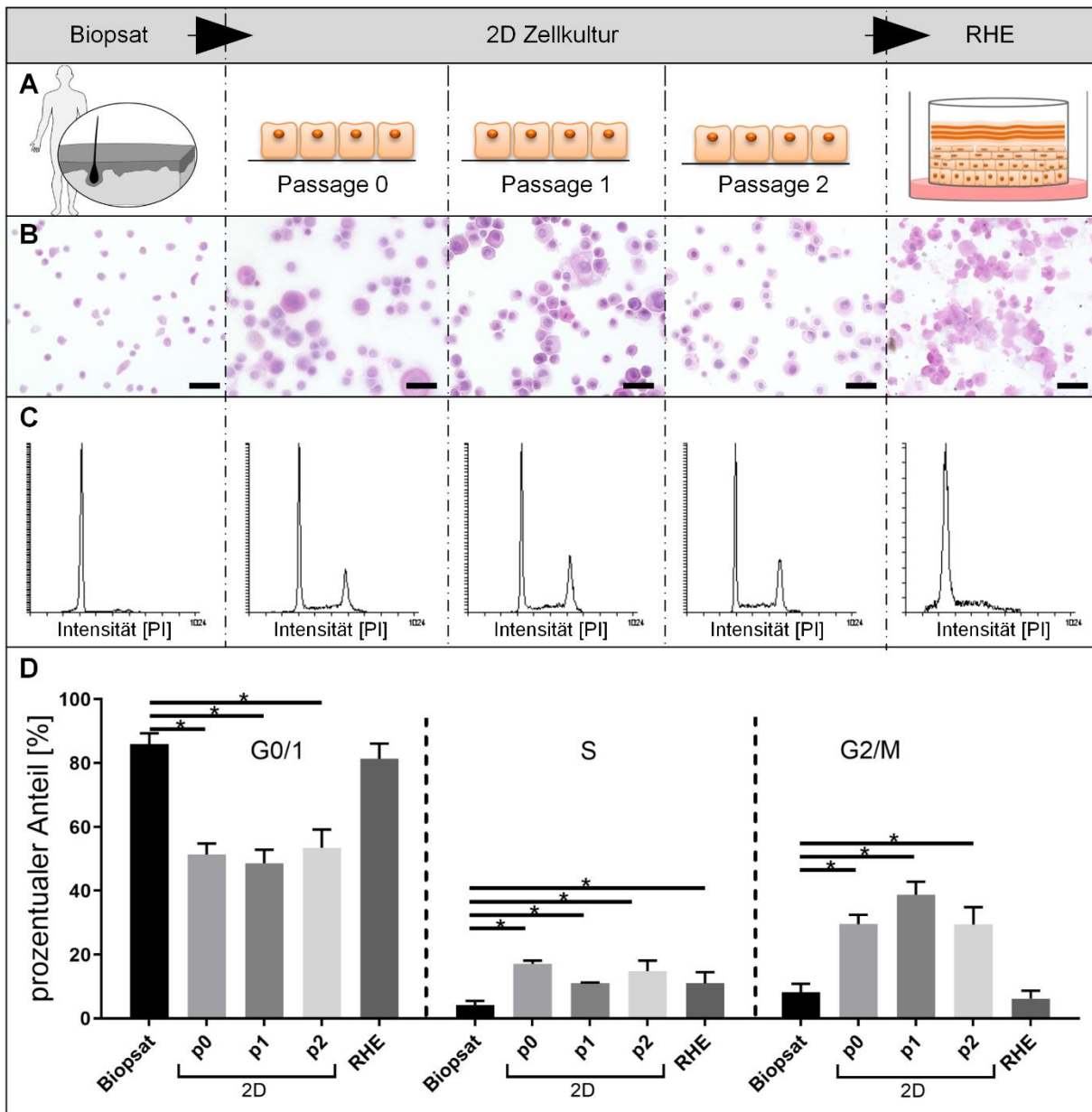


Abbildung 4-13: Zellzyklus Analyse von Keratinozyten in unterschiedlichen Kultivierungsstadien (A) Schematische Darstellung der Kultivierungsstadien sowie (B) exemplarische Zytospots und (C) Zellzyklusanalysen des jeweiligen Stadiums. (D) Das Diagramm zeigt die Zellzyklusphasen G0/1, S und G2/M für Keratinozyten aus Biopsaten, in der zweidimensionalen Kultivierung der Passagen 0-2 (p0, p1, p2) und nach Isolierung aus epidermalen Modellen (RHE). Der Maßstab entspricht 50 μ m.

Untersucht wurde der Zellzyklus der Melanomzellen nach Kultivierung in zweidimensionaler Kultur und nach dreidimensionaler Kultivierung im epidermalen Melanommodell, um zu prüfen, ob sich die Unterschiede im Zellzyklusverhalten, die sich durch die Kultivierung von Keratinozyten in einer dreidimensionalen Umgebung ergeben, auch auf Melanomzellen auswirken (Abbildung 4-14). Während es bei den Zelllinien MM96L und SKMEL28 in allen drei Phasen zu einer statistisch signifikanten Veränderung zwischen zwei- und dreidimensionaler Kultivierung kommt, sind bei der

Linie A11 zwar gleiche Tendenzen zu erkennen, jedoch führen diese nur zu leichten Unterschieden, die keine Signifikanz aufweisen.

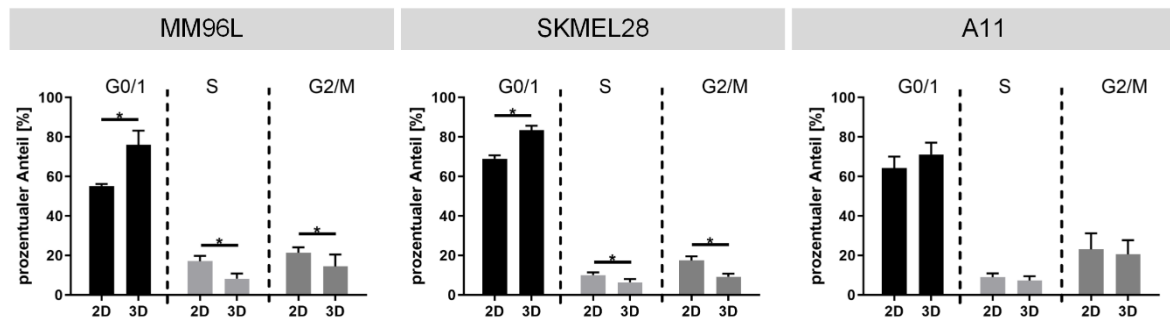


Abbildung 4-14: Unterschiede des Zellzyklus von Melanomzellen in zweidimensionaler (2D) zu dreidimensionaler (3D) Kultur

Die Diagramme zeigen die prozentualen Verhältnisse der Zellzyklusphasen G0/1, S und G2/M der Melanomzelllinien MM96L, SKMEL2 sowie A11 nach zwei- sowie dreidimensionaler Kultivierung.

4.2.2. Monitoring des Glukosemetabolismus

Zur Visualisierung von Tumorgewebe im dreidimensionalen Umfeld wird *in vivo* häufig der veränderte Stoffwechsel von malignen Zellen herangezogen. Durch markierte Glukose (in der Klinik häufig radioaktiv) kann das maligne Gewebe innerhalb des Körpers lokalisiert werden. Da über histologische Schnitte optisch nur ein geringer Teil des Modells betrachtet werden kann, sollten die malignen Strukturen des Modells über eine Visualisierung der Stoffwechselprozesse dargestellt werden, um sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen treffen zu können. Mithilfe des fluoreszenzmarkierten Desoxyglukose-Analogons 2-Deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose (2-NBDG) wurde die Glukoseaufnahme der Zellen und der dreidimensionalen Gewebeäquivalente untersucht (Abbildung 4-15). Zunächst wurde in der zweidimensionalen Kultur die optimale Inkubationszeit ermittelt. Dazu wurden nach Aufnahme des 2-NBDG durch die Zellen durchflusszytometrische Analysen durchgeführt (Abbildung 4-15 B'). Nach 15- und 60-minütiger Inkubationszeit konnte für die Kontrolle, sowohl bei allen Melanomzellen als auch bei den Keratinozyten, ein zeitabhängiger Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden. Bei den Zelllinien MM96L und A11 kam es bereits nach 15 Minuten zu einer im Vergleich zu den Keratinozyten deutlich verstärkten Fluoreszenzintensität. Nach dieser Inkubationszeit war jedoch bei der Zelllinie SKMEL28 noch keine Verstärkung gegenüber den Keratinozyten zu beobachten. Diese trat erst nach 60-minütiger Inkubationszeit auf. Nachfolgend wurde deshalb für alle weiteren Versuche eine

Inkubationszeit von 60 Minuten gewählt. Während in den Zelllinien SKMEL28 und MM96L die Gesamtpopulation homogen mehr Glukose verstoffwechselt, kommt es sowohl bei den Keratinozyten als auch bei der Zelllinie A11 zur Ausbildung von zwei Peaks. Neben durchflusszytometrischen Versuchen kann die Aufnahme der Glukose in die Zellen auch mikroskopisch betrachtet werden. Nach 60-minütiger Inkubation ist in mikroskopischen Aufnahmen die gesteigerte Fluoreszenzintensität der Melanomzellen gegenüber der Keratinozyten deutlich ersichtlich. In den Gewebeäquivalenten ist ein gesteigerter Glukosemetabolismus ausschließlich bei den Melanommodellen zu beobachten. Sowohl mikroskopisch als auch durchflusszytometrisch ist nur ein sehr schwaches Signal detektierbar (Abbildung 4-15 C und C'). Bei allen drei Melanommodellen zeigt sich jedoch eine deutliche Verschiebung der Intensitäten. Zudem ist erkennbar, dass es zur Bildung von unterschiedlichen Populationen kommt und die Zellen sehr heterogen Glukose aufnehmen. Im Vergleich dazu zeigen die isolierten Keratinozyten nur eine Population und damit verbunden einen homogenen Glukosemetabolismus. Bei den Melanommodellen der Zelllinien MM96L und SKMEL28 wird bei mikroskopischer Betrachtung deutlich, dass einzelne stoffwechselaktive Areale über das Modell hinweg verteilt vorliegen. Bei der Melanomlinie A11 hingegen kommt es zu einer gleichmäßigeren Verteilung der aktiven Bereiche über das gesamte Modell.

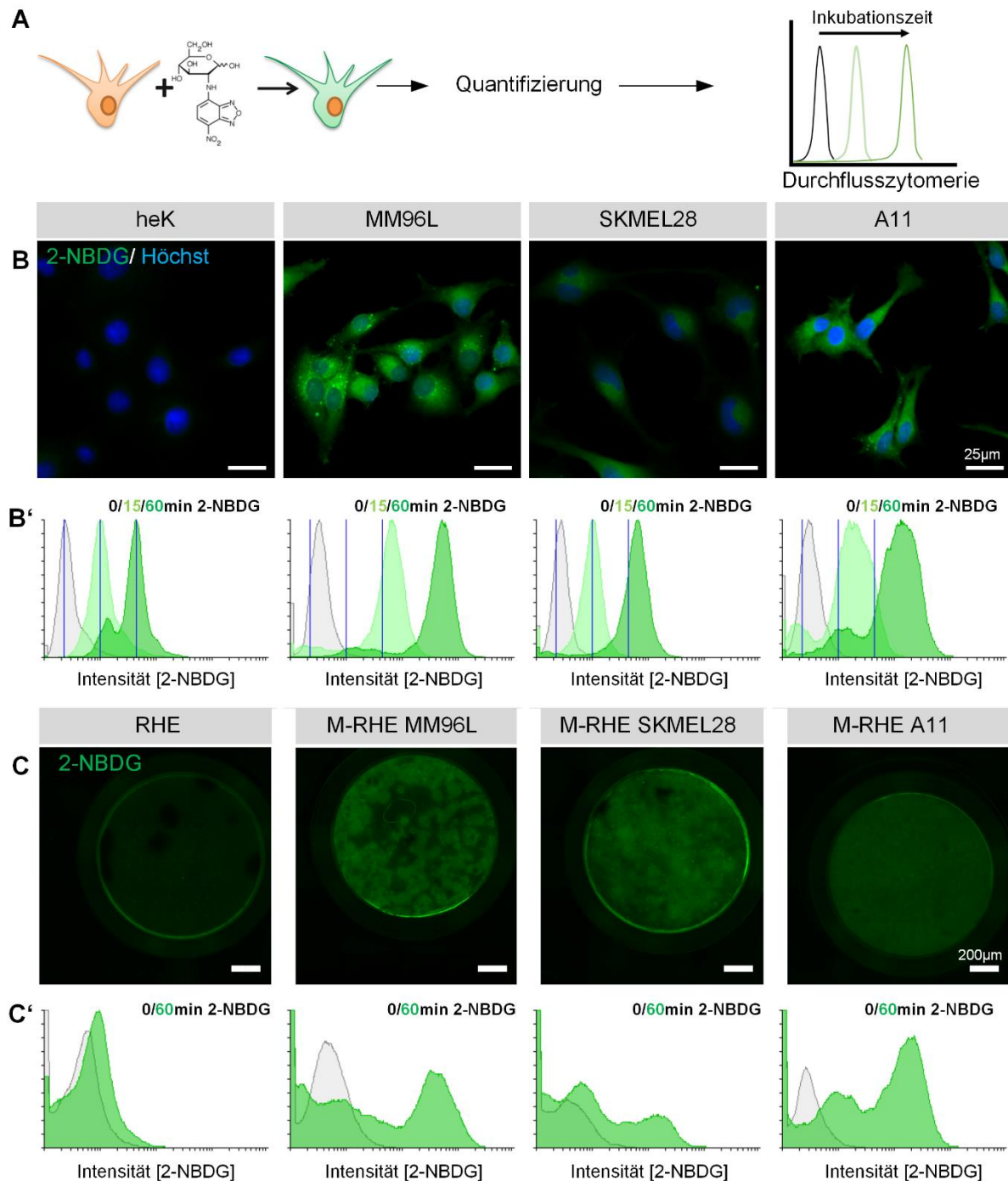


Abbildung 4-15: Monitoring des Glukosemetabolismus durch das fluoreszenzmarkierte Desoxyglukose-Analogon 2-Deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose (2-NBDG).

(A) Schematische Darstellung der Aufnahme des fluoreszierenden Glukoseanalogons. (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Keratinozyten sowie der Melanomzelllinien SKMEL28, MM96L und A11 nach 60-minütiger Inkubation von 2-NBDG (grün). Die Zellkerne wurden mittels Vitalfarbstoff Höchst (blau) markiert. (B') Durchflusszytometrische Analysen nach 15- und 60-minütiger Inkubation der Zellen mit 2-NBDG. In blau sind jeweils die maximalen Fluoreszenzen der einzelnen Inkubationszeiten der Keratinozyten dargestellt, um eine Verstärkung des Signals in der Graphik deutlich zu machen. Der Maßstab entspricht 25 µm. (C) Mikroskopische Aufnahmen der Gewebeäquivalente nach 60-minütiger Inkubation von 2-NBDG. (C') Das Diagramm zeigt durchflusszytometrische Analysen der unbehandelten und 2-NBDG behandelten Modelle nach Isolation der Zellen.

4.2.3. Etablierung eines nicht-invasiven Messverfahrens zur Testung der Hautbarrierefunktion

Die Überprüfung der Barrierefunktion von *in vitro* generierten Hautäquivalenten ist zum einen notwendig, um die Qualität der Modelle überprüfen zu können, zum anderen, um die Wirkung topisch applizierter Substanzen richtig beurteilen zu können. Innerhalb dieser Arbeit sollte aus diesen Gründen eine Messmethode zur nicht-invasiven Bestimmung der Hautbarriere etabliert werden. Die Bestimmung des transepidermalen Wasserverlusts ist ein Verfahren, das *in vivo* zur Messung der Hautbarriere bereits angewandt wird, jedoch bisher nicht zur Messung von Hautäquivalenten *in vitro* einsetzbar ist. Das Prinzip beruht auf der Messung eines Wasserverdampfungsgradienten über der Hautoberfläche mittels einer senkrecht positionierten Sonde. Die Sonde besteht aus einem offenen Zylinder, der zwei Hygrosensoren enthält, die mit zwei Thermistoren verbunden sind, die in verschiedenen Abständen von der Hautoberfläche angeordnet sind. An beiden Punkten werden die lokale relative Feuchte und die Temperatur gemessen und der entsprechende Dampfdruck berechnet. Der Unterschied zwischen dem Dampfdruck an beiden Punkten entlang des Gradienten steht in direkter Beziehung zu der Geschwindigkeit des Verdunstungswasserverlustes. Die Ergebnisse werden in Gramm pro Quadratmeter pro Stunde ausgedrückt.

$$Dm/Dt = -D \cdot A \cdot dp/dx$$

A = Fläche [m²]

m = transportiertes Wasser [g]

t = Zeit [h]

D = Diffusionskonstante [= 0.0877 g/m(h(mmHg))]

p = Wasserdampfdruck der Atmosphäre [mm Hg]

x = Entfernung zwischen Hautoberfläche und Messpunkt [m]

In Zusammenarbeit mit der Firma Courage und Khazaka electronic GmbH (Köln, (D)) war es möglich, nach einer CAD-Konstruktion und Anpassung der bereits bestehenden *in vivo* und *ex vivo* Methoden auf das *in vitro* Modell eine Messplatte zu entwickeln, mit der eine parallele Analyse von zwölf *in vitro* Epidermismodellen ermöglicht wird (vgl. Abbildung 4-16). Die Messplatte besteht aus drei Sensorplatinen, die so an der

Messplatte installiert sind, dass sie in jedes Insert hineinragen und mit einem genau definierten Abstand von der artifizierten Epidermis entfernt sind. Jede Platine besteht aus vier Sensoren. Die Messplatte ist geometrisch an eine 12-Well Platte angepasst und kann nur in einer Ausrichtung auf die Platte gesetzt werden. Dies gewährleistet eine reproduzierbare Messung der Modelle an verschiedenen Analysetagen bzw. zwischen verschiedenen Tests.

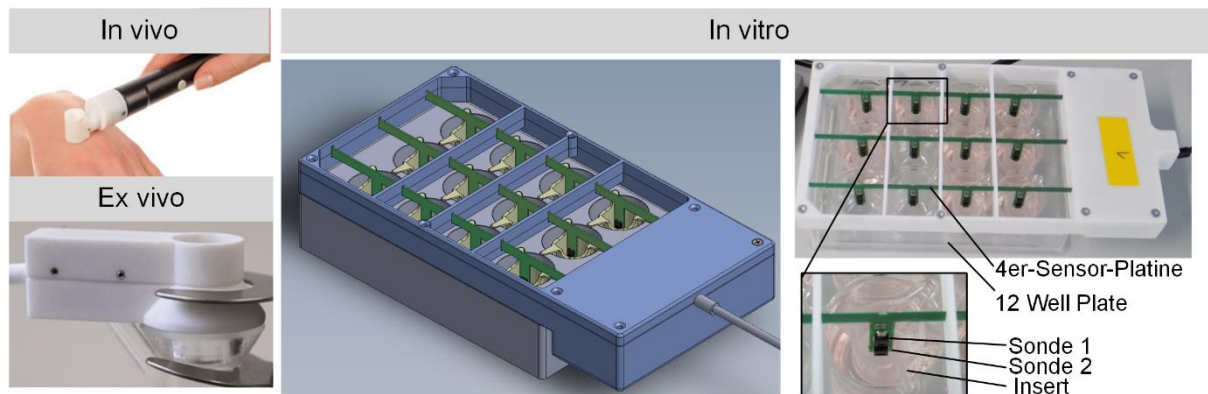


Abbildung 4-16: Technische Umsetzung eines Messaufbaus zur Bestimmung des TEWL *in vitro*
Darstellung der CAD-Konstruktion sowie technische Umsetzung dieser zu einer Messplatte für die Durchführung von Messungen des TEWL *in vitro*.

Die Impedanzspektroskopie bietet die Möglichkeit, durch die Messung über einen bestimmten Frequenzbereich ein Impedanzspektrum zu erzeugen, welches sich in einem Bode-Diagramm, indem die Frequenz gegen die Phase aufgetragen wird, darstellen lässt (Abbildung 4-17). Die stärkste Korrelation von Impedanz und TEWL-Wert ergibt sich bei einer Frequenz von 1000 Hz, gemessen am Korrelationskoeffizienten nach Pearson („r“). Dieser beträgt -0,7531 für 12,5 Hz, -0,8080 für 100 Hz bzw. -0,8709 für 1000 Hz. Auch das Bestimmtheitsmaß R^2 verhält sich ähnlich. Es zeigte mit einem Wert von 0,7585 bei 1000 Hz die Regressionsgleichung mit der besten Approximation an die gemessenen Daten im Vergleich zu 0,5671 bei 12,5 Hz und 0,6529 bei 100 Hz.

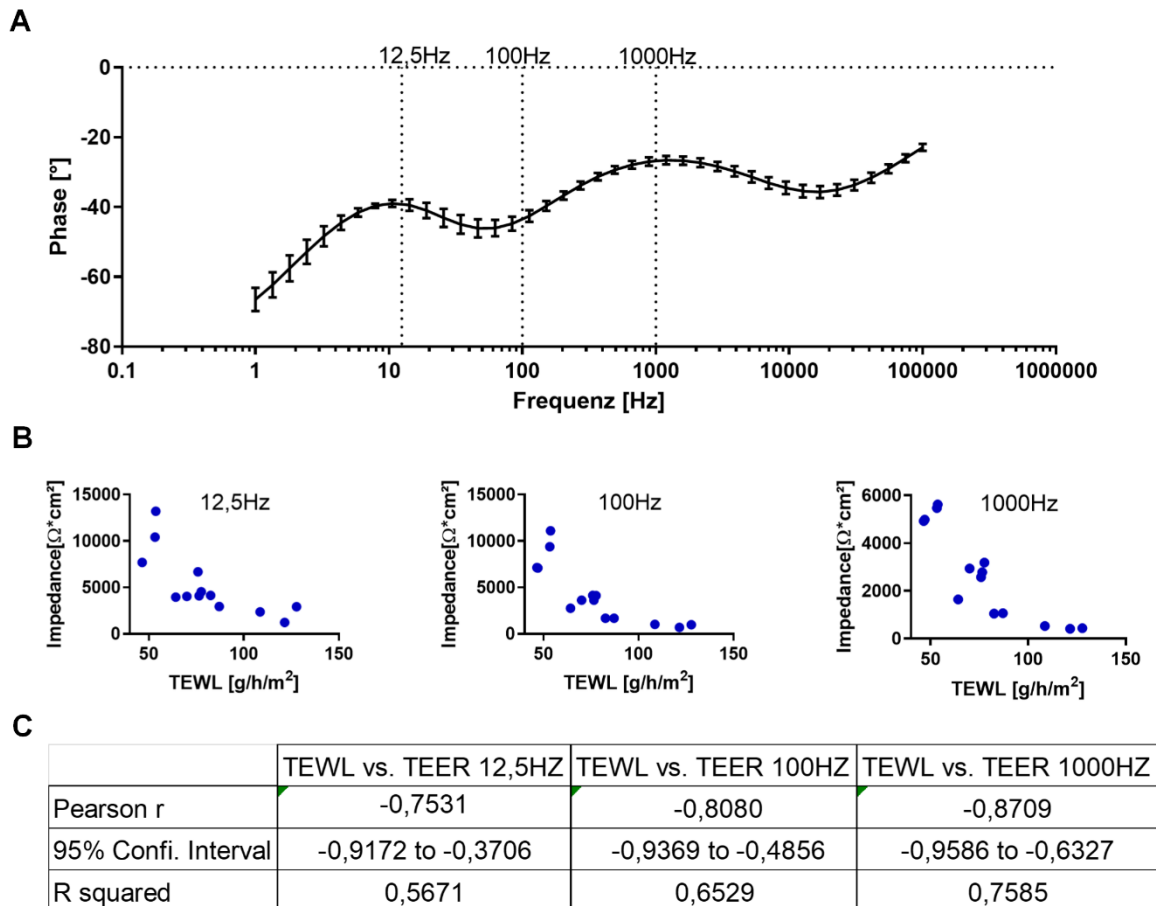


Abbildung 4-17: Etablierung der *in vitro* Messung des transepidermalen Wasserverlusts (TEWL)
 (A) Dargestellt ist das Diagramm einer impedanzspektrometrischen Messung eines *in vitro* Epidermismodells. Bei der Auftragung der Frequenz gegen die Phase ergeben sich 2 Maxima bei ca. 10 und 1000 Hz. Die Korrelation zwischen der Impedanz bei 12,5, 100 bzw. 1000 Hz und dem TEWL-Wert ergibt die beste Übereinstimmung bei 1000 Hz. Die Korrelation ist als Diagramm (B) und auch in tabellarischer Form (C) dargestellt.

Beim Vergleich der etablierten impedanzspektrometrischen Messung bei 1000 Hz mit der neuentwickelten *in vitro* TEWL-Analyse über einen Zeitraum von 35 Kulturtagen zeigt sich ein ähnlicher Verlauf der beiden Kurven (Abbildung 4-18 A). Bis Tag 20 steigt die Impedanz an bzw. der TEWL-Wert fällt ab. Ab Tag 22 nimmt die Standardabweichung beider Parameter stark zu. Es kommt zu einem sprunghaften Anstieg des TEWL-Werts und zum Abfall der Impedanz. Die Überprüfung der Methode zur Bestimmung der Barriereigenschaften wurde durch eine 2- bzw. 5-minütige Acetonbehandlung der epidermalen Modelle vorgenommen (Abbildung 4-18 B). Zwei Tage nach der Behandlung ist ein Anstieg des TEWL-Wertes im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen messbar. Nach 5 Tagen ist dieser bereits rückläufig. Im Vergleich zu der Kontrolle weisen die behandelten Modelle jedoch weiterhin einen erhöhten Wert auf. Ein Einfluss der Messung auf vitale Zellschichten konnte durch die

Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen durch einen MTT-Assay ausgeschlossen werden (Abbildung 4-18 C).

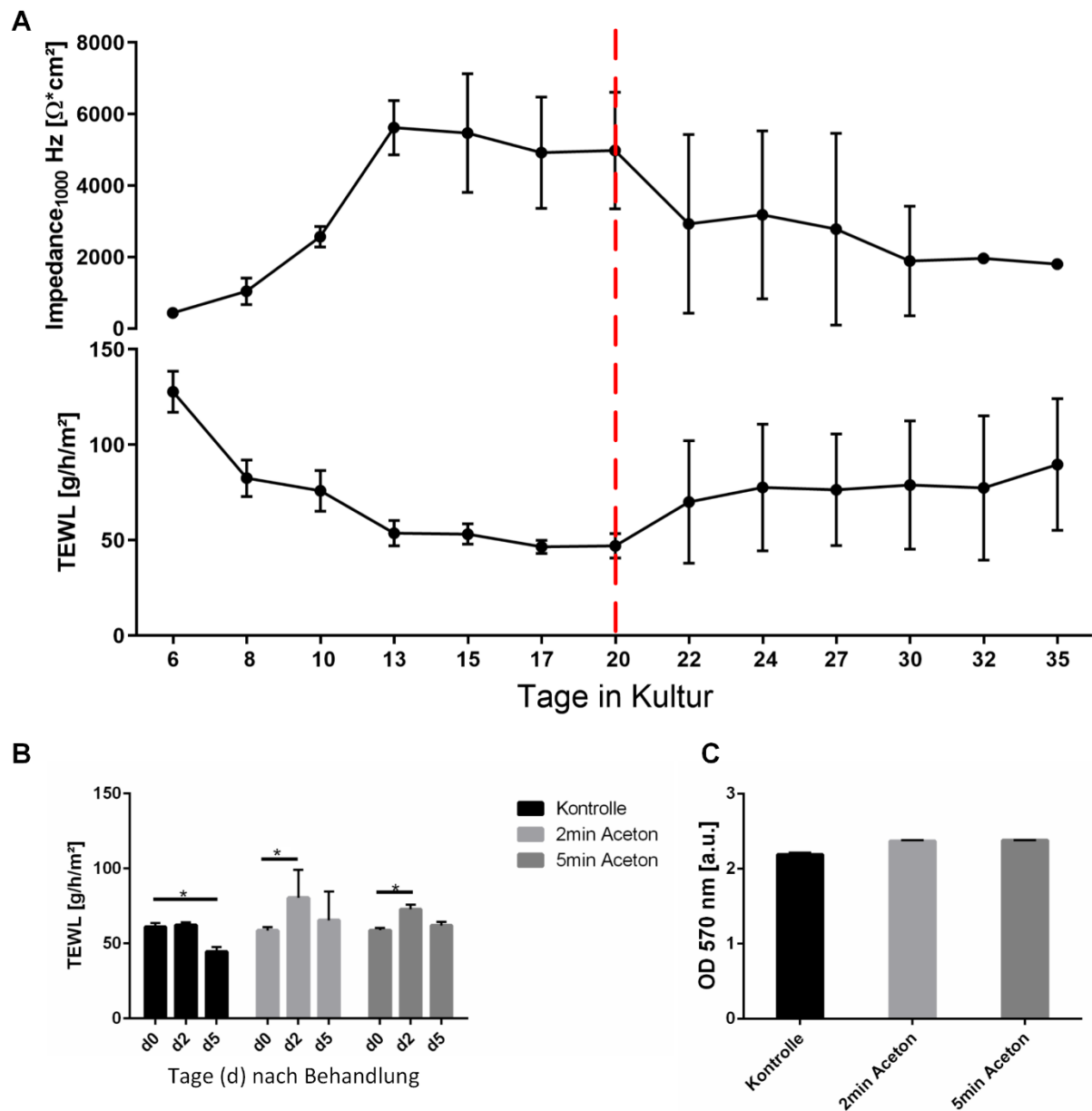


Abbildung 4-18: Vergleich der Impedanzspektroskopie mit dem TEWL

(A) Messung der Impedanz bei 1000 Hz und des TEWL-Werts über einen Zeitraum von 35 Kulturtagen. Bis Tag 20 steigt die Impedanz bzw. fällt der TEWL-Wert. Ab Tag 22 nimmt die Standardabweichung beider Parameter stark zu, es kommt zu einem Anstieg des TEWL-Werts und zum Abfall der Impedanz. (B) Nach Acetonbehandlung der epidermalen Modelle kommt es im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zu einem Anstieg des TEWL-Werts, der sich jedoch über die Zeit wieder zurückbildet. (C) Es entsteht kein Einfluss auf die Viabilität durch die Behandlung, die durch einen MTT-Assay ermittelt wurde.

Die Messung der Impedanz bei 1000 Hz und die Bestimmung des TEWL-Werts ergeben keine statistischen Unterschiede zwischen Epidermismodellen und Melanommodellen der Linien A11, MM96L und SKMEL28 (Abbildung 4-19).

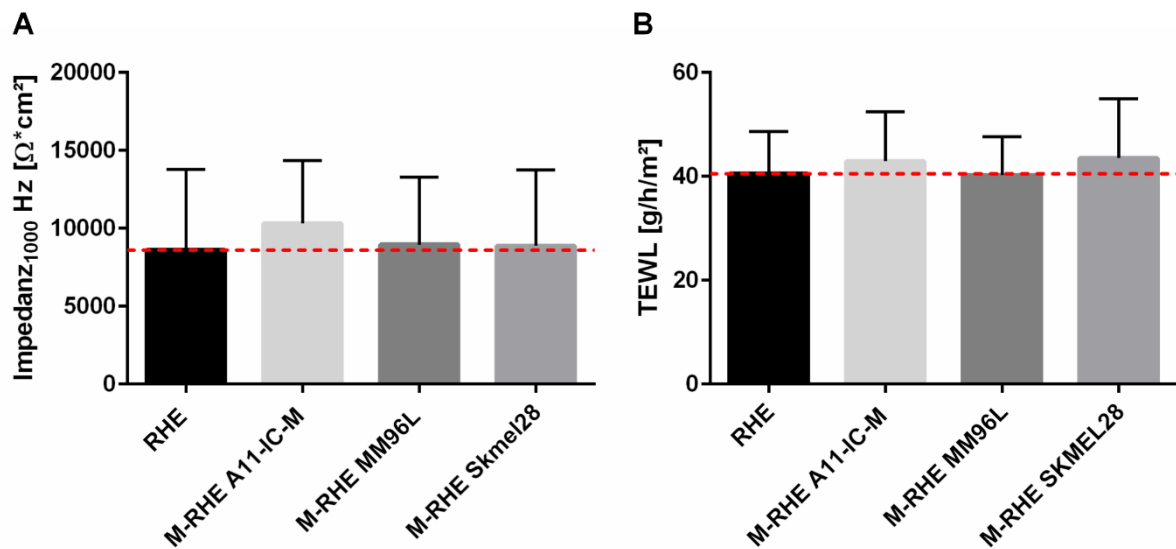


Abbildung 4-19: Messung der Hautbarriere von epidermalen (RHE) sowie Melanommodellen

(A) Die impedanzspektrometrische Untersuchung bei 1000 Hz ergibt keine Unterschiede zwischen dem Epidermismodell zu den 3 Melanommodellen. (B) Die Messung des transepidermalen Wasserverlusts führt zu keinen statischen Änderungen nach der Integration von Melanomzellen in das epidermale Modell.

4.3. Testung von Tumortherapeutika an Gewebeäquivalenten

Die in Abschnitt 4.1 entwickelten epidermalen Melanommodelle sollen nun anhand des zielgerichteten Tumortherapeutikums Vemurafenib auf ihre Eignung als Testsystem zur Medikamentenentwicklung evaluiert werden. Im Anschluss erfolgt die Implementierung des Modells in die präklinische Therapieentwicklung zur Testung neuartiger Tumortherapeutika durch den Einsatz der Patientenzelllinie MUG-Mel2 und des Wirkstoffkandidaten B-B-dimethylacrylshikonin (DMAS).

4.3.1. Validierung des Testsystems durch ein etabliertes Tumortherapeutikum

Das beim Melanom etablierte Tumortherapeutikum Vemurafenib ist ein RAF-Inhibitor, der bei Zellen mit BRAF^{V600E} Mutation einen initialen G1-Zellzyklus-Arrest gefolgt vom konsekutiven Zelltod bewirkt.

Durch die Verwendung von Melanomzelllinien mit BRAF^{V600E} Mutation und ohne Mutation dieses Gens zur Herstellung der Gewebeäquivalente konnte der Einfluss des BRAF Inhibitors Vemurafenib untersucht werden. Zeitgleich war es möglich, den unterschiedlichen Einfluss in Abhängigkeit von der Kultivierungsform zu beobachten. Daher wurden nicht nur die Gewebemodelle untersucht, sondern auch die zweidimensionale Monokultur der Melanomzellen sowie der physiologischen Zellen der Haut, der Keratinozyten und der Fibroblasten. Dabei fand nach Behandlung der Zellen und Gewebeäquivalente für 72 Stunden mit dem Medikament eine anschließende Ermittlung der Wirkung statt (Abbildung 4-20). Dazu kamen unterschiedliche Techniken zum Einsatz. Neben der metabolischen Aktivität über einen MTT-Assay erfolgten eine Zellzyklusanalyse, eine Betrachtung des Glukosemetabolismus sowie eine Ki67 Färbung.

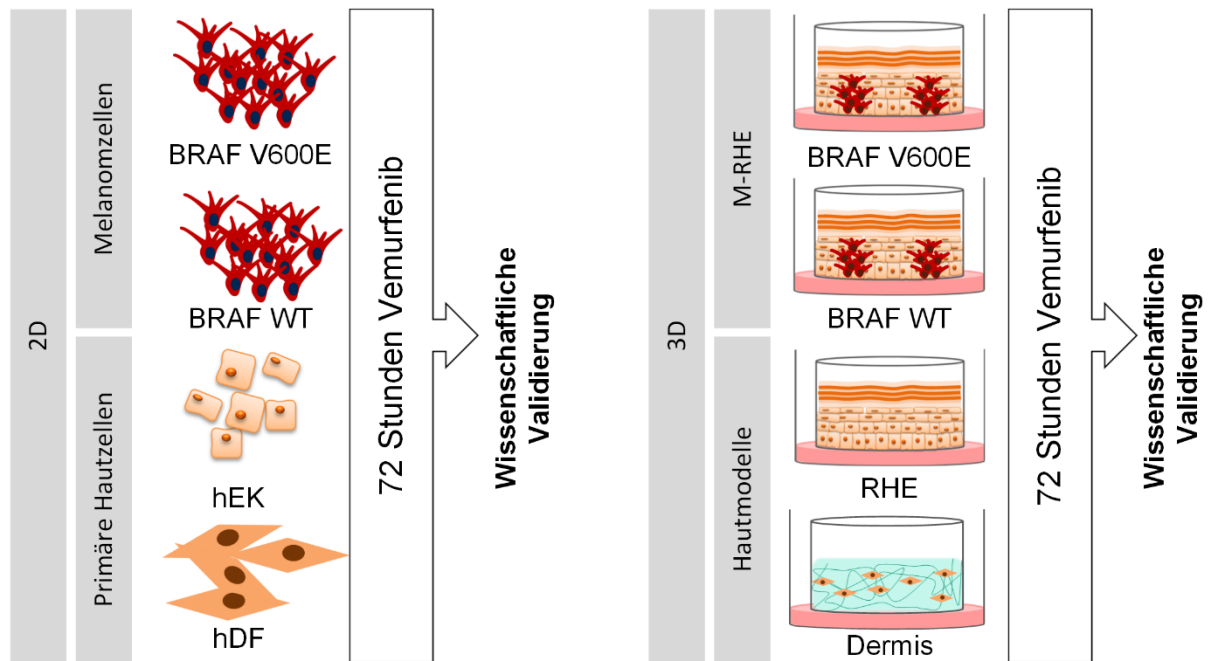


Abbildung 4-20: Schema zur Durchführung der Validierung des Testsystems durch das etablierte Tumorthapeutikum Vemurafenib

Nach 72-stündiger Vemurafenib-Behandlung der Zellen als zweidimensionale bzw. dreidimensionale Kultur findet eine Validierung mit unterschiedlichen Techniken statt.

Tests zur Messung der Proliferation, der Viabilität und der Zytotoxizität werden üblicherweise verwendet, um die Reaktion von Zellen in Kultur nach Behandlung mit verschiedenen Stimuli zu überwachen. Die metabolische Aktivität von Zellen lässt sich mittels MTT, einem gelben Tetrazolium Salz, welches von vitalen Zellen zu Formazan reduziert wird, bestimmen. Diese Bestimmung dient zur Berechnung der prozentualen Viabilität der Zellen in Bezug zu einer Negativkontrolle und sollte die Auswirkungen einer 72-stündigen Vemurafenib-Behandlung der Zellen als zweidimensionale beziehungsweise dreidimensionale Kultur nachweisen. Nach der Behandlung von Melanomzellen über 72 Stunden mit Konzentrationen von 0,0 μM , 0,1 μM , 0,5 μM , 1,0 μM , 5,0 μM und 10,0 μM Vemurafenib in einer zweidimensionalen Zellkultur zeigt sich bei den beiden Melanomzelllinien mit BRAF^{V600E} Mutation (SKMEL28 und MM96L) eine starke konzentrationsabhängige Abnahme der Viabilität (Abbildung 4-21 A). Zwischen 0 und 5 μM kommt es zu einem sehr starken Abfall der metabolischen Aktivität von 100% auf 44,7% \pm 5,0 für MM96L und auf 34,3% \pm 4,6 für SKMEL28. Bei einer Erhöhung der Konzentration von 5 auf 10 μM nimmt die Viabilität bei MM96L nur noch um weitere 4,3% und bei SKMEL28 um 3,5% ab. Die Melanomzelllinien A11, D08 sowie MM127 zeigen im Bereich von 0-10 μM Vemurafenib keinen Behandlungseffekt (Abbildung 4-21 A).

Die Abnahme der metabolischen Aktivität im dreidimensionalen Melanommodell von MM96L und SKMEL28 ist hingegen nach der Behandlung mit 1 μM und 5 μM Vemurafenib über 72 Stunden nur schwach, aber dennoch statistisch signifikant, nachweisbar (Abbildung 4-21 B). Bei der Linie MM96L im Melanommodell fällt der Wert bei 1 μM auf $93,2\% \pm 7,1\%$ und bei 5 μM auf $83,9\% \pm 6,3\%$. Für die Linie SKMEL28 entspricht die metabolische Aktivität nach 1 μM $97,6\% \pm 3,6\%$ und bei 5 μM $89,7\% \pm 5,3\%$. Die Behandlung mit Vemurafenib führt bei Melanommodellen mit integrierten Zellen der Linie A11 zu keiner nachweislichen Reduktion der Viabilität. Die Reaktion der physiologischen Zellen der Haut auf eine Behandlung mit Vemurafenib weist in einer zweidimensionalen Kultur von Keratinozyten einen starken Einfluss auf. Die Viabilität nimmt konzentrationsabhängig ab und erreicht bei einer Zugabe von 10 μM Vemurafenib nur noch $15,6\% \pm 12,8\%$ (Abbildung 4-21 C). Im Epidermismodell kommt es dagegen zu keiner statistisch signifikanten Veränderung der Viabilität (Abbildung 4-21 D). Bei den Fibroblasten ist weder in der zweidimensionalen noch in der dreidimensionalen Kultivierung ein Rückgang der Viabilität durch Vemurafenib nachweisbar (Abbildung 4-21 C und E).

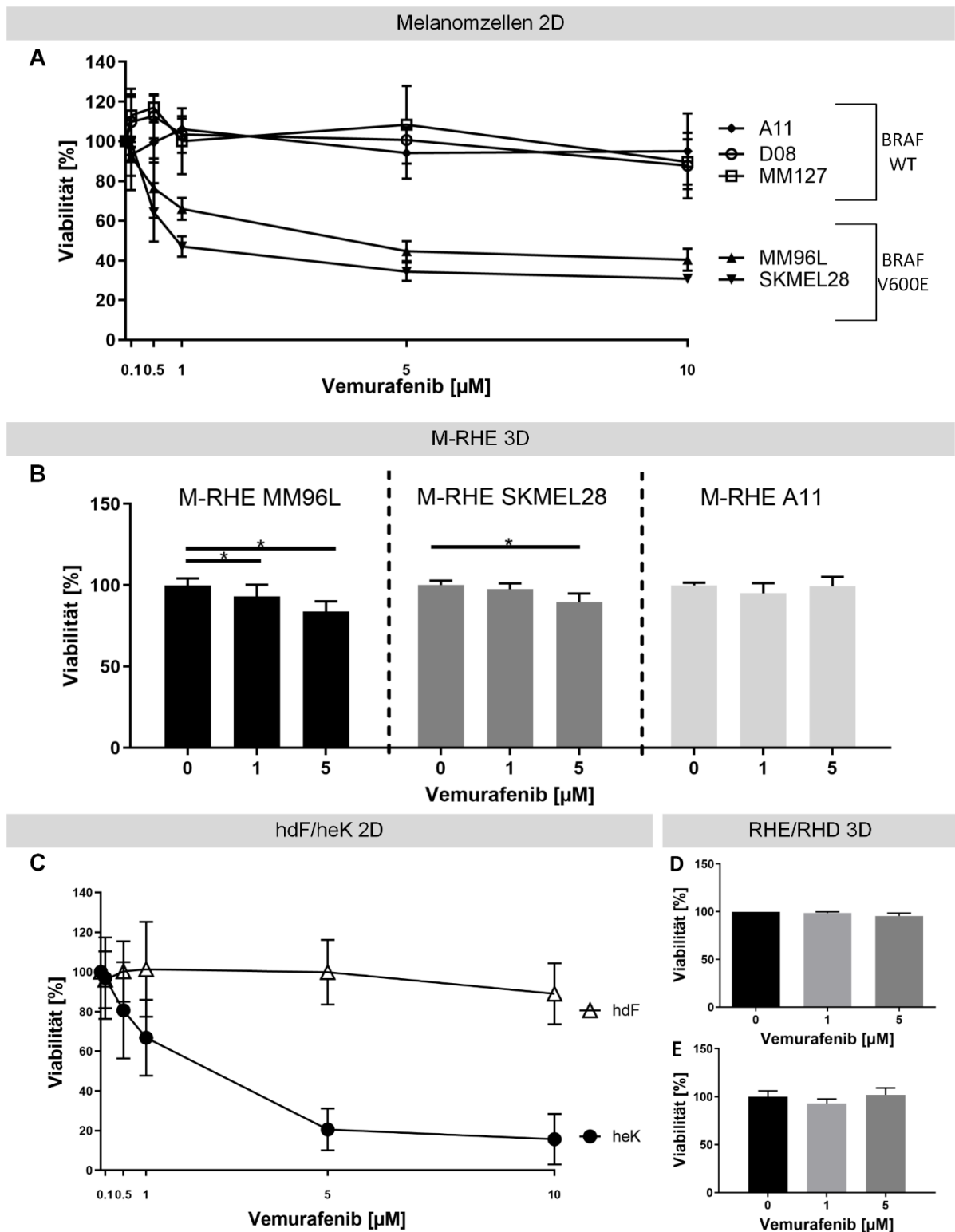


Abbildung 4-21: Einfluss des Tumortheraeutikums Vemurafenib auf die metabolische Aktivität
 (A) Bestimmung der Viabilität nach Behandlung von zweidimensionalen Monokulturen der Melanomzelllinien A11, D08, MM127, MM96L und SKMEL28. (B) Die Viabilität nach 72-stündiger Behandlung der Melanommodelle (M-RHE) der Linien MM96L, SKMEL28 und A11. (C) Das Diagramm zeigt den Einfluss der Behandlung auf Fibroblasten (hdF) und Keratinozyten (heK). (D) Dargestellt ist die Reaktion von epidermalen Modellen (RHE) und (E) dermalen Modellen (RHD) auf die Behandlung.

Die dreidimensionale Kultivierung von artifiziellem Gewebe erfordert oftmals die Verwendung von spezialisiertem Zellkulturequipment, um den Zellen ein Gerüst für die räumliche Ausrichtung bieten zu können.

Der Einfluss des dreidimensionalen Testaufbaus auf die Wirkung des Therapeutikums Vemurafenib sollte daher ausgeschlossen werden, um die Ergebnisse einer zwei- zu einer dreidimensionalen Kultur vergleichen zu können. Dazu wurden die Melanomzellen zum einen in Zellkulturinserts und zum anderen auf Standard-Zellkulturoberflächen kultiviert und im Anschluss für 72 Stunden mit Vemurafenib behandelt. Die Zugabe des Therapeutikums erfolgte wie für die Kultivierung von dreidimensionalen Gewebe nur über die Insert-Membran. Bei allen drei Zelllinien (MM96L, SKMEL28 sowie A11) war keine veränderte Wirkung in Abhängigkeit der Kultivierungsform feststellbar (Abbildung 4-21).

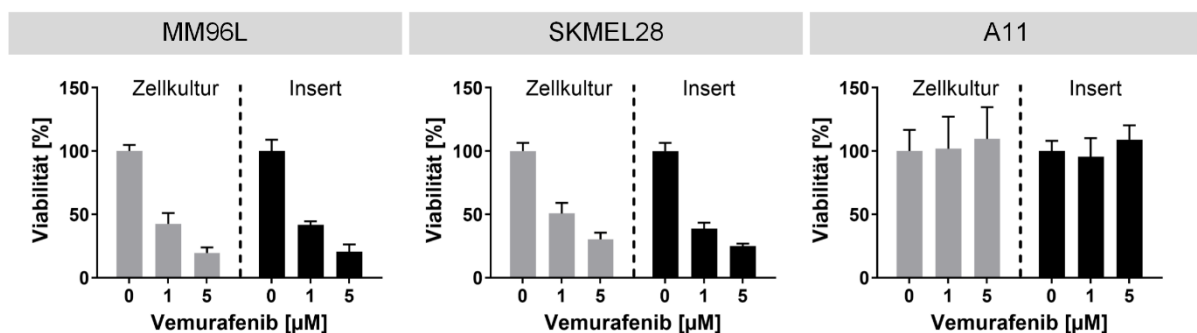
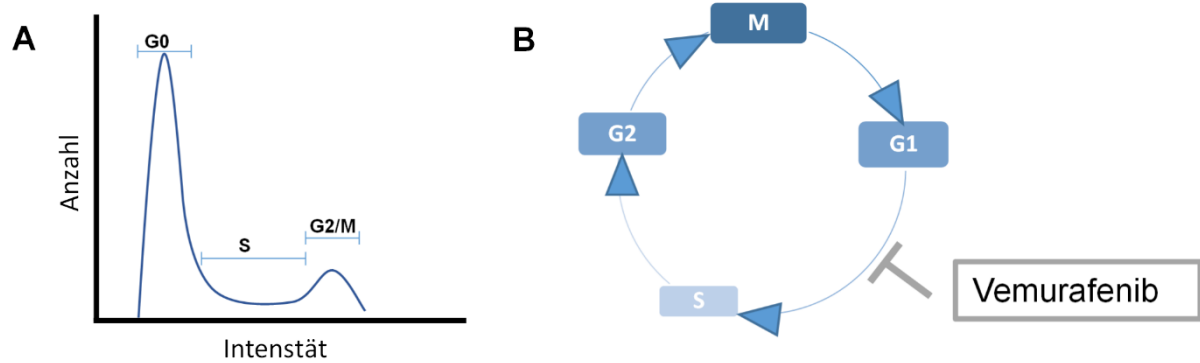


Abbildung 4-22: Einfluss des Testaufbaus auf die Wirkung von Vemurafenib

Die Zelllinien MM96L, SKMEL28 sowie A11 zeigen keine veränderte Wirkung von Vemurafenib in Abhängigkeit der Kultivierungsform von Zellkulturoberfläche oder Insert, sondern nur in Bezug auf die Konzentration.

Vemurafenib wirkt auf Zellen mit einer spezifischen Mutation im BRAF-Gen als RAF-Inhibitor und führt damit zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase. Diese Wirkungsweise lässt sich durch Anfärben der DNA mittels Propidiumjodid und die anschließende durchflusszytometrische Quantifizierung nachweisen (Abbildung 4-23). Eine 72-stündige Behandlung der Zellen mit Vemurafenib führt so zu einer Anreicherung der Zellen in der G1-Phase und Abnahme der Zellen in der G2/M Phase.

**Abbildung 4-23: Schema des Zellzyklus**

Dargestellt ist ein Histogramm des Zellzyklus nach durchflusszytometrischer Bestimmung (A) sowie der Kreis des Zellzyklus und die Stelle der inhibitorischen Wirkung von Vemurafenib (B).

Einer Anreicherung der Zellen in der G1-Phase und Abnahme der Zellen in der G2/M Phase ließ sich für beide Zelllinien mit BRAF-Mutation (MM96L und SKMEL28) konzentrationsabhängig und statistisch signifikant nach Behandlung mit Vemurafenib feststellen (Abbildung 4-24). Die Melanomzelllinie A11, die keine Mutation im BRAF-Gen trägt, zeigt nach 72-stündiger Behandlung auch keine Veränderung des Zellzyklus. Ein signifikanter Anstieg bzw. Abfall der G0 bzw. G2/M Phase war auch für Keratinozyten nachweisbar, jedoch nur für die geringe Dosis von 1 μM . Eine konzentrationsabhängige Reaktion ist nicht detektierbar.

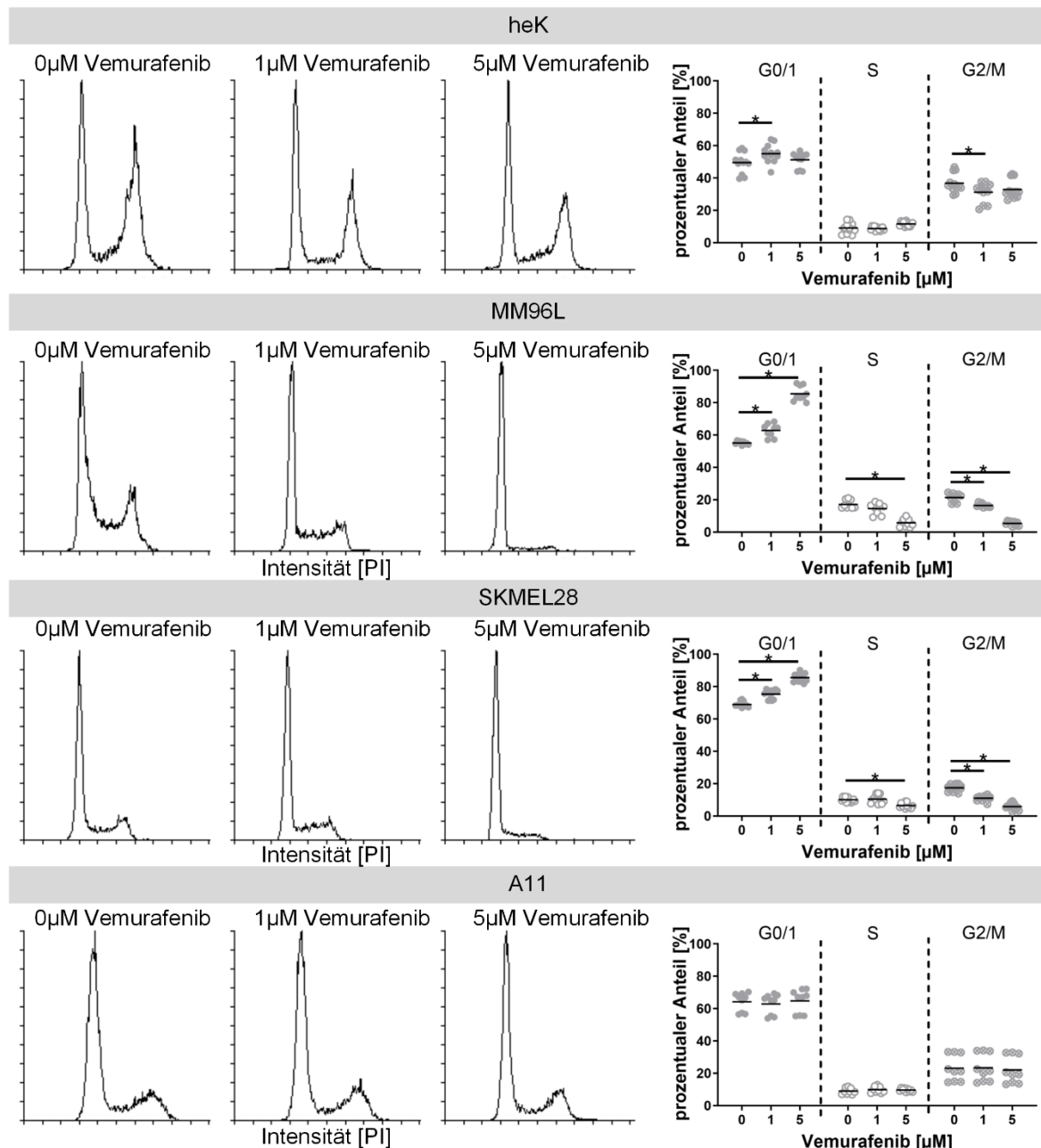


Abbildung 4-24: Zellzyklusanalyse von Melanomzellen und Keratinozyten nach Behandlung

Die durchflusszytometrische Bestimmung des Zellzyklus von Keratinozyten und Melanomzellen der Linien MM96L, SKMEL28 sowie A11 nach einer 72-stündigen Behandlung mit 0, 1, und 5 µM Vemurafenib. Dargestellt sind jeweils die prozentualen Anteile der Zellen, die sich der G0, S und G2/M Phase zuordnen lassen sowie beispielhaft ein Histogramm des Zellzyklus.

Nach Kultivierung der Melanomzellen in einer dreidimensionalen Umgebung und in Kokultur mit Keratinozyten lässt sich nur für die Zelllinie SKMEL28 ein signifikanter Anstieg der Zellen in G0 und ein signifikanter Abfall der Zellen in der G2/M Phase nachweisen. Zwar kommt es auch bei der Linie MM96L zu einer konzentrationsabhängigen Zunahme der Zellen in der G0-Phase, jedoch erweist sich dieser nicht als statistisch signifikant. Sowohl die reinen Epidermismodelle als auch

die Melanommodelle der Linie A11 sprechen nicht auf die Behandlung im Hinblick auf den Zellzyklus an (Abbildung 4-25).

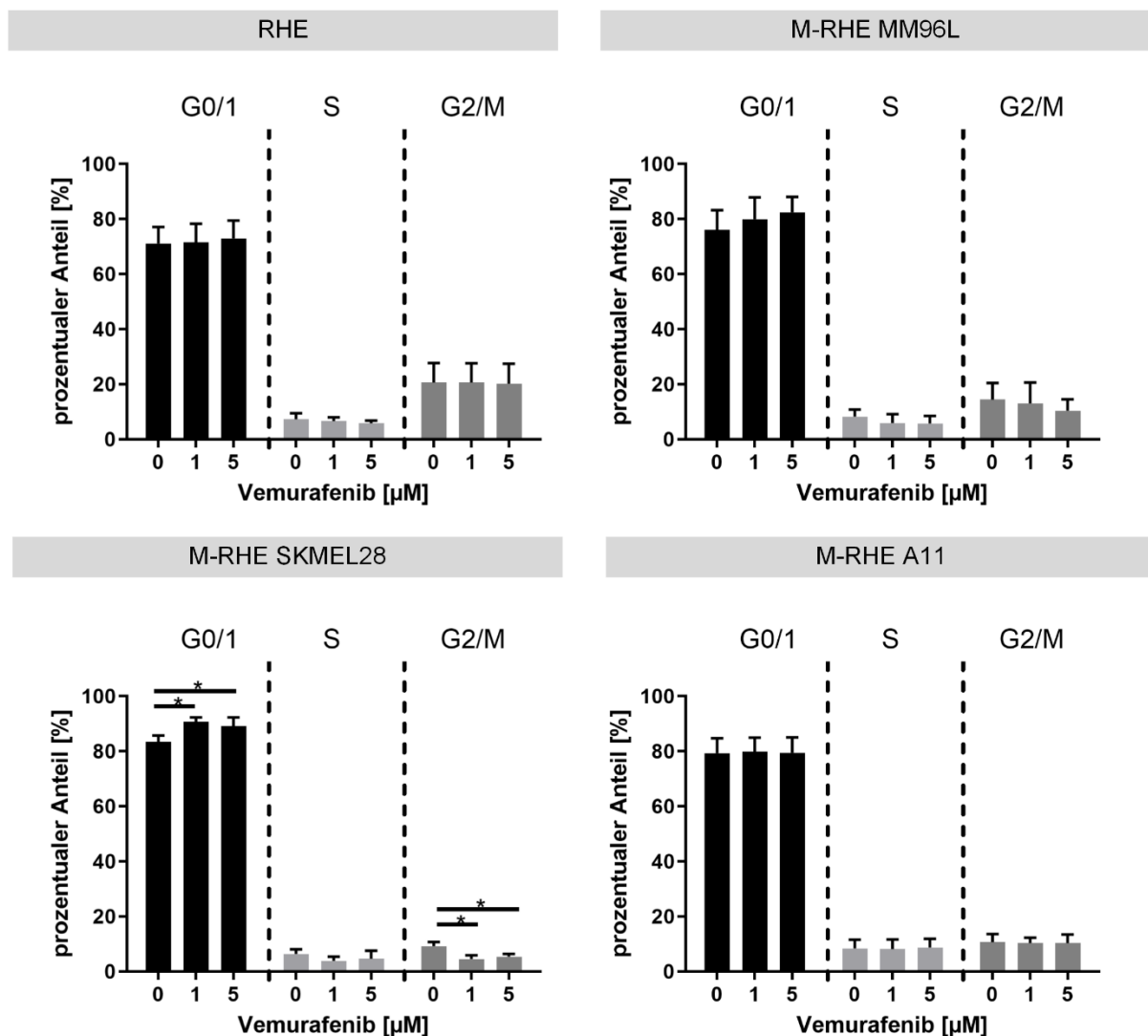


Abbildung 4-25: Zellzyklusanalyse von Epidermismodellen (RHE) und Melanommodellen (M-RHE) nach Behandlung mit Vemurafenib

Die durchflusszytometrische Bestimmung des Zellzyklus von Melanommodellen der Linien MM96L, SKMEL28 sowie A11 und von Epidermismodellen nach einer 72-stündigen Behandlung mit 0, 1, und 5 µM Vemurafenib. Dargestellt sind jeweils die prozentualen Anteile der Zellen, die sich der G0, S und G2/M Phase zuordnen lassen.

Inwiefern der Glukose- und Laktatmetabolismus von einer Behandlung betroffen ist, kann zum einen über das indirekte Messen der Parameter im Überstand erfolgen (Abbildung 4-26), auf der anderen Seite ist es durch die Verwendung des fluoreszierenden Glukoseanalogons 2-NBDG möglich, die direkte Glukoseaufnahme örtlich darzustellen und über durchflusszytometrische Analysen zu quantifizieren (Abbildung 4-27).

Die Untersuchung von Glukose und Laktat im Zellkulturüberstand von zweidimensionalen Kulturen zeigt den starken Einfluss der Behandlung auf Keratinozyten sowie die Melanomzellen MM96L und SKMEL28. Nur die Melanomzelllinie A11 zeigt keinen Rückgang der Glukoseaufnahme bzw. der Laktatproduktion (Abbildung 4-26 A und B).

Im dreidimensionalen Modell kann die Behandlung statistisch signifikant die Glukoseaufnahme und die Laktatproduktion (Abbildung 4-26 C und D) für die Melanomzellen MM96L und SKMEL28 reduzieren. Die Linie A11 zeigt auch im dreidimensionalen Modell keine Reaktion auf die Behandlung. Das dreidimensionale Epidermismodell zeigt keine signifikante Änderung, die durch eine Behandlung ausgelöst wird.

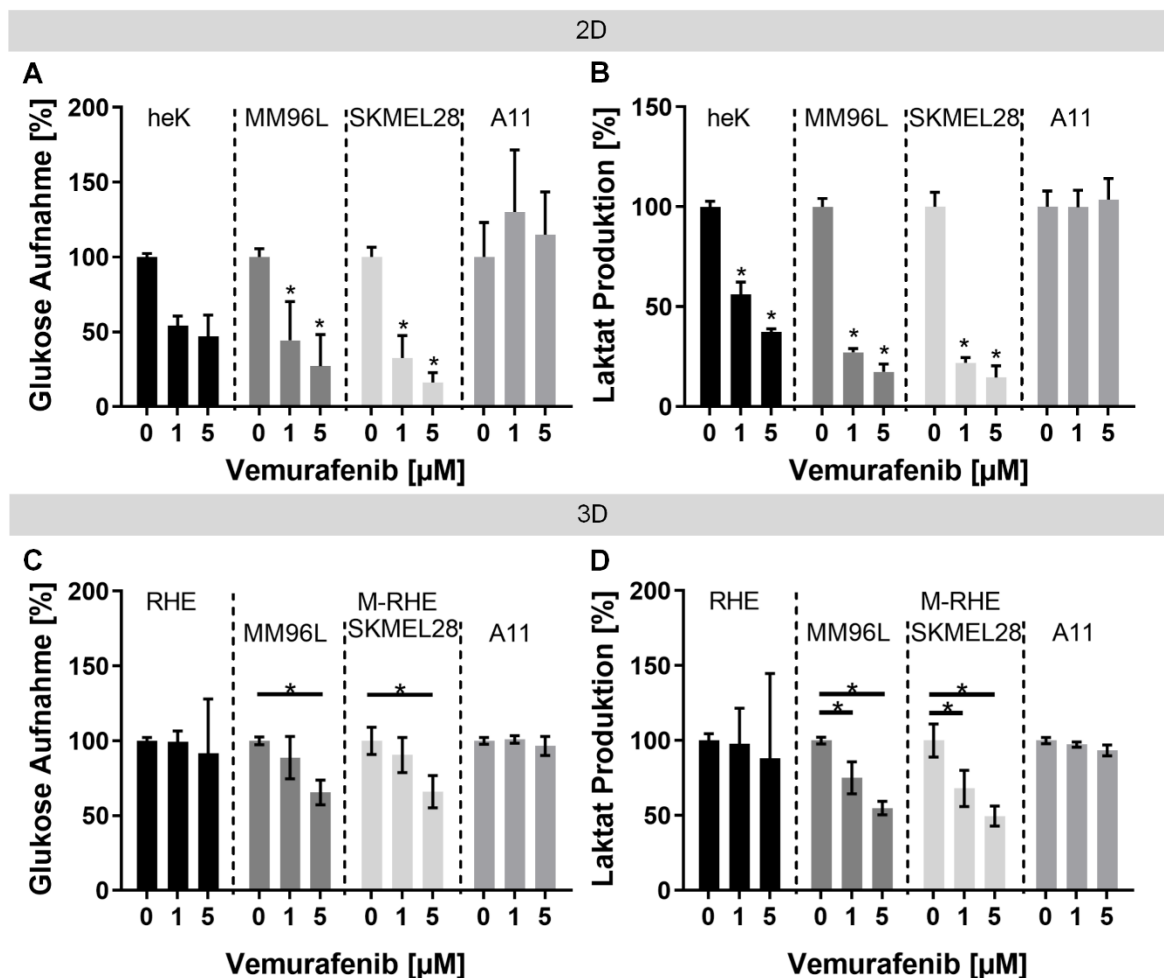


Abbildung 4-26: Glukose- und Laktatwerte gemessen im Zellkulturüberstand

Die Graphen zeigen die prozentualen Messwerte von Glukose und Laktat von zweidimensionalen (A und B) und dreidimensionalen (C und D) Kulturen in Bezug auf die jeweils unbehandelte Kontrolle.

Die direkte Aufnahme von Glukose kann über das fluoreszierende Glukoseanalogon 2-NBDG erfolgen. Dazu wird nach der 72-stündigen Behandlung eine 60-minütige Inkubation mit 2-NBDG durchgeführt und im Anschluss die Aufnahme mikroskopisch untersucht oder die Zellen aus dem Gewebeverband gelöst und die Aufnahme durchflusszytometrisch quantifiziert (Abbildung 4-27).

Bei den Melanommodellen der Linien MM96L und SKMEL ist in den mikroskopischen Aufnahmen sowohl eine inhomogene Verteilung der metabolisch aktiven Bereiche zu sehen als auch der Rückgang der metabolischen Aktivität nach der Behandlung. Die epidermalen Modelle zeigen nach einer 60-minütigen Inkubation mit 2-NBDG kaum eine nachweisbare Fluoreszenz. Bei Melanommodellen der Linie A11 hingegen sind die aktiven Areale homogen über das Modell verteilt und weisen keinen Rückgang der Fluoreszenzintensität nach der Behandlung auf (Abbildung 4-27 A).

Dieser Eindruck wurde durch die Quantifizierung mittels Durchflusszytometrie bestätigt. Die epidermalen Modelle zeigen im Vergleich zu den Melanommodellen eine deutlich schwächere Fluoreszenzintensität und keine Unterschiede der maximalen Intensitäten durch eine Behandlung. Bei den Melanommodellen der Linien MM96L und SKMEL28 ist ein deutlicher Rückgang bei den behandelten Modellen ersichtlich. Jedoch sind die Unterschiede zwischen der Behandlung von 1 und 5 μM nur schwach ausgeprägt. Sofern Zellen der Linie A11 in das Modell integriert werden, ist keine Veränderung der Aufnahme von 2-NBDG durch die Behandlung nachweisbar (Abbildung 4-27 B).

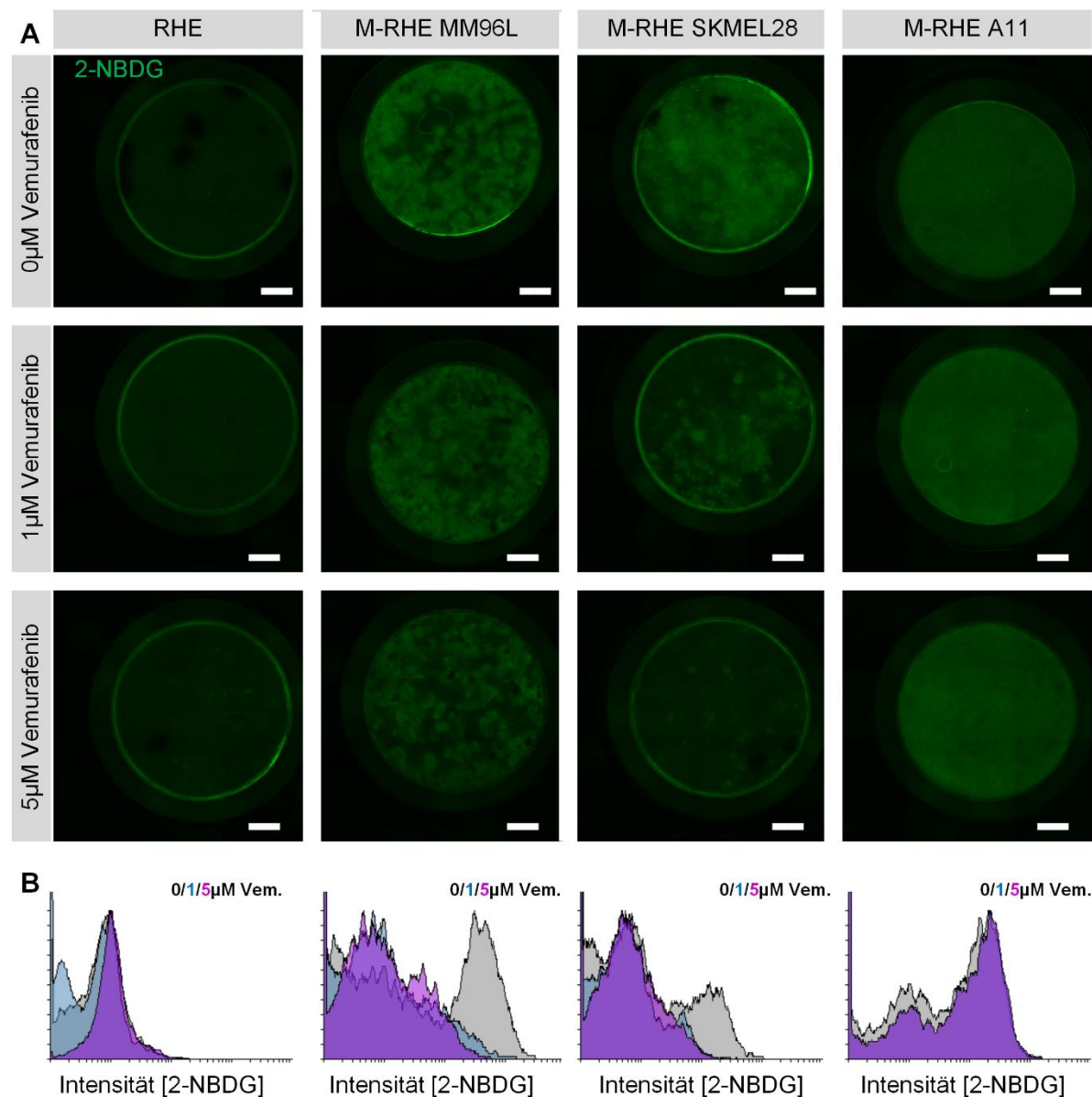


Abbildung 4-27: Untersuchung des Glukosemetabolismus nach Behandlung.

(A) Mikroskopische Aufnahmen der mit Vemurafenib behandelten und unbehandelten Gewebeäquivalente nach 60-minütiger Inkubation von 2-NBDG. (B) Die Diagramme zeigen Fluoreszenzintensitäten von 2-BDG der mit 0 µM (grau), 1 µM (blau) und 5 µM (violett) behandelten Modelle nach Isolation der Zellen. Der Maßstab entspricht 2000 µm.

Die Untersuchung des Einflusses der Behandlung mit Vemurafenib auf die Proliferation der Melanomzellen im Melanommodell erfolgt durch eine Ki67 Färbung. Dazu wurden Melanomzellen aus ihrem dreidimensionalen Zellverband isoliert und mittels eines Antikörpers gegen Ki67 angefärbt und der Zellkern durch DAPI gegengefärbt (Abbildung 4-28 A).

Die Immunfluoreszenzfärbung von Ki67 ermöglicht die Bestimmung der Proliferationsrate. Dazu kann die Anzahl der Ki67 positiven Zellen in das Verhältnis

zur Gesamtzellzahl gesetzt werden. Der Einfluss einer Therapie auf die Proliferation kann so nicht nur qualitativ, sondern auch quantitativ bestimmt werden (Abbildung 4-28 B). Die aus dem Melanommodell isolierten Melanomzellen mit BRAF^{V600E} Mutation (MM96L und SKMEL 28) zeigen nach der Behandlung mit Vemurafenib einen fast vollständigen Rückgang der Ki67 positiven Zellen. Ein Einfluss der Behandlung auf die Expression von Ki67 ist bei den isolierten A11 Zellen nicht zu erkennen. Die Keratinozyten aus den epidermalen Modellen zeigen schon in der Kontrolle nur eine sehr geringe Ki67 Expression, die durch die Behandlung nicht verändert wird.

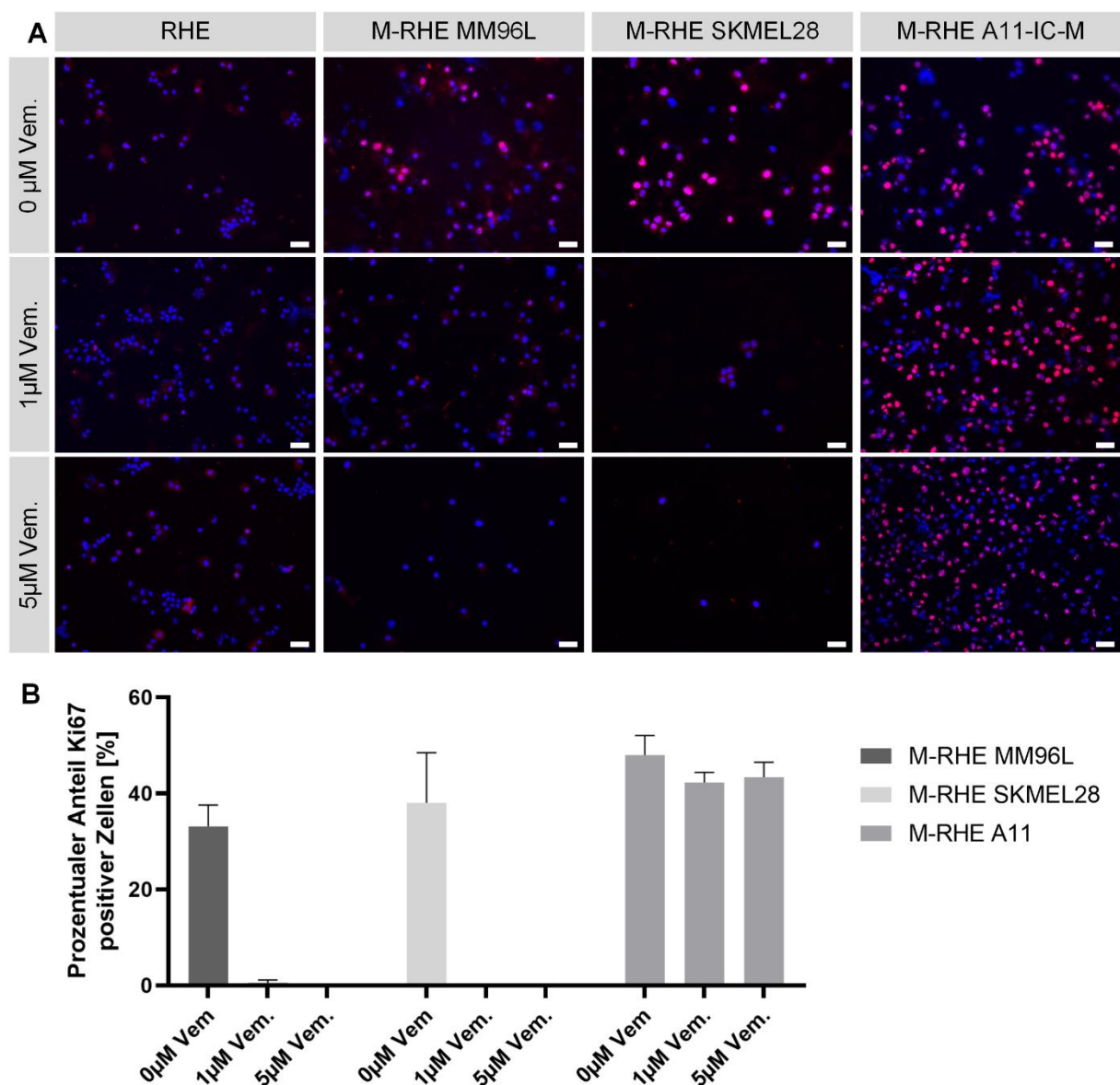


Abbildung 4-28: Immunfluoreszenzfärbung von Ki67 nach Behandlung mit Vemurafenib

Die Immunfluoreszenzfärbung von Ki67 (rot) zeigt den Einfluss auf die Proliferation nach einer Behandlung mit Vemurafenib. (A) Die Färbung fand nach der Isolation der Keratinozyten aus dem epidermalen Modell (RHE) bzw. den Melanomzellen MM96L, SKMEL28 und A11 aus den Melanommodellen (M-RHE) statt. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte durch DAPI (blau). (B) Die Graphik zeigt die quantitative Proliferationsrate des Melanommodells. Der Maßstab entspricht 50 μ m.

4.3.2. Qualifizierung der *in vitro* Melanommodelle für die präklinische Therapieentwicklung

Bei der Implementierung in die präklinische Therapieentwicklung sollen zunächst die Melanomzellen MUG-Mel2 in das Modell integriert werden, um im Anschluss daran das neuartige Tumortheraupeutikum B-B-dimethylacrylshikonin (DMAS) testen zu können. DMAS ist ein vielversprechender Wirkstoffkandidat welcher einen Zellzyklusarrest mit anschließender Apoptose bewirkt. Für die Therapieentwicklung ist die Verwendung von speziellen Zellen, die z.B. definierte Mutationen tragen, oftmals entscheidend. Für den Bereich der personalisierten Medizin ist oft sogar eine Integration von frisch isolierten Zellen notwendig. Daher galt als erster Schritt die Überprüfung des Wachstums der neuen Zelllinie.

Die Melanomzellen MUG-Mel2 sind stark pigmentiert, wodurch sowohl im Patienten als auch im Mausmodell dunkel gefärbte Melanome sichtbar werden. Ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten konnte auch im epidermalen Melanommodell beobachtet werden (Abbildung 4-29). Schon makroskopisch können Areale, in denen die Zellen vorhanden sind, detektiert werden. Die dunkel pigmentierten MUG-Mel2-Zellen können auch mikroskopisch nach einer histologischen HE-Färbung im Querschnitt des Modells gut von Keratinozyten abgegrenzt und bereits ohne spezifische Färbung lokalisiert werden (Abbildung 4-29).

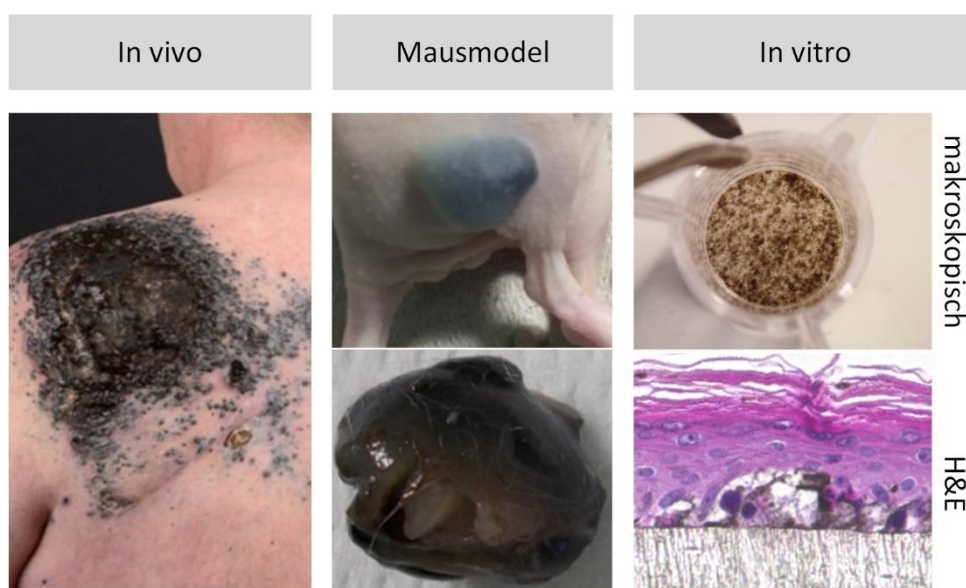


Abbildung 4-29: Wachstum von MUG-Mel2 *in vivo*, im Mausmodell und *in vitro*

Die Abbildung zeigt eine makroskopische Aufnahme des stark pigmentierten Tumors im Patienten. Im Mausmodell führt die Injektion zu stark pigmentierten Tumoren. Makroskopisch sowie mikroskopisch können auch im *in vitro* Modell stark pigmentierte Areale detektiert werden (*in vivo* und Mausmodell Abbildungen aus [126]).

Der Wirkstoffkandidat B-B-dimethylacrylshikonin wurde im Anschluss an die erfolgreiche Integration der Melanomzellen MUG-Mel2 in das Melanommodell getestet. Dazu wurden Keratinozyten und MUG-Mel2 in einer zweidimensionalen Kultur und in dreidimensionalen Epidermismodellen sowie Melanommodellen für 48 Stunden mit dem Wirkstoff behandelt (Abbildung 4-30). Die Behandlungsdauer sowie die Konzentration von 1,92 µg/ml waren durch Vorarbeiten des Kooperationspartners der Medizinischen Universität Graz festgelegt. Im Anschluss erfolgten die Messung der Viabilität, eine Analyse des Zellzyklus, die Untersuchung des Glukosemetabolismus und die Betrachtung der Proliferationsrate über eine Ki67 Färbung.

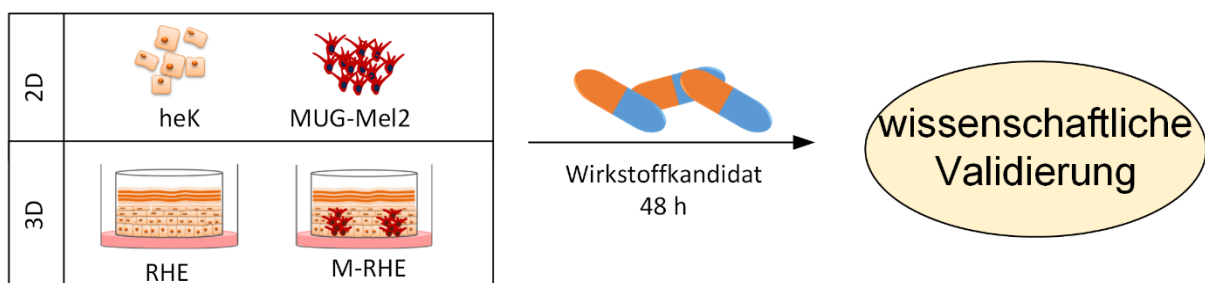


Abbildung 4-30: Schema der Behandlung und Validierung der Testung mit dem neuartigen Wirkstoffkandidat

In der zweidimensionalen Kultivierung der Zellen wurde zum einen die Wirkung von DMAS untersucht, auf der anderen Seite sollte auch der Einfluss des Testaufbaus für die dreidimensionale Kultivierung untersucht werden. Dazu wurden Keratinozyten sowie MUG-Mel2 Zellen auf einer Standard-Zellkulturoberfläche und in einem Insert ausgesät. Nach einer Behandlung von 48 Stunden mit DMAS erfolgte die Bestimmung der Viabilität über einen MTT Test. Auf der Zellkulturoberfläche reduzierte sich die Viabilität nach der Behandlung für Keratinozyten auf 1% und für MUG-Mel2 auf 3%. Bei der Kultivierung im Insert, bei der die Zugabe von DMAS nur durch Diffusion durch die Membran erfolgte, konnte zwar ebenfalls eine signifikante Reduktion der Viabilität detektiert werden, diese fiel jedoch mit 77% für Keratinozyten und mit 50% für MUG-Mel2 deutlich geringer aus als auf der Standard-Zellkulturoberfläche. Nach der Testung war zudem makroskopisch eine Bindung des farbigen DMAS an die Membranen der Inserts zu beobachten. Mikroskopisch war der Einfluss der Behandlung bei beiden Zelltypen durch das Ablösen der Zellen ersichtlich.

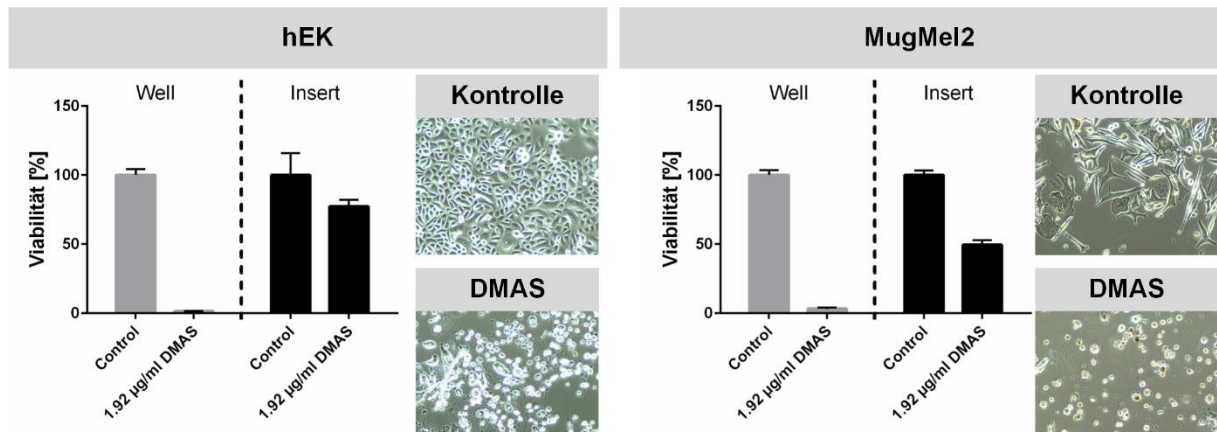


Abbildung 4-31: Einfluss der Behandlung von DMAS auf die Viabilität und die Morphologie in zweidimensionalen Kulturen.
Der Maßstab entspricht 100 µm.

Im dreidimensionalen Modell ist histologisch kein Einfluss der Behandlung sichtbar, weder für epidermale Modelle noch für Melanommodelle. Die Bestimmung der Viabilität zeigt zwischen der Kontrolle und den behandelten Modellen keine Unterschiede. Eine gegenüber der Kontrolle leicht gesteigerte Glukose-Aufnahme sowie Laktatproduktion konnte für die mit DMAS behandelten Modelle gemessen werden (Abbildung 4-32).

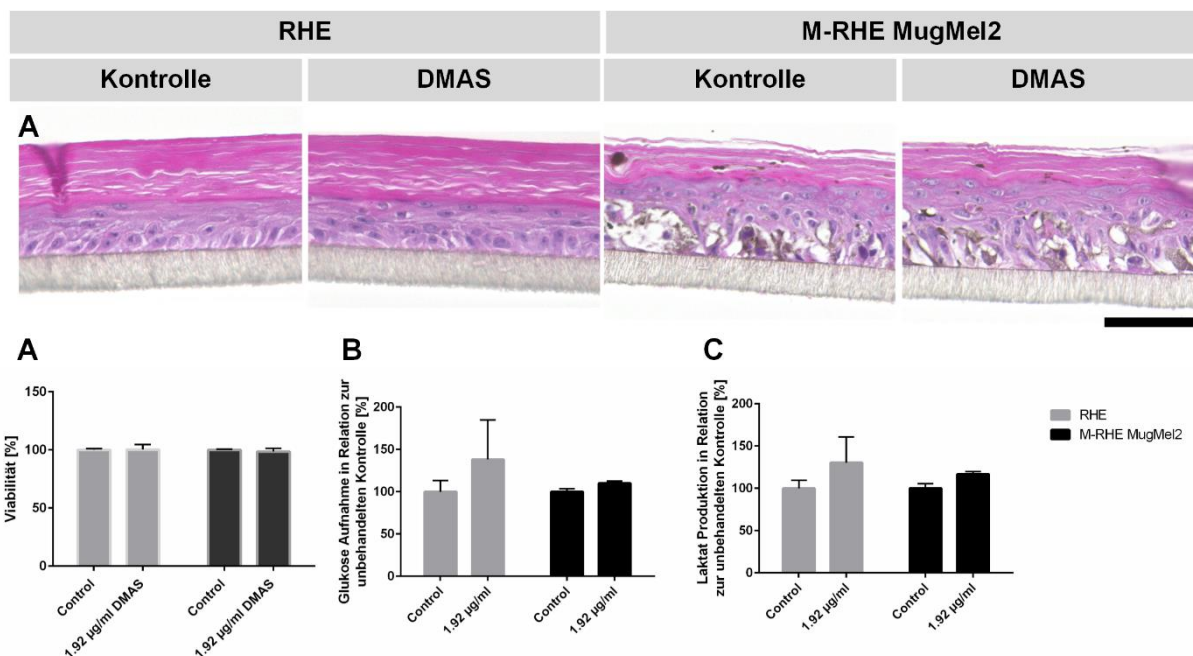


Abbildung 4-32: Einfluss der Behandlung auf die Histologie, die Viabilität sowie den Glukoseverbrauch bzw. die Laktatproduktion.

(A) Histologische Schnitte der epidermalen Modelle (RHE) und der Melanommodelle mit MUG-Mel2 (Mug-Mel2) mit und ohne Behandlung durch DMAS. Die Graphen zeigen die Viabilität (B) sowie den Glukoseverbrauch (C) bzw. die Laktatproduktion (D) nach der Behandlung auf RHE und M-RHE. Der Maßstab entspricht 50 µm.

Der Zellzyklus wurde nach Behandlung von DMAS sowohl in der zweidimensionalen als auch in der dreidimensionalen Kultur gemessen. Ein Einfluss des Wirkstoffs war bei Keratinozyten weder in einer zweidimensionalen noch in einer dreidimensionalen Kultur messbar. Die Melanomlinie MUG-Mel2 sprach in der zweidimensionalen Kultur auf die Behandlung an. Es kam dabei zu einer signifikanten Zunahme der prozentualen Zellen, die sich in der G0/1 Phase befinden, sowie einer signifikanten Reduktion der Zellen in der Zellzyklusphase G2/M. Diese Beobachtungen ließen sich in der dreidimensionalen Kultur im Melanommodell jedoch nicht bestätigen.

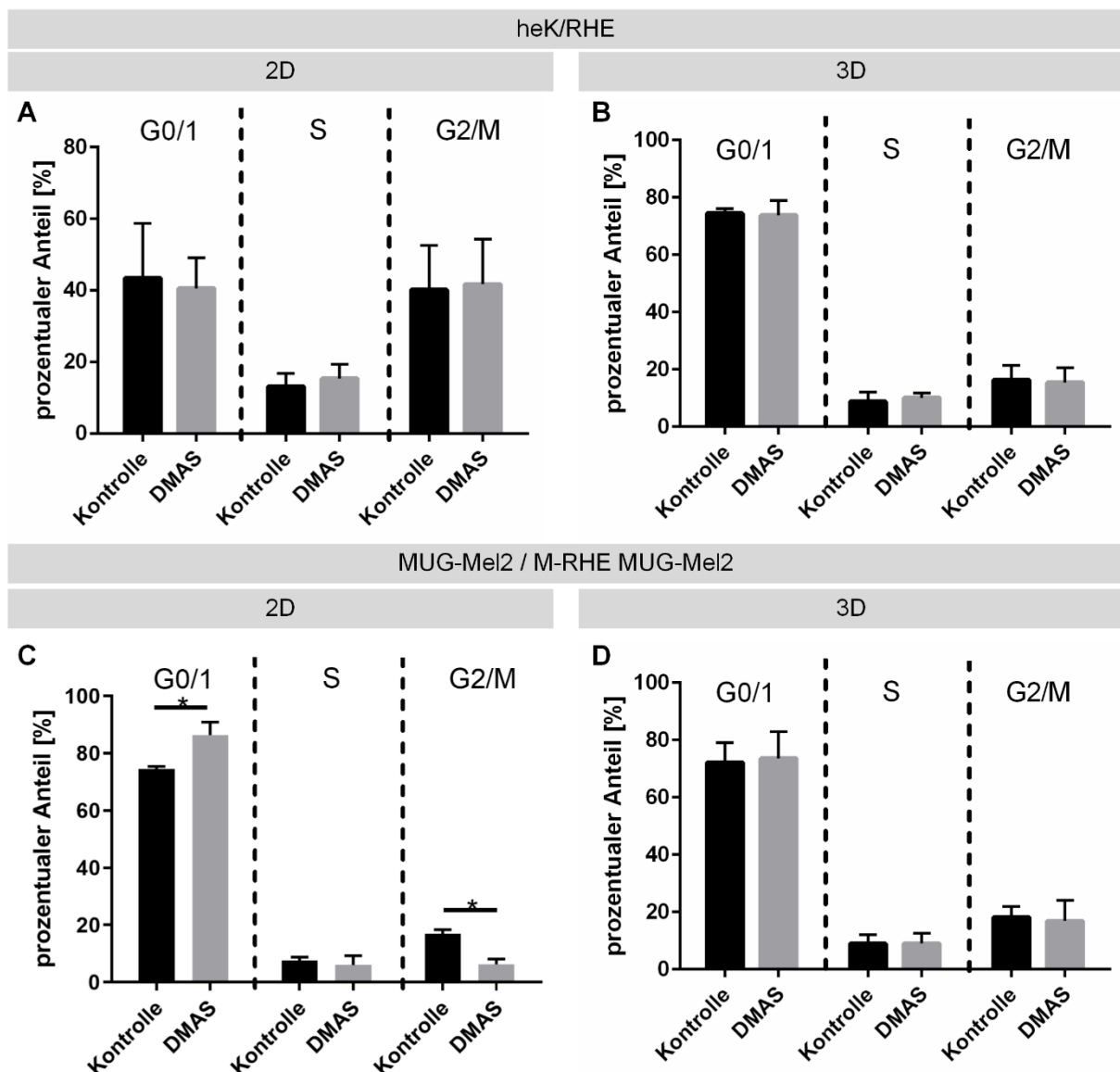


Abbildung 4-33: Zellzyklus Analyse von Keratinozyten und der Melanomzelllinie MUG-Mel2 in 2D und 3D

Die durchflusszytometrische Bestimmung des Zellzyklus von Keratinozyten und Melanomzellen der Linien MUG-Mel2 nach einer 48-stündigen Behandlung mit 1,92 $\mu\text{g/ml}$ DMAS. Dargestellt sind jeweils die prozentualen Anteile der Zellen, die sich in der G0, S und G2/M Phase befinden. Die Diagramme zeigen die Ergebnisse für Keratinozyten in einer zweidimensionalen Kultur (A), für Keratinozyten in einer 3D Kultivierung in einem Epidermismodell (RHE) (B) sowie für MUG-Mel2 in einer zweidimensionalen Kultur (C) und als Melanommodell (M-RHE) (D).

Die Untersuchung des Glukosemetabolismus fand neben der indirekten Messung über den Verbrauch des Mediums (vgl. Abbildung 4-32) auch über die Aufnahme des fluoreszenzmarkierten Glukose Analogons 2-NBDG und anschließender durchflusszytomerischer Quantifizierung statt. In der zweidimensionalen Kultur war bei den MUG-Mel2 Zellen eine deutlich gesteigerte Aufnahme der Glukose im Vergleich zu Keratinozyten zu beobachten. Bereits nach 15-minütiger Inkubationszeit war die gesteigerte Aufnahme deutlich ersichtlich und bestätigte sich bei einer 60-minütigen Inkubationsphase von 2-NBDG. Im Epidermismodell zeigen die Keratinozyten im Vergleich zu einer zweidimensionalen Kultur nur noch eine sehr geringe Glukoseaufnahme, die auch durch die Behandlung mit DMAS nicht verändert wurde. Die Melanommodelle zeigen jedoch deutlich eine gesteigerte Fluoreszenzintensität nach einer einstündigen Inkubation von 2-NBDG. Nach der 48-stündigen Behandlung mit DMAS ist kein Rückgang der Intensität und damit verbunden keine reduzierte Glukoseaufnahme feststellbar.

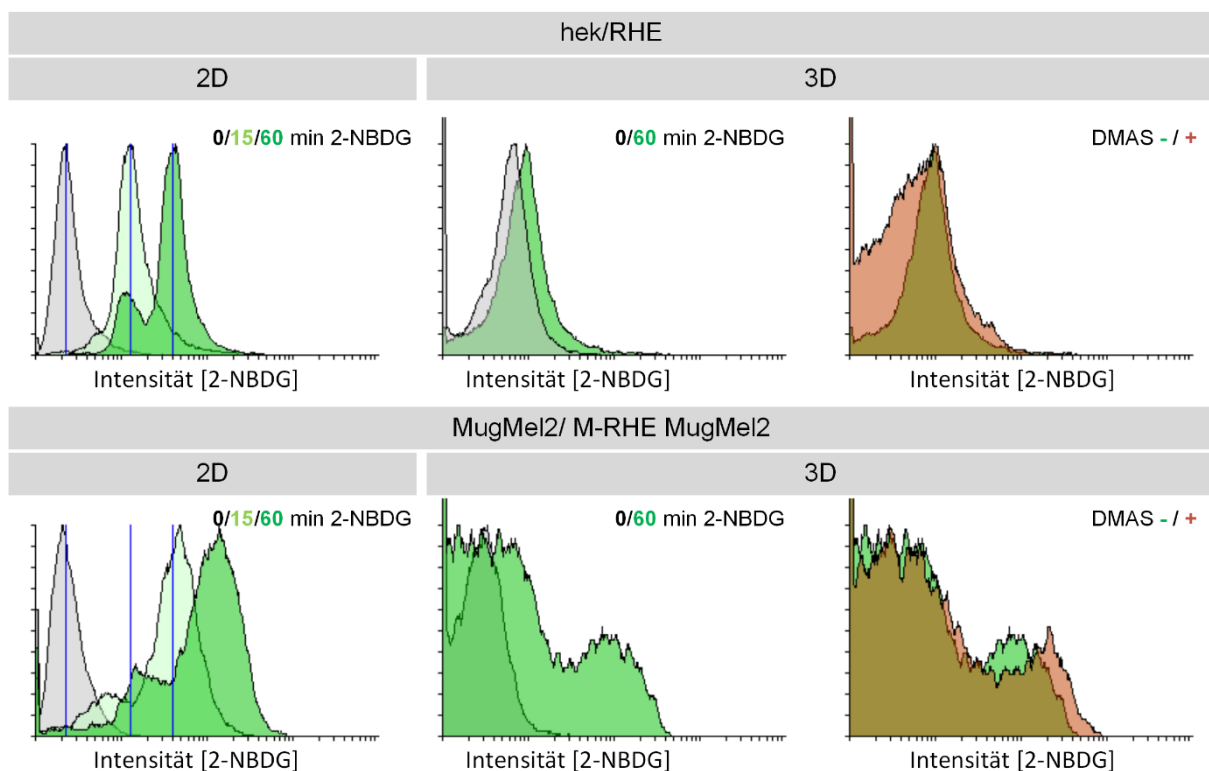


Abbildung 4-34: Untersuchung des Glukosemetabolismus von MUG-Mel2 Zellen

Die Diagramme zeigen die Fluoreszenzintensitäten von Keratinozyten (hek), MUG-Mel2 Zellen, epidermalen Modellen (RHE) und Melanommodellen von MUG-Mel2 Zellen (M-RHE MUG-Mel2). In den zweidimensionalen Kulturen sind die Zellen ohne 2-BDG Inkubation in grau, nach 15-minütiger Inkubation in hellgrün und nach 60-minütiger Inkubation in dunkelgrün dargestellt. Für die 3D Modelle sind die mit 1,92 µg/ml behandelten Modelle zusätzlich in rot dargestellt.

Die Untersuchung des Einflusses der Behandlung mit DMAS auf die Proliferation der MUG-Mel2 im Melanommodell erfolgt durch eine Ki67 Färbung (Abbildung 4-35).

Die aus dem Melanommodell isolierten Melanomzellen MUG-Mel2 zeigen nach der Behandlung mit DMAS einen deutlichen Rückgang der Ki67 positiven Zellen. Die Keratinozyten aus den epidermalen Modellen zeigen schon in der Kontrolle nur eine sehr geringe Ki67 Expression, die durch die Behandlung nicht verändert wird.

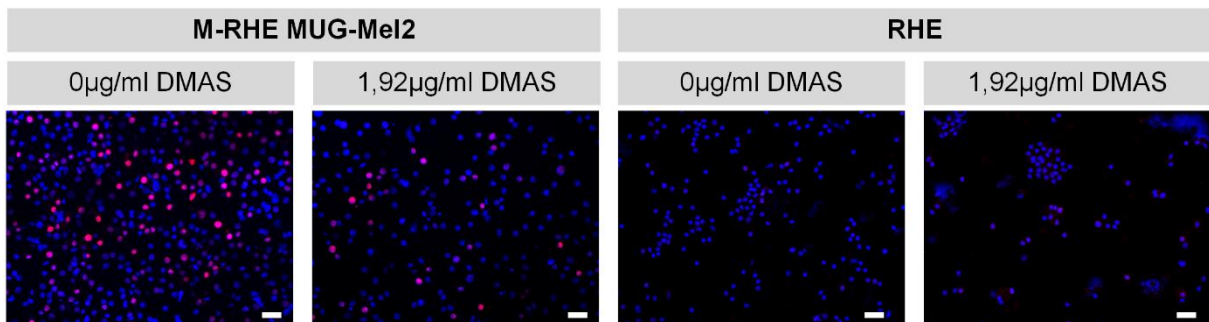


Abbildung 4-35: Immunfluoreszenzfärbung von Ki67 nach Behandlung von Melanommodellen MUG-Mel2 (M-RHE) und epidermalen Modellen (RHE) mit DMAS

Die Immunfluoreszenzfärbung von Ki67 (rot) zeigt den Einfluss auf die Proliferation nach einer Behandlung mit DMAS auf. Die Färbung fand nach der Isolation der Keratinozyten aus dem epidermalen Modell (RHE) bzw. den Melanomzellen MUG-Mel2 aus den Melanommodellen (M-RHE) statt. Eine Gegenfärbung der Zellkerne erfolgte durch DAPI (blau). Der Maßstab entspricht 50 µm.

4.4. Steigerung der Prädiktivität der Gewebeäquivalente

Die Steigerung der Komplexität von Gewebeäquivalenten und im Speziellen die Steigerung der Hautbarriere von artifiziellen Modellen und die Integration eines dermalen Anteils sowie einer Endothelzellschicht dient der weiteren Annäherung der artifiziellen Gewebe an die native Situation. Im Falle einer Anwendung des Testsystems im Bereich topischer Behandlungen, z.B. von nicht-operablen Satelliten- und In-transit-Metastasen mittels Immunmodulatoren, ist eine Barrierefunktion nahe der *in vivo* Situation notwendig, um Substanzen unter möglichst physiologischen Bedingungen untersuchen zu können. Dass die Interaktionen zwischen den Zelltypen vor allem auch bei vielen Krankheiten von entscheidender Wichtigkeit sind, konnte in vielen Studien belegt werden. Eine Integration möglichst vieler Komponenten ist daher auch für 3D *in vitro* Modelle von großem Interesse. Durch die Erweiterung des epidermalen Melanommodells um die Dermis und ein banalisiertes Gefäßsystem soll die Interaktion mit Fibroblasten und Endothelzellen gefördert werden und das Modell für weitere Fragestellungen Anwendung finden können.

4.4.1. Steigerung der Hautbarriere

Die Hautbarriere dient dem menschlichen Körper zum Schutz vor schädlichen äußeren Einflüssen und dem Verlust von Flüssigkeit und muss von topisch applizierbaren Medikamenten überwunden werden. Daher steht die Haut im Fokus der Beurteilung von Chemikalien und der Galenik von Pharmazeutika. Bislang ist für Absorptionstestungen bei der einzigen zugelassenen *in vitro* Testmethode nur die Verwendung von exzidierte Haut erlaubt (OECD TG428).

Zunächst wurde die Barriere der unter Standardbedingungen kultivierten RHE Modelle in einer Absorptionsstudie im Vergleich zu exzidierte Haut bestimmt (Abbildung 4-37). Dafür wurde die exzidierte menschliche Haut und RHE Modelle in Franz-Diffusionskammern eingesetzt und die Absorption von Testosteron und Koffein auf Grundlage der OECD-Testrichtlinie 428 bestimmt. Der Vergleich von RHE (Standardkultur) und exzidierte Haut zeigte in einer Absorptionsstudie eine deutlich höhere resorbierbare Dosis in RHE. Bestimmt wurden neben dem prozentualen Anteil nach der Hautwäsche und der absorbierten Dosis, der Permeabilitätskoeffizient (Papp), die Verzögerungszeit und die Absorptionsrate (Abbildung 4-37 A-D). Für beide Substanzen wurde eine höhere und schnellere Penetration in RHE beobachtet,

während die Verzögerungszeit im Vergleich zu humaner Haut gering bis nicht vorhanden war.

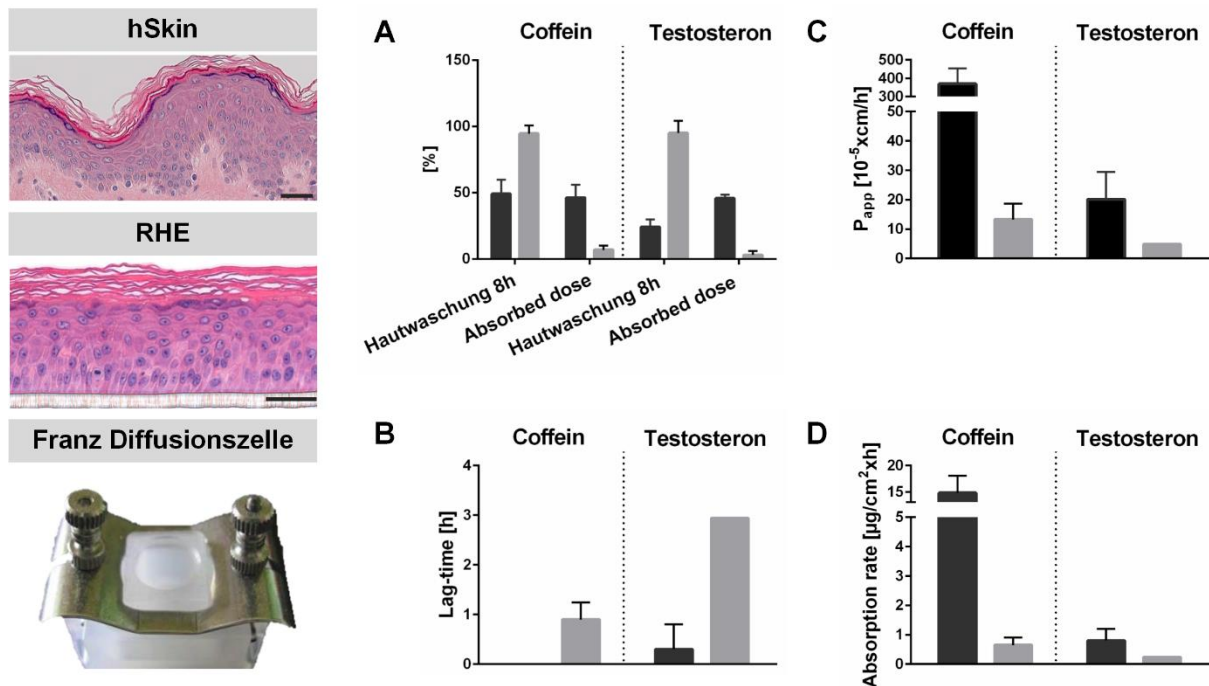


Abbildung 4-36: Absorption von Koffein und Testosteron bei exzidierter humaner Haut (hSkin) und rekonstruierter humaner Epidermis (RHE).

Dargestellt sind die prozentualen gemessenen Werte nach der Hautwäsche sowie die absorbierte Dosis (A), der Permeabilitätskoeffizient (P_{app}) (B), die Verzögerungszeit (C) und die Absorptionsrate (D). Auf der linken Seite sind ein histologischer Querschnitt der humanen Haut und des epidermalen Modells sowie eine Franz Diffusionszelle abgebildet. Der Maßstab entspricht 50 μ m.

Nachdem die Absorptionsstudie eine deutlich höhere Permeabilität bei RHE im Vergleich zu nativer humaner Haut zeigte, sollte durch die Zugabe einer definierten Fettsäuremischung sowie durch die Stimulation von Reparaturmechanismen eine Erhöhung der Barriere erzielt werden (Abbildung 4-38 und Abbildung 4-39). Die Supplementation des Mediums mit definierten Fettsäuren fand nach der submersen Phase ab Tag 1 der Kultur statt (Abbildung 4-38 A). Die Barriere wurde nach 19-tägiger Kultivierung der Modelle durch einen indirekten Barrierefunktionstest quantifiziert, indem ein Detergens für eine definierte Zeitspanne auf die Modelle aufgebracht und nachfolgend mittels MTT Assay die relative Viabilität bestimmt wird. Die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen der Lipidmischung (1ml/L, 2ml/L, 5ml/L, 10ml/L), zeigt bei 1 ml/l eine signifikante Erhöhung der Barrierefunktion um $17\% \pm 7\%$, bei 5 ml/l um $8\% \pm 6\%$ sowie bei 10 ml/l um $9\% \pm 5\%$ gegenüber der Standardkultur (Abbildung 4-37 B). Das beste Ergebnis ließ sich mit der Konzentration 1 ml/l erzielen und konnte

mit der Verwendung von zwei weiteren Donoren mit Steigerungen von $15\% \pm 8\%$ und $19\% \pm 6\%$ reproduzierbar wiederholt werden (Abbildung 4-37 C). Darüber hinaus wurde die immunhistologische Charakterisierung der epidermalen Permeabilitätsbarriere durch Immunfluoreszenzfärbung von humaner Haut sowie RHE und lipidangereicherten RHE gegen Stearoyl-CoA-Desaturase 1, Filaggrin, Involucrin und Ceramide bewertet. Filaggrin wurde sowohl im nativen Gewebe als auch in beiden RHE Modellen fast ausschließlich im *stratum corneum* beobachtet. Die Fluoreszenz scheint bei lipidangereicherten RHE im Vergleich zu den Standard-RHE erhöht. Im nativen Gewebe ist Involucrin hauptsächlich in den Schichten von *stratum spinosum* und *stratum granulosum* lokalisiert. Dies gilt auch für das Standard-RHE, während die lipidangereicherten RHE Modelle zusätzlich eine schwache Fluoreszenz im gesamten *stratum corneum* zeigen. Ein Vergleich der Fluoreszenz in beiden RHE Modellen zeigt eine Signalreduktion der lipidangereicherten RHE Modelle. Stearyl-CoA-Desaturase-1 (SCD1), die vorwiegend im *stratum spinosum* und *stratum corneum* beobachtet wird, zeigt eine etwas schwächere Präsenz in Standardprotokoll-RHE und kaum ein Signal in lipidangereicherten RHE Modellen. Das Signal von Antikörpern gegen Ceramidspezies zeigt sich in allen epidermalen Schichten des nativen Gewebes, insbesondere in den Zellkernen und im *stratum corneum*. Das Fluoreszenzsignal der lipidangereicherten RHE Modelle ist im Vergleich zum Standardprotokoll RHE deutlich stärker. Die Lokalisation unterscheidet sich zwischen den RHE Modellen und der nativen Haut durch ein starkes Signal außerhalb der Zellkerne und eine geringere Intensität im *stratum corneum*.

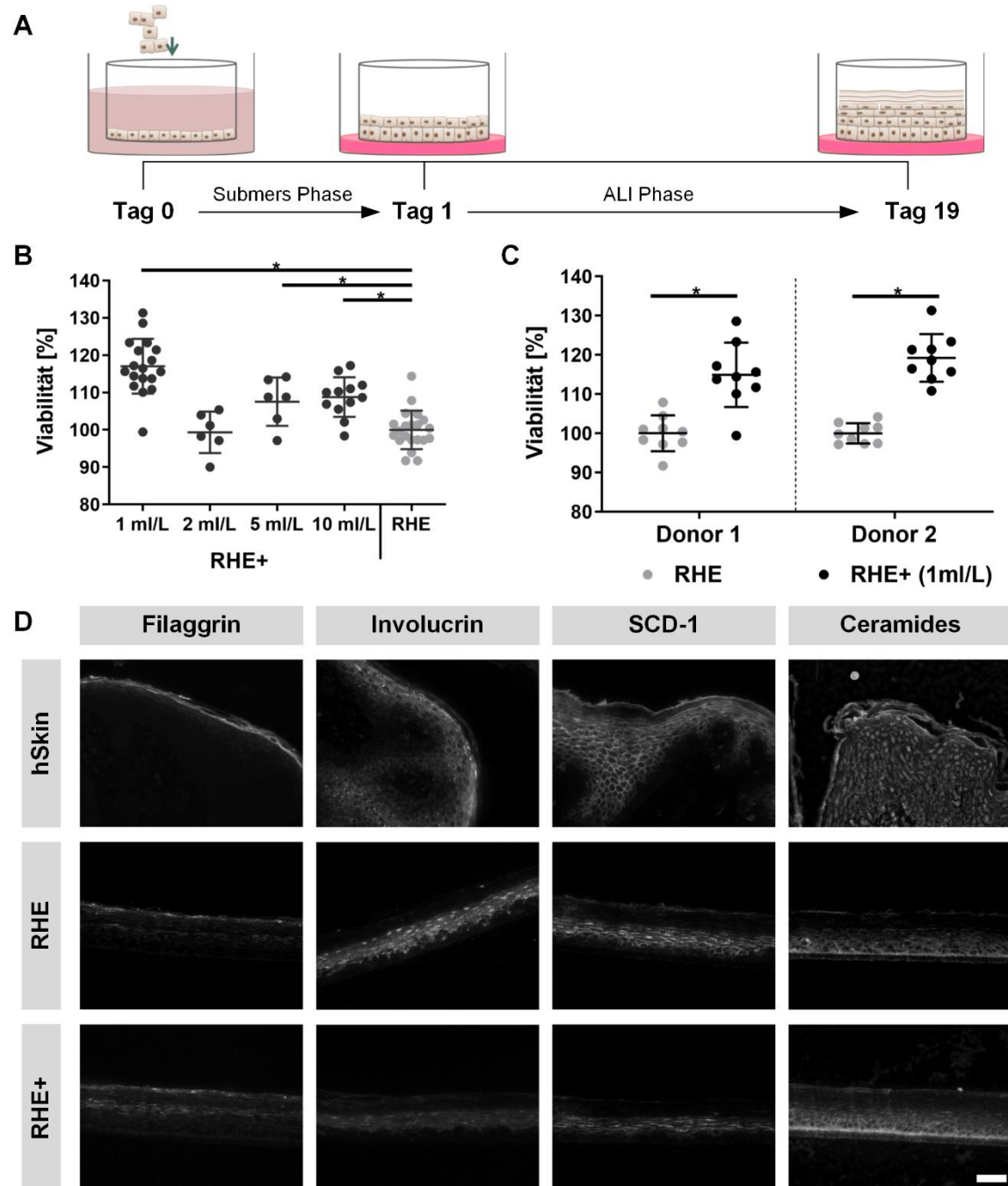


Abbildung 4-37: Einfluss einer modifizierten Medienzusammensetzung auf die Hautbarriere

(A) Schematische Darstellung der Kultur für die Mediumsupplementation. (B) Vergleich zwischen den Wirkungen des modifizierten Protokolls (RHE+) unter Verwendung unterschiedlicher Konzentration der Lipidmischung (a 1 ml/L, b 2 ml/L, c 5 ml/L, d 10 ml/L). (C) Indirekter Barrierefunktionstest von RHE+ im Vergleich zu einer Kontrolle. (D) Immunhistochemische Charakterisierung von humaner Haut (hSkin), RHE und modifiziertem RHE (RHE+). Immunfluoreszenzfärbung gegen Filaggrin, Involucrin, Stearoyl-CoA-Desaturase 1 (SCD-1) und Ceramide. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m. (* $p \leq 0,05$ / *** $p \leq 0,001$ / **** $p \leq 0,0001$).

Die Stimulation von Regenerationsprozessen ließ sich durch die Behandlung mit einer leicht reizenden Substanz erzielen. Dafür wurde an Tag 15 der Kultur Triton X-100 (1% in PBS) für unterschiedliche Inkubationszeiten (5, 15 und 30 Minuten) auf das Modell appliziert und im Anschluss wieder entfernt. Nach einer Regenerationsphase von 4 Tagen ließ sich die Barriere an Tag 19 über den indirekten Barrierefunktionstest quantifizieren (Abbildung 4-38 A). Dabei ergab sich die stärkste Steigerung von 20% der Barriere für eine 5-minütige Behandlungszeit. Auch nach einer 15-minütigen Behandlungszeit zeigte sich noch eine Verstärkung der Barriere um 13%. Erst nach einer 30-minütigen Behandlungszeit war die Barriere gegenüber der Kontrolle um 11% minimiert (Abbildung 4-38 B). Die Reproduzierbarkeit ließ sich mittels Verwendung von drei unterschiedlichen Zeldonoren zum Aufbau der Modelle nachweisen. Es ergaben sich statistisch signifikante Barrieresteigerungen von 10%, 35% und 14% gegenüber der jeweiligen Kontrolle (Abbildung 4-38 C).

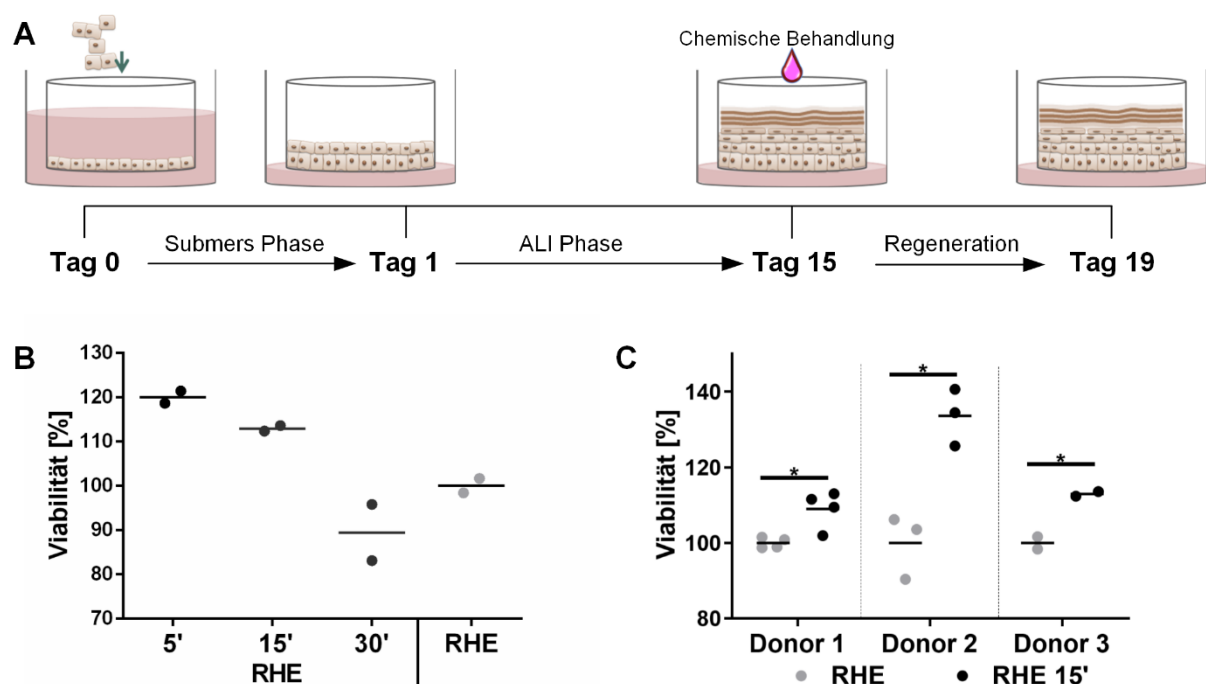


Abbildung 4-38: Stimulation der Regenerationsprozesse in Epidermismodellen (RHE)

(A) Schematische Darstellung der Kultur für chemisch behandelte RHE Modelle. (C) Bestimmung der Barrierefunktion über die relative Viabilität nach den Behandlungszeiträumen von 5, 15 und 30 Minuten (5', 15', 30'). (B) Indirekter Barrierefunktionstest von chemisch behandeltem RHE (RHE15') im Vergleich zu unbehandelten RHE. (* $p \leq 0,05$ / ** $p \leq 0,01$)

4.4.2. Integration eines dermalen Anteils sowie eines Endothels

Je nach Fragestellung und Anwendung müssen Gewebeäquivalente unterschiedlich komplex aufgebaut sein. Sollen mit Hilfe von Melanommodellen Metastasierungswege oder auch die Tumorangiogenese untersucht werden können, ist eine Erweiterung des epidermalen Modells unabdingbar.

In der vorliegenden Arbeit ließen sich Melanome in einem epidermalen Melanommodell, aber auch in zwei unterschiedlich komplexen Vollhautmodellen integrieren (Abbildung 4-39). Bei dem simpleren Vollhautmodell wird der epidermale Anteil um eine dermale Schicht ergänzt, die aus einem mit Fibroblasten besiedelten Kollagenhydrogel besteht. Das komplexere Modell wird auf einem biologischen Scaffold aus dezellularisiertem porcinem Dünndarmsegment aufgebaut und ermöglicht neben der Integration von Fibroblasten auch eine Erweiterung des Gewebeäquivalents um eine basale Endothelzellschicht. Der schematische Aufbau der drei Modelle ist in Abbildung 4-39 dargestellt.

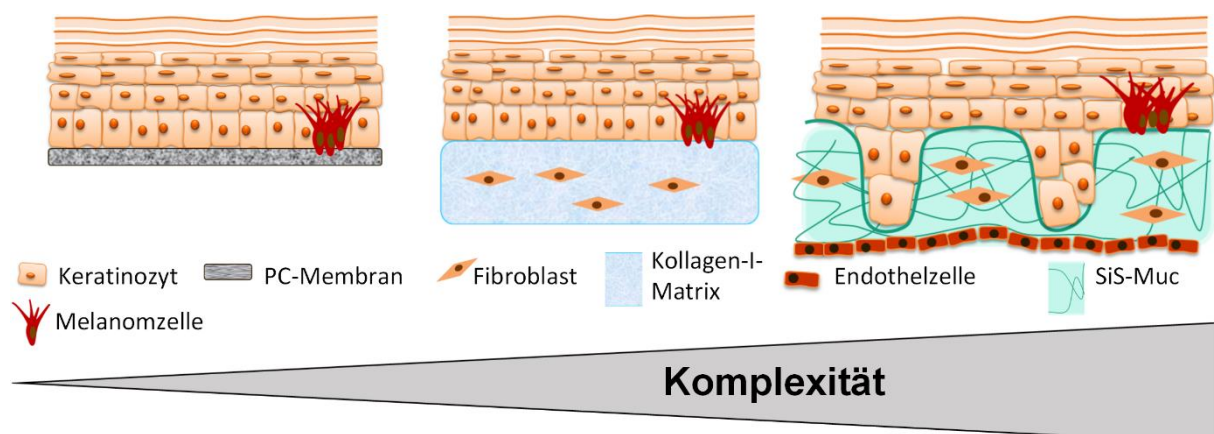


Abbildung 4-39: Schematische Darstellung eines epidermalen Melanommodells sowie zwei unterschiedlich komplexer Vollhaut-Melanommodelle.

Durch eine histologische Übersichtsfärbung sowie eine histopathologische Bestimmung der Melanom Marker Melan-A, S100 β , HMB45 sowie des Proliferationsmarkers Ki67 und CD31 als Endothelzellmarker ließ sich der erfolgreiche Aufbau der Melanomvollhautmodelle nachweisen (Abbildung 4-40 und Abbildung 4-41).

Das hydrogelbasierte Vollhautmodell zeigt in der HE Übersichtsfärbung die Ausbildung der dermalen Komponente, in der die Fibroblasten homogen im Hydrogel verteilt vorliegen (Abbildung 4-40). Die epidermale Komponente weist eine mehrschichtige

Epidermis mit Ausprägung der einzelnen Schichten des *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* und einem anschließenden *stratum corneum* auf.

Durch die Integration der Melanomlinien MM96L und SKMEL28 und die anschließende Färbung mit diversen melanomassoziierten Markern können die Melanomzellnester an der dermoepidermalen Grenze lokalisiert werden, die in der Regel an dieser entlangwandern. Einzeln ragen Melanomzellstränge bei der Linie MM96L in den dermalen Anteil hinein und deuten auf ein invasives Wachstum hin. Bei der Linie SKMEL28 hingegen sind nur wenige einzelne Tumorzellen im Bereich des epidermal-dermalen Übergangs festzustellen.

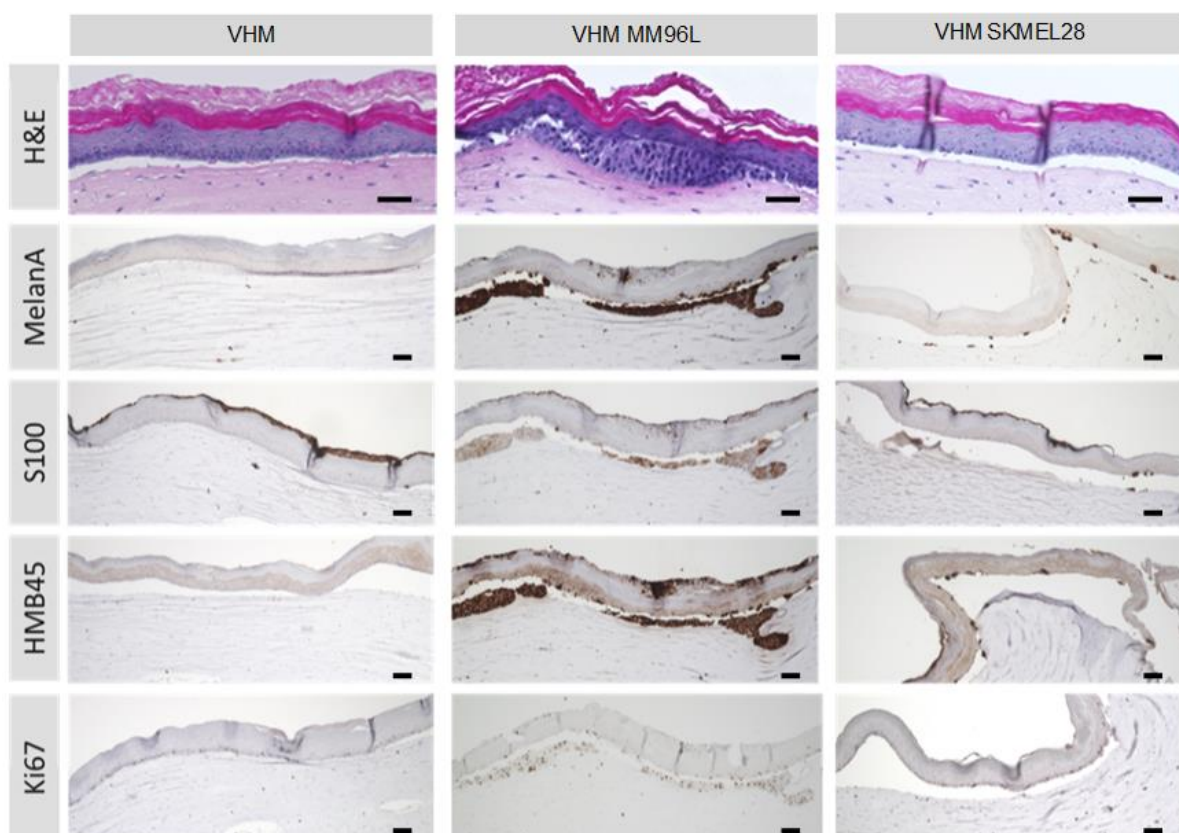


Abbildung 4-40: Histologische Übersichtsfärbung sowie immunhistochemische Färbungen eines hydrogelbasierten Vollhautmodells (VHM) sowie der entsprechenden Melanommodelle

Für die Melanommodelle wurden die Zelllinien MM96L (VHM MM96L) und SKMEL28 (VHM SKMEL) eingesetzt. Eine Hämatoxylin-Eosin (HE) Färbung dient der Übersicht. Dargestellt ist zudem die immunhistologische Färbung gegen die Melanommarker Melan-A, S100, HMB45 und den Proliferationsmarker Ki67. Zur Färbung der Zellkerne wurde jeweils Hämalaun verwendet. Der Maßstab entspricht 50 µm.

Die Verwendung der natürlichen biologischen Matrix SIS-muc als Trägerscaffold ermöglicht neben der Integration von Fibroblasten durch ihre native Struktur auch die Aussaat einer basalen Endothelzellschicht. Die HE Übersichtsfärbung zeigt das

homogene Einwachsen der Fibroblasten in den oberen Teil des Dünndarmsegments und damit die Ausbildung eines dermalen Anteils, während der epidermale Teil wie auch im kollagenbasierten Modell eine mehrschichtige Epidermis mit Ausprägung der einzelnen Schichten aufweist. Zudem kann durch die Verwendung der SIS-muc die papillare Struktur der Epidermis nachgebildet werden.

Durch die Integration der Melanomlinien MM96L, SKMEL28 und A11 und die anschließende Färbung mit den melanomassoziierten Markern Melan-A, S100 β und HMB45 sind die Melanomzellen innerhalb des Modells nachweisbar. Eine Lokalisierung fand auch hier an der dermoepidermalen Grenze statt. Die beiden Zelllinien MM96L und A11 zeigten ein deutliches und mit dem epidermalen Modell vergleichbares Wachstum. Nach Verwendung der Melanomlinie SKMEL28 konnten wie bei dem vorhergehenden hydrogelbasierten Modell ebenfalls nur wenige, eher einzeln vorliegende Melanomzellen detektiert werden. Der Proliferationsmarker Ki67 konnte in den Melanommodellen verstärkt detektiert werden. Basal ließ sich durch das Anfärben des Endothelzellmarkers CD31 eine nahezu geschlossene Endothelzellschicht feststellen.

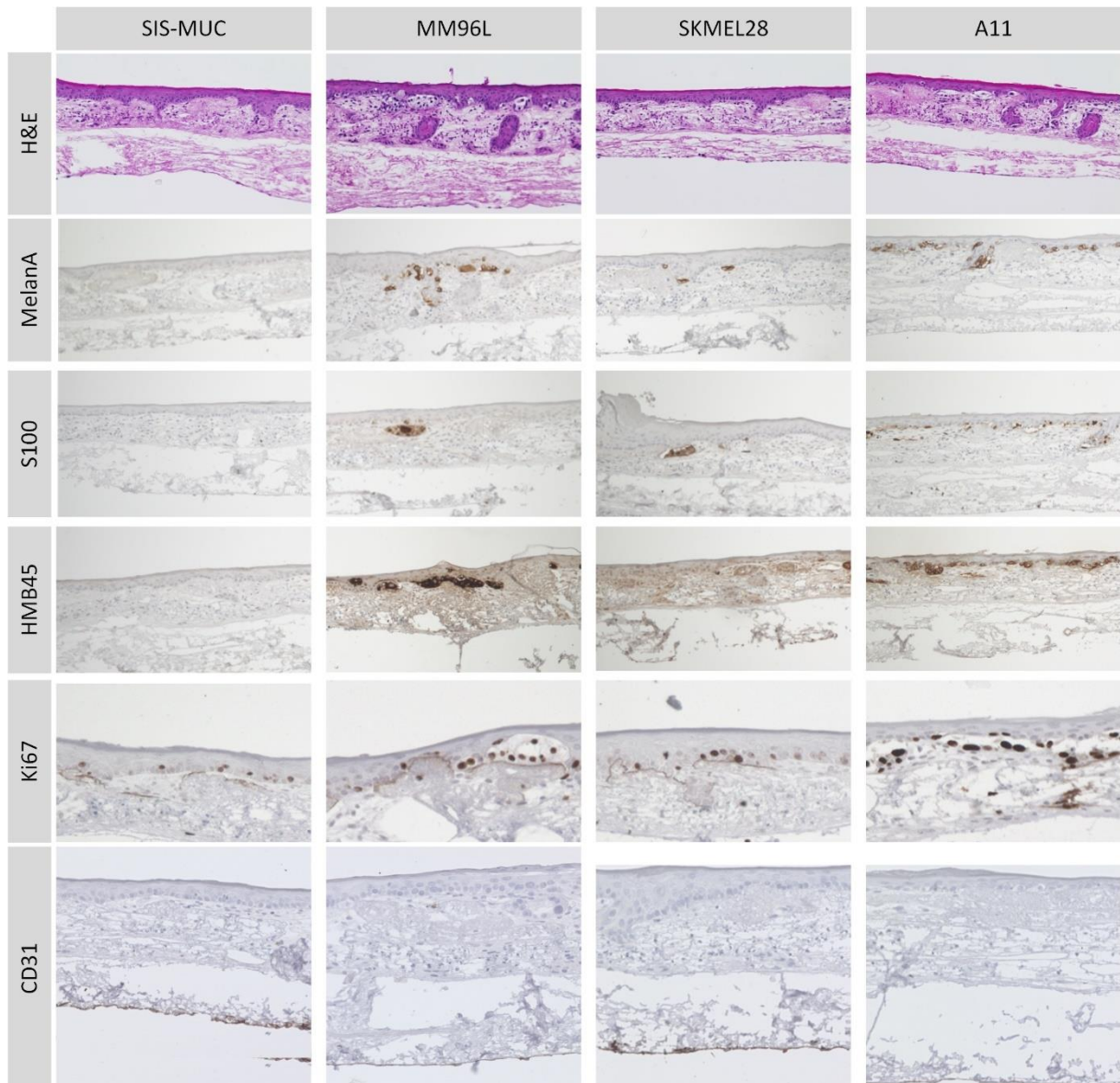


Abbildung 4-41: Histologische Übersichtsfärbung sowie immunhistochemische Färbungen eines SIS-muc basierten Vollhautmodells (VHM_{muc}) sowie der entsprechenden Melanommodelle. Für die Melanommodelle wurden die Zelllinien MM96L (VHM_{muc} MM96L), SKMEL28 (VHM_{muc} SKMEL) und A11 (VHM_{muc} A11) eingesetzt. Eine HE Färbung dient der Übersicht. Dargestellt sind zudem die immunhistologischen Färbungen gegen die Melanommarker Melan-A, S100, HMB45, den Proliferationsmarker Ki67 sowie den Endothelzellmarker CD31. Zur Färbung der Zellkerne wurde jeweils Hämalaun verwendet. Der Maßstab entspricht 50 μ m.

5. Diskussion

Das Melanom stellt die gefährlichste Form des Hautkrebses dar [127]. Obwohl nur 4% aller Hauttumore auf das maligne Melanom zurückzuführen sind, verursacht es über 90% aller Todesfälle. Es weist die höchste Steigerung der Inzidenzrate aller solider Tumoren auf. Jährlich werden weltweit über 130.000 neue Fälle diagnostiziert. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate bei Patienten mit metastasiertem Melanom liegt bei weniger als 15% und ist mit einer hohen Resistenzbildung gegen die derzeit üblichen Therapien und der früh auftretenden Metastasierung über das Lymph- und Blutssystem zu begründen [128]. Maligne Tumore wie das Melanom sind dreidimensionale Einheiten von Zellen und extrazellulärer Matrix innerhalb eines Organismus, welche in das umliegende Gewebe infiltrieren und es zerstören. Zu Forschungszwecken konnten aus Tumorgewebe zahlreiche Zelllinien gewonnen werden, welche in aller Regel in zweidimensionalen Zellkulturen oder im Tiermodell zum Einsatz kommen [129-131]. Beiden Modellen mangelt es jedoch an einer physiologischen Umgebung des Tumors. Zweidimensionale Zellkulturen haben den Vorteil durch den im Vergleich einfachen Aufbau einen hohen Testdurchsatz zu ermöglichen, jedoch bleiben Aspekte, die durch die räumliche Orientierung und den Crosstalk mit anderen Zelltypen entstehen, oftmals unberücksichtigt. Forschungsergebnisse liefern bereits eindeutige Hinweise, dass die Art der Zellkultivierung zu starken Veränderungen beispielsweise in der Proliferation und der metabolischen Kapazität führt. Es mangelt jedoch an umfassenden und systematischen Studien, die diese Effekte überprüfen [132-135]. Sowohl die aus unterschiedlicher Kultivierung resultierenden Veränderungen in Signalkaskaden von Tumorzellen als auch die Reaktionen durch den Crosstalk mit anderen Zelltypen in dreidimensionalen Kulturen sind noch wenig verstanden. Wie sich diese Signalwege in Reaktion auf eine zielgerichtete Therapie verändern und ob eine unterschiedliche Reaktion in einer zweidimensionalen gegenüber einer dreidimensionalen Kultur besteht, ist bislang weitgehend unbekannt.

Tiermodelle ermöglichen im Gegensatz zum zweidimensionalen Modell zwar die dreidimensionale Darstellung des Tumors innerhalb eines Organismus, jedoch sprechen hier ethische Bedenken, ein hoher Kosten- und Zeitaufwand sowie die mangelnde Übertragbarkeit auf den Menschen gegen die weitläufige Verwendung dieser Modelle [76, 136]. Problematisch für die Forschung und die Übertragbarkeit der Ergebnisse sind dabei die signifikanten Unterschiede zwischen den Spezies [137,

138]. Als Beispiel hierfür ist die Lokalisation von Melanozyten in der murinen und humanen Haut zu nennen. Während sich humane Melanozyten entlang der Basalmembran der Epidermis anordnen, sind die murinen Melanozyten in der Basalwurzelregion von Haarfolikeln in der Dermis lokalisiert [139]. Dies führt zu fundamentalen Unterschieden in der Hautbiologie sowie im Crosstalk der Zellen, da humane Keratinozyten durch die Sekretion einer Vielzahl von Wachstumsfaktoren und Zytokinen das Wachstum, Überleben, Adhäsion, Migration und Differenzierung von Melanozyten in parakriner Weise kontrollieren [140]. Die sich durch die Speziesunterschiede sowie die unnatürliche Umgebung in zweidimensionalen Zellkulturen ergebenden Probleme können durch die Entwicklung von humanen dreidimensionalen *in vitro* Modellen, wie in dieser Arbeit dargestellt, gelöst werden. Tumorsphäroide sind ein erster Ansatz von dreidimensionalen Tumorkonstrukten, die *in vitro* Tumore simulieren [141]. Diese dreidimensionalen Sphäroide bilden das Mikromilieu und die Zellheterogenität eines Tumors in vereinfachter Form nach, insbesondere dann, wenn sie mit anderen Zellen wie Fibroblasten, Immunzellen und Endothelzellen kokultiviert werden [142-144]. In Tumorsphäroiden ließen sich Veränderungen der Proliferation und der metabolischen Kapazität sowie eine erhöhte Resistenz gegenüber Therapieeffekten im Vergleich zur zweidimensionalen Kultur nachweisen [132, 145]. Zwar konnte mit multizellulären Sphäroiden eine Annäherung vieler Kriterien an die *in vivo* Situation erreicht werden, eine physiologische Nachstellung der kutanen Form des Malignen Melanoms können diese aufgrund der Kultivierungsform jedoch nicht simulieren. Da die Tumormikroumgebung entscheidende Einflüsse auf das Wachstum und die Therapie hat und diese in multizellulären Sphäroiden nicht in vollem Umfang nachzuahmen ist, gewinnen organotypische Hautmodelle zunehmend an Bedeutung. Dieser Ansatz wurde bislang hauptsächlich durch die Integration von Melanomzelllinien in epidermal-dermale Modelle angewandt [110, 146-156]. Vollhautmodelle werden zwar in zahlreichen Forschungsprojekten verwendet, sind jedoch aufgrund einer schwierigeren Standardisierung noch nicht in regulatorisch anerkannten Richtlinien implementiert. Um Modelle für präklinische Studien nutzen zu können, müssen diese ein Up-scaling und ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit ermöglichen. Dies unterstreicht die Notwendigkeit, weniger komplexe *in vitro* Testsysteme zu entwickeln wie beispielsweise die rekonstruierte humane Epidermis. Epidermale Modelle mit integrierten Melanomen könnten die Lücke zwischen der Simplizität konventioneller

Zellkulturen oder Sphäroiden und der Komplexität von Vollhautäquivalenten und Tiermodellen schließen. Diese Form des Testsystems stellt die *in vivo* Situation in angemessener Weise nach und minimiert gleichzeitig die Anzahl der Variablen innerhalb des Systems.

Aus diesen Gründen wurde im Verlauf dieser Arbeit ein dreidimensionales *in vitro* Tumormodell entwickelt, das neben Tumorzellen auch die physiologische Umgebung des Tumors nachahmt und so nicht nur die Architektur, sondern auch die Kommunikation mit dem umliegenden Gewebe nachstellt. Es wurden zudem analytische Methoden entwickelt, die speziell auf die Anforderungen von dreidimensionalen *in vitro* Geweben zugeschnitten sind und die Möglichkeit bieten, Therapieeffekte quantitativ zu bewerten.

5.1. Entwicklung eines *in vitro* Modells des malignen Melanoms

Das maligne Melanom entwickelt sich in über 90% der Fälle aus einem Primärtumor ausgehend von den Melanozyten der basalen Epidermisschichten der Haut [157]. In der Epidermis regulieren Keratinozyten die Proliferation und Lokalisation von Melanozyten durch ein System aus parakrinen Wachstumsfaktoren und Zelladhäsionsmolekülen [158, 159]. Durch genetische Mutationen entstandene Melanomzellen entkommen der strengen Kontrolle der Keratinozyten durch Herunterregulierung von Adhäsionsmolekülen [30, 160]. Die Einbringung von Melanomzellen in ein epidermales Hautmodell kann daher die ersten Schritte in der Entstehung des malignen Melanoms simulieren und damit eine gute *in vivo* Korrelation aufweisen. Zudem bietet die Nutzung epidermaler Modelle den Vorteil, dass sie bereits hoch standardisiert hergestellt werden können und in der Kosmetik-, Chemie- und Pharmaindustrie zum Einsatz kommen. Als solche sind sie beispielsweise in die Testguidelines 431 und 439 der OECD implementiert [98, 99]. Beim malignen Melanom kommt es neben immunphänotypischen Variationen auch zu morphologischen Unterschieden des Tumorgewebes bzw. der daraus gewonnenen Zelllinien, was durch die Auswahl der verwendeten Melanomzelllinien zum Aufbau der Modelle in Betracht gezogen werden sollte [161]. Aufgrund unterschiedlicher Expressionsmuster von Melanombiopsaten war es bislang in der klinischen Diagnostik nicht möglich, einen Standardmarker zu definieren, sodass eine Kombination mehrerer Marker zur histopathologischen Sicherung notwendig ist [161, 162]. Die Unterschiede liegen im Mutationsprofil des einzelnen Tumors begründet und entscheiden nicht

zuletzt über klinische Parameter wie den Progress der Erkrankung und die Möglichkeit einer zielgerichteten Therapie. Die drei bekanntesten Onkogene, die im Zusammenhang mit der Entstehung eines malignen Melanom stehen, sind BRAF, NRAS und KIT [43]. Mutationen in diesen Onkogenen sind mit bestimmten histopathologischen Merkmalen verknüpft und können durch eine zielgerichtete Inhibition zur Verbesserung des Gesamtüberlebens von Patienten mit mutiertem metastasiertem Melanom führen [163]. Die für die vorliegende Arbeit genutzten Zelllinien MM127, MM96L, SKMEL28, D08 sowie A11, die bereits in diversen Gruppen zu Forschungszwecken verwendet wurden, wurden aufgrund ihres unterschiedlichen Mutationsprofils ausgewählt [164-171]. Berücksichtigt wurden dabei die zwei am häufigsten auftretenden Mutationen in den Onkogenen BRAF und NRAS. Zudem können aufgrund zahlreicher Vorarbeiten mit zweidimensionalen Modellen und Mausmodellen dieser Zelllinien Vergleiche zur dreidimensionalen Kultur gezogen werden. Zur zuverlässigen Identifikation der Melanomzellen in ihrer dreidimensionalen Umgebung dienten in dieser Arbeit die Melanom-Marker S100, Melan-A, HMB45 und MITF. Im Gegensatz zu allen anderen verwendeten Zelllinien war es für die Zellen der Linie MM127 nicht möglich, diese mit den genannten Markern zu identifizieren. Bestätigen konnten diese Beobachtung Haridas et al. [172]. In dieser Veröffentlichung war ebenfalls keine positive Immunreaktion gegen die Marker S100, Melan-A, HMB45, MITF und Tyrosinase zu detektieren. Die MM127-Zelllinie, die in dieser Studie verwendet wurde, entspricht den MM127-Zellen, die aktuell von der Cell Bank Australia erhältlich sind. Neuere Untersuchungen konnten NRAS-Mutationen der MM127 Zellen nachweisen, was nahelegt, dass es sich tatsächlich um Melanomzellen handelt, da diese in 15-20% der Fälle eine solche Mutation tragen [173]. Vereinzelt liegt eine NRAS Mutation jedoch auch im Dickdarmkarzinom und im Lungenkarzinom vor, sodass es sich um keine reine spezifische Mutation des malignen Melanoms handelt. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass die MM127-Zelllinie, die derzeit erhältlich ist, nicht mit der ursprünglich im Jahre 1979 beschriebenen Linie übereinstimmt [174, 175]. Die Ergebnisse, die mit dieser Zelllinie generiert werden, sind daher unter Vorbehalt zu betrachten. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen der Linie D08 ließen sich mit den Markern S100, Melan-A und MITF identifizieren, jedoch zeigte sich keine positive Reaktion auf HMB45. Neben dem Expressionsmuster unterschieden sich die untersuchten Zelllinien teils erheblich im Zelldurchmesser sowie in den Varianzen der Teilungsgeschwindigkeit voneinander, was dementsprechend auch in der

zweidimensionalen Kultur gezeigt wurde. Im dreidimensionalen Tumor-Modell der Zelllinien MM96L, SKMEL28 sowie A11 konnten in der Hämalaun-Eosin Übersichtsfärbung histologische Veränderungen in Form von atypischen Zellnestern entlang der dermoepidermalen Grenze dargestellt werden. Diese Melanomnester variieren in Größe und Form und haben teilweise hyperchromatische pleomorphe Nuklei. Die drei Zelllinien ließen sich sowohl im zweidimensionalen als auch im dreidimensionalen Modell durch die gewählten Marker identifizieren und lokalisieren. Im Gegensatz dazu traten bei den Melanommodellen der Linien MM127 und D08 keine Anomalitäten in der Histologie auf. Im Vergleich zur zweidimensionalen Kultivierung der Linie MM127 konnten im dreidimensionalen Modell vereinzelte positive Reaktionen auf S100 gezeigt werden. Da die S100-Proteinfamilie auch bei der Zell-Zell Kommunikation eine Rolle spielt, könnte hier der Crosstalk mit den Keratinozyten der entscheidende Parameter für die veränderte Expression sein [176]. Dieser Effekt sollte durch weiterführende Studien näher betrachtet werden. Obwohl die MM127-Zelllinie in zweidimensionalen Kulturen die mit 1,1 Tagen kürzeste Verdopplungszeit aller verwendeten Zellen aufweist, konnte im dreidimensionalen Modell übereinstimmend mit dem Verhalten der Zellen im Mausmodell kein Wachstum dargestellt werden (Daten wurden am QIMR Brisbane, AUS generiert; Vgl. Tabelle 4-1). Das umgebungsspezifische Wachstumsverhalten stellt den Unterschied von zweidimensionalen zu dreidimensionalen Modellen noch einmal deutlich heraus. Im dreidimensionalen Modell der Linie D08 zeigte sich ausschließlich im Bereich des *stratum corneums* eine positive Reaktion für S100. Innerhalb der vitalen Zellschichten der Epidermis war keine Färbung zu verzeichnen. Möglicherweise ist hierfür die Kontrolle des Wachstums der Melanomzellen durch basale Keratinozyten, die parallel zu den Melanomzellen ausgesät werden, verantwortlich. Undifferenzierte Keratinozyten können das Wachstum, die Morphologie und die Antigenexpression von Melanozyten durch direkten Zell-Zell-Kontakt kontrollieren [140, 177]. Dies legt nahe, dass die Proliferation und die Expression von tumorassoziierten Antigenen auf den Verlust von Kontakten der Melanomzellen zu undifferenzierten Keratinozyten zurückzuführen sein könnten. Durch einen erneuten Kontakt der Melanomzellen der Linie D08 mit basalen Keratinozyten könnte die Apoptose der Melanomzellen induziert worden sein, wodurch Melanomzellreste auf dem Modell vorhanden sein könnten, die mit dem S100 Antikörper anzufärben waren.

Die Tumor-Proliferation ist ein zentrales Merkmal der Melanomprogression. In melanozytischen Läsionen wurde die Ki67-Expression, die dem Nachweis der Zell-Proliferation dient, als zusätzlicher diagnostischer Biomarker vorgeschlagen. Die Rolle als prognostischer Biomarker wurde in dickeren primären Melanomen nachgewiesen [178]. Daneben bietet Ki67 die Möglichkeit, den Einfluss auf eine Therapie zu quantifizieren und wurde daher in das Panel mit aufgenommen [179]. In den dreidimensionalen Melanommodellen war im Bereich der durch die anderen Marker detektierten melanozytischen Läsionen eine im Vergleich deutlich erhöhte Ki67 Expressionsrate nachweisbar.

Zellen in der Haut kommunizieren über eine Reihe von Signalwegen miteinander [180]. Einer dieser Kommunikationswege ist als Notch-Signalweg bekannt und steht mit der epidermalen Homöostase und der Pathogenese von Hautkrankheiten in Zusammenhang. Zellen weisen auf ihrer Oberfläche Moleküle auf, sogenannte Notch-Liganden, die Notch-Rezeptorproteine auf der Oberfläche benachbarter Zellen aktivieren können. Sobald die Notch-Rezeptoren an diese Liganden binden, lösen sie verschiedene Reaktionen innerhalb der Zelle aus. Dieser Aspekt verdeutlicht, wie wichtig die dreidimensionale Orientierung und die Integration verschiedener Zellarten in *in vitro* Testsystemen sind. Notch-Liganden existieren in zwei verschiedenen Familien: (Dll)-Liganden und (Jag)-Liganden. Durch die immunhistologische Färbung der Notch-Liganden DLL1 und Jagged1 konnte gezeigt werden, dass durch das differenzierte dreidimensionale Gewebe der Epidermismodelle eine Mikroumgebung für die Melanomzellen geschaffen wird, die Notch-Liganden exprimiert. Die Erzeugung dieser Mikroumgebung ermöglicht Melanomzellen über den Kontakt zu Notch-exprimierenden Zellen die Fähigkeit zur Invasion [31]. Damit ließ sich beweisen, dass das vorliegende Modell eine Mikroumgebung schafft, wie sie *in vivo* vorliegt und wodurch die Invasion der Melanomzellen initiiert werden kann.

Die immunhistologischen Analysen konnten für die Melanommodelle der Linien A11, SKMEL28 sowie MM96L die Expression üblicher Melanommarker vergleichbar zur *in vivo* Situation demonstrieren. Durch die Färbung von Ki67 ist die Möglichkeit gegeben, einen Proliferationsmarker innerhalb der Modelle darzustellen, der für die Analyse der Therapie nutzbar ist. Die Färbung der Notch-Liganden weist auf die Notwendigkeit und den Einfluss der räumlichen Orientierung hin.

Neben histopathologischen Beurteilungen sind auch veränderte Stoffwechselfvorgänge Indizien, die zur Diagnose einer Neoplasie beitragen. Messungen bestimmter Metabolite und ihrer Konzentrationen können die zugrundeliegende biochemische Aktivität und den Zustand von Zellen bzw. Geweben widerspiegeln. Der Metabolismus bzw. das Metabolom von Tumorzellen unterscheidet sich stark von normalen Zellen und ist ein spezifisches Kennzeichen von Tumoren. Die bekannteste Abweichung des Stoffwechsels stellt die anaerobe Glykolyse, auch Warburg-Effekt genannt, dar [181]. Trotz normaler Sauerstoffbedingungen wird Glukose anders als üblich über einen anaeroben Abbauweg vermehrt zu Laktat verstoffwechselt [181, 182]. Dieser ineffiziente Energiegewinnungsweg ist durch einen stark erhöhten Glukoseverbrauch gekennzeichnet und stellt ein wichtiges Merkmal von Krebszellen dar. Tumorerkrankungen können so über die ¹⁸F-Desoxyglukose-PET mit einem bildgebenden Verfahren über die Aufnahme von radioaktiv markierter Glukose lokalisiert werden [183, 184]. In dem in dieser Arbeit entwickelten Melanommodell war ein signifikanter Anstieg bei allen Modellen sowohl im Glukoseverbrauch als auch in der Laktatproduktion im Überstand nachweisbar. Das Verhältnis von Glukoseverbrauch zu Laktatproduktion war bei den unterschiedlichen Melanomzelllinien jeweils ähnlich. Diese Beobachtung stimmt mit der Literatur überein, bei der Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten nachweislich mehr Glukose aufnehmen und diese vermehrt zu Laktat verstoffwechseln [182]. Damit zeigt das entwickelte Modell Stoffwechseleigenschaften, die sowohl mit der *in vivo* Situation als auch mit der *in vitro* zweidimensionalen Kultur übereinstimmen. Diese Eigenschaften können somit ähnlich zur *in vivo* Situation zur Untersuchung des Wachstums des Melanoms im Modell herangezogen werden.

Neben veränderten Stoffwechselprozessen gehört auch eine durch maligne Zellen veränderte Proteinsekretion zu den klassischen Merkmalen einer Neoplasie. Diese Veränderungen der Proteinsekretion zeigten sich auch in den artifiziellen Modellen. Untersucht wurde die Expression der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) 2 und 7, von Syndecan 1 und 4, Interleukin 1 alpha (IL-1 alpha) und Interleukin 8 (IL-8), Angiogenin, des *Parkinson disease protein 7* (PARK7), von Tensascin, des Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) sowie von Fibronectin in den Tumormodellen im Vergleich zu den epidermalen Modellen. Autokrine Wachstumsfaktoren (z.B. IL-8 und manchmal IL-6), die von Melanomzellen produziert werden, stimulieren die Proliferation der produzierenden Zelle selbst, während parakrine Wachstumsfaktoren (z.B. IL-1 und

VEGF) die Mikroumgebung zum Vorteil des Tumorwachstums und der –invasion modellieren. Da die Expression von IL-8 mit dem metastatischen Potenzial von Melanomzellen korreliert, lässt sich folgern, dass die Linie A11 innerhalb des Modells aufgrund der höchsten Expression von IL-8 die stärkste Eigenschaft zur Metastasierung aufweist [185]. Für IL1- α dagegen wurde die schwächste Expression bei der Linie A11 gemessen. Ein möglicher Erklärungsansatz hierfür liegt in der unterschiedlichen Expression des Zytokins durch Melanomzellen und Melanozyten. Zwar können Melanomzellen IL1- α und – β exprimieren, nicht aber normale Melanozyten [186]. Der Melanomzelllinie A11 könnte diese Eigenschaft fehlen, was durch weitere Untersuchungen in einer zweidimensionalen Monokultur überprüft werden sollte. Die Expression von IL1 ist auch *in vivo* nicht in jedem Melanom zu finden [187]. Die Degradation von Basalmembranen und extrazellulärer Matrix ist ein wesentlicher Schritt in der Melanomzellmigration, der Invasion und Metastasenbildung. Matrix-Metalloproteinasen spielen eine entscheidende Rolle in diesen komplexen mehrstufigen Prozessen. Melanomzellen können eine Anzahl von Mitgliedern der Matrix-Metalloproteinase-Familie sowie ihre Gewebeinhibitoren exprimieren [188]. Neben IL-8 zeigt die Linie A11 auch für die MMPs 2 und 7 die stärkste Expression und bestätigt die unterschiedliche Metastasierungs-kapazität der Zellen. Aktives MMP2 wurde laut Literatur nur in hochinvasiven Zelllinien beobachtet und war in nicht oder schlecht invasiven Zelllinien nicht vorhanden [189]. Ob sich die durch die Proteinsekretion ergebenden unterschiedlichen Metastasierungs-kapazitäten der Zellen auch auf das Verhalten der Zellen auswirken, lässt sich im epidermalen Modell nicht nachweisen. Das generierte epidermale Modell verhindert durch die integrierte Polycarbonatmembran (Porengröße 0,4 μm), die unter der basalen Keratinozytenschicht liegt, eine Invasion der Melanozyten. Zur weiteren Untersuchung müsste das ebenfalls in dieser Arbeit etablierte Melanommodell mit integriertem dermalen Anteil genutzt werden. Durch ihre Rolle in der Regulation von Zelladhäsion, -proliferation und -differenzierung stellen Syndecan-Proteoglykane Schlüsselregulatoren der Tumordinvasion und Metastasierung dar [190]. Im Gegensatz zu allen anderen gemessenen Faktoren ist die Expression von Syndecan 4 in allen untersuchten Tumormodellen herabreguliert. Syndecan 4 wird in normalen Geweben häufig exprimiert und ist ein wichtiges Adhäsionsmolekül [191, 192]. Es ließ sich bereits eine statistische Korrelation zwischen dem Vorhandensein von Syndecan 1 in hochgradig malignen Tumoren und dem Fehlen von Syndecan 4 feststellen [193].

VEGF als dominierender Wachstumsfaktor der Angiogenese und das Onkogen DJ-1 / PARK7 wird von allen 3 Zelllinien verstärkt exprimiert.

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass das entwickelte Modell hinsichtlich Histopathologie, Stoffwechselfvorgängen und Proteinsekretion sehr gut mit der *in vivo* Situation korreliert. Damit stellt es als humanes dreidimensionales Tumormodell eine vielversprechende Option dar, um die Lücke zwischen zweidimensionalen Kulturen und Tiermodellen zu schließen. Die reine Entwicklung von *in vitro* Modellen ist jedoch nicht ausreichend. Die Etablierung von geeigneter Analytik und vor allem von nicht-invasiven Analyseverfahren stellt die zweite Hürde dar, die zu überwinden ist um ein aussagekräftiges Werkzeug für die Forschung bereitstellen zu können. Eine Übertragbarkeit von Analyseverfahren wie sie aus der zweidimensionalen Kultur bzw. aus der Klinik bekannt ist, ist oftmals nicht bzw. nicht direkt möglich. Ein Messprinzip, das sich bisher noch nicht auf die *in vitro* Situation übertragen ließ, ist die Bestimmung des transepidermalen Wasserverlusts, der die Barrierefunktion der Haut widerspiegelt. Für den Aufbau von Melanommodellen ist eine korrekte Barrierefunktion der Haut trotz integrierter Melanomzellen wichtig. Im Falle einer Anwendung des Testsystems im Bereich topischer Behandlungen ist eine intakte Barrierefunktion notwendig, um Substanzen unter möglichst physiologischen Bedingungen untersuchen zu können. Derzeit sind topische Behandlungen mit Immunmodulatoren bei nicht-operablen Satelliten- und In-transit-Metastasen von malignen Melanomen empfohlen [194]. Zur Messung der Barrierefunktion wird momentan im Bereich der *in vitro*-Modelle die Impedanzmessung als nicht-invasives Verfahren verwendet [195]. Dieses ist allerdings mit Einschränkungen bei topischen Behandlungen verbunden, da apikal Messlösungen eingesetzt werden müssen. Innerhalb dieser Arbeit sollte aus diesen Gründen eine weitere Messmethode zur nicht-invasiven Bestimmung der Hautbarriere herangezogen werden. Eine Möglichkeit hierzu bietet die Bestimmung des transepidermalen Wasserverlusts. Es ist ein Verfahren, das *in vivo* zur Messung der Hautbarriere bereits angewandt wird, jedoch bisher nicht zur Messung von Hautäquivalenten *in vitro* einsetzbar ist. Der TEWL beschreibt den regulären konstitutiven Verlust von Wasserdampf über die Haut in Abwesenheit von Schweißdrüsenaktivität. Er wird üblicherweise als Maß der Hautbarrierefunktion zu Beginn oder nach einer topischen Behandlung angesehen. Frühere Studien zeigten, dass die Exposition der Haut gegenüber bestimmten chemischen und physikalischen

Belastungen zu Störungen der Hautbarrierefunktion führt, was durch eine Erhöhung der TEWL-Raten angezeigt wird. Die Messung der TEWL-Raten als Verfahren zur nicht-invasiven Bewertung der Hautfunktion bei erkrankter und geschädigter Haut findet bereits breite klinische Anwendung in Wirksamkeitstest von Hautpflegeprodukten und Pharmazeutika [196]. Grundsätzlich wäre die Anwendung des Verfahrens als ein nicht-invasives Verfahren mit hoher klinische Relevanz auch im Bereich der *in vitro* Hautmodelle wünschenswert. Die wenigen Studien, die sich bislang mit einer *in vitro* Anwendung befassten, konnten keine oder eine nur unzureichende Korrelation zur *in vivo* Situation feststellen [197-199]. Als Gründe sind hierfür die zum Teil von der *in vivo* Situation stark abweichenden Messbedingungen oder die Verwendung von kryokonservierter *ex vivo* Haut zu nennen. Mit Hilfe einer eigens für die Anwendung im *in vitro* Bereich und abgestimmt auf die spezielle Konfiguration der epidermalen Modelle entwickelten Messplatte ließen sich in der vorliegenden Arbeit Ergebnisse erzielen, die stark mit der Barrierefunktion, die mittels des etablierten Impedanzmessverfahrens ermittelt wurde, korrelieren. Die Messung der Impedanz stellt ein nicht-invasives Verfahren dar, aus dessen Spektren elektrische Eigenschaften wie die Kapazität und der Ohmsche Widerstand extrapoliert und daraus der transepidermale elektrische Widerstand (TEER) abgeleitet werden kann [195]. Die messbaren elektrischen Parameter können Auswirkungen der mechanischen und chemischen Störung der epidermalen Integrität quantifizieren oder Effekte der Stärkung oder Regeneration der Hautbarriere feststellen. Standard-Messsysteme zur Bestimmung des TEER Wertes wie das EVOM-System nutzen zur Messung eine Frequenz von 12,5 Hz. Allerdings wurden diese Systeme entwickelt, um einschichtige Epithelien und Endothelien zu evaluieren [200]. Die Ergebnisse einer Studie beweisen bereits, dass die Aussagekraft des TEER-Wertes bei 12,5 Hz für dreidimensionale Gewebe limitiert ist. Die beste Vorhersagekraft und Robustheit ließ sich bei 1000 Hz erzielen [124]. Auch der Vergleich des in dieser Studie erhaltenen TEWL-Wertes zur Impedanz bei 12,5 Hz, 100 Hz und 1000 Hz zeigt bei 1000 Hz die größte Korrelation und bestätigt die Aussagekraft des neu etablierten Messparameters bei 1000 Hz [124]. Im Verlauf der Reifung des Hautmodells kam es zur Ausbildung eines *stratum corneums*, was letztendlich zu einer Steigerung der Barrierefunktion führte. Gemessen wurde die Steigerung der Barrierefunktion über die Kulturzeit. Diese führte zu einem ansteigenden TEER- und einem fallenden TEWL Wert. Beide Messungen zeigten an Tag 20 der Kultur die stärkste Barriere. Im Verlauf war stets eine sehr gute Korrelation

der Messmethoden sichtbar. Tag 20 der Kultur und damit der Tag, an dem die höchste Barriere gemessen wurde, entspricht dem Anwendungstag von bereits etablierten epidermalen Modellen zur Testung der Hautirritation nach der OECD Testrichtlinie [201, 202]. Die Verlängerung der Kultivierungszeit über diesen Punkt hinaus war durch einen fallenden TEER bzw. ansteigenden TEWL-Wert gekennzeichnet, was einen Zerfall der Barrierefunktion impliziert. Dies kann mit der bekanntermaßen begrenzten Kulturzeit von *in vitro* Modellen assoziiert werden [203]. Über die nichtinvasiven Verfahren TEWL und Impedanz ließ sich jedoch kein Unterschied zwischen RHE-Modellen und Tumormodellen nachweisen. Die Hautbarrierefunktion war bei den Modellen mit integrierten Melanomzellen vergleichbar zu reinen epidermalen Modellen. Die Bestimmung des TEWL stellt damit keine geeignete Methode zur Untersuchung eines Therapieerfolgs dar. Jedoch konnte mit der Messung des TEWL und der Impedanz die korrekte Differenzierung durch die Entstehung eines *stratum corneums* mit gleichzeitiger Ausbildung einer Hautbarriere auch für die Melanommodelle nachgewiesen werden. Diese Eigenschaft ist essentiell, um das hier entwickelte Melanommodell als Testsystem für Anwendungen im Bereich der topischen Medikamentenapplikation nutzen zu können.

Eine in der Klinik weit verbreitete Methode zur Diagnostik und zum Staging von Tumoren stellt die funktionelle Bildgebung mittels 2-Deoxy-2- [18F] -fluor-D-glucose-Positronen-Emissions-Tomographie (FDG-PET) dar [204]. In einer *in vitro* Studie konnten mit dieser bereits erste Erfolge erzielt werden, indem Tumorzellcluster in einem *in vitro* Tumormodell nachgewiesen und untersucht werden konnten [205]. Leider stellt die Auflösungsgrenze des μ PET-Scanners von 1,4 mm die direkte Übertragung der klinischen Methode auf die *in vitro* Situation vor unüberwindbare Hindernisse, da es sich in den meisten Fällen um miniaturisierte Modelle handelt. Auch in der zweidimensionalen Zellkultur werden für Studien, die sich mit der Glukoseaufnahme beschäftigen, üblicherweise Radiotracer wie 2-Deoxy-d- [14C] Glukose oder 2-Deoxy-d- [3H] Glukose verwendet. Hiermit sind allerdings Nachteile wie die Entsorgung von radioaktivem Abfall oder die Bereitstellung von spezieller Geräte- und Laborausstattung verbunden. Die direkte Messung der Glukoseaufnahme in einzelnen lebenden Zellen ist ebenfalls nicht möglich [206]. Überwunden werden können diese Nachteile durch das fluoreszierende d-Glukose-Analogon 2- [N- (7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino] -2-desoxy-d-glucose (2-NBDG)[206-208].

Innerhalb dieser Studie ließen sich so über die Nutzung von Fluoreszenzmikroskopen Tumorcluster in den *in vitro* Modellen lokalisieren. Eine Übertragung und Anpassung der für zweidimensionale Kulturen etablierten Methoden auf dreidimensionale Modelle war somit erfolgreich. Diese Methode lässt sich mittels einfacher Laborausstattung ausführen und ermöglicht die Lokalisation von sehr kleinen Tumorclustern durch das höhere Auflösungsvermögen der Fluoreszenzmikroskopie. Eine nun mögliche dreidimensionale räumliche Zuordnung innerhalb des gesamten Tumormodells stellt so einen bedeutenden Vorteil gegenüber herkömmlichen histologischen Analysen dar. Da nahezu sämtliche Tumoren über einen veränderten Glukosestoffwechsel verfügen, bietet die Beurteilung dessen durch den neu entwickelten Assay einen generellen und weit einsetzbaren Ansatz in der Untersuchung von Tumormodellen im *in vitro* Modell. Die Beurteilung der Wirksamkeit von verschiedensten Therapeutika auf unterschiedliche Zelltypen wird so ebenfalls möglich.

Um die Anwendbarkeit des Modells für das Wirkstoffscreening zu untersuchen, wurden die Melanommodelle mit dem in der klinischen Therapie des metastasierten Melanoms verwendeten Inhibitor des Onkogens BRAF Vemurafenib behandelt. Die Angabe der mittleren inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) stellt dabei einen Standard zur Ermittlung von therapeutischen Wirksamkeiten dar und wird über die metabolische Aktivität in zweidimensionalen Zellkulturen ermittelt [209]. Der IC₅₀ bezeichnet die Konzentration eines Wirkstoffes, bei der eine halbmaximale Inhibition zu beobachten ist und wird in der Regel über die Viabilität der Zellen bestimmt [210]. Die Behandlung sollte daher sowohl in der zweidimensionalen Zellkultur als auch in organotypischen Hautmodellen über die Bestimmung der Viabilität beurteilt werden. Neben der selektiven Wirkung des Therapeutikums auf Melanomzellen sollte der Einfluss auf Fibroblasten und Keratinozyten untersucht werden. In der zweidimensionalen Zellkultur blieben primäre humane Fibroblasten sowie die Melanomzelllinien MM127, D08 und A11 gegenüber Vemurafenib resistent. Die Viabilität der Melanomzelllinien SKMEL28 und MM96L nahm hingegen mit steigender Vemurafenib-Konzentration ab. Ausschließlich Melanomzellen, die eine BRAF^{V600E} Mutation tragen, zeigten folglich eine Reaktion auf die Behandlung. Mutationen des BRAF-Gens haben eine Aktivierung von BRAF-Proteinen zur Folge, wodurch die Zellproliferation auch in Abwesenheit assoziierter Wachstumsfaktoren ausgelöst werden kann [14]. Präklinische Daten aus biochemischen Versuchen haben gezeigt, dass Vemurafenib ein potenter Inhibitor der

BRAF-Serin-Threonin-Kinase mit aktivierenden Mutationen im Kodon 600 ist [211, 212]. Die Wirksamkeit von Vemurafenib wurde ebenfalls in klinischen Studien an Patienten bewertet und geprüft [213, 214]. Nach diesen Studien liegt die empfohlene Dosis von Vemurafenib zwischen 960 mg und 720 mg (2-mal täglich) für Melanompatienten mit BRAF-Mutation. In einer Phase-II-Studie mit einer Dosis von 960 mg lag die Plasma-Vemurafenib-Konzentration bei ca. 50,0 µg/ml (100 µM). Im Vergleich zur *in vivo* Situation sind die in dieser Studie verwendeten Konzentrationen von Vemurafenib (1 und 5 µM) relativ niedrig. Hier ist jedoch anzumerken, dass die Plasmakonzentration nicht mit der Konzentration im Zielgewebe bzw. der Zielzelle übereinstimmt. Da die Konzentration von Vemurafenib bei Erreichen der Haut unbekannt ist, wurden die Werte mit Literaturangaben aus *in vitro* Studien abgeglichen. Zwar entstehen im dreidimensionalen Modell ähnlich zur *in vivo* Situation Diffusionsbarrieren, jedoch kommt es zu keiner Verteilung in umliegende Gewebe und Organe [215].

Primäre humane Keratinozyten zeigten in der in dieser Arbeit untersuchten zweidimensionalen Kultur ebenfalls eine drastische und konzentrationsabhängige Abnahme der Viabilität nach Behandlung mit Vemurafenib, wohingegen die dreidimensionalen Epidermismodelle keine Reduktion der Viabilität nach der Behandlung aufwiesen. Dieses Ergebnis bestätigt ebenfalls eindrucksvoll die Unterschiede verschiedener Kultivierungsformen. Der zytoprotektive Effekt der dreidimensionalen Kultivierungsform wurde in vorangegangenen Arbeiten bestätigt [216]. *In vivo* ließ sich ein Einfluss auf Keratinozyten durch das gehäufte Auftreten von kutanen Plattenepithelkarzinomen und Keratoakanthomen bei Patienten, die mit BRAF-Inhibitoren behandelt wurden, beobachten [217, 218]. Diese Läsionen sind durch eine verstärkte Proliferation der Keratinozyten gekennzeichnet und weisen damit das gegenteilige Verhalten der in dieser Studie beobachteten Keratinozyten auf. Es gibt Hinweise darauf, dass die Verwendung eines mutationsspezifischen BRAF-Inhibitors zu einer paradoxen Aktivierung des Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) -Wegs in Zellen mit Wildtyp-BRAF führen kann [219]. Die molekularen Mechanismen, die diesem Phänomen zugrunde liegen, sind bislang unbekannt. Eine Studie, die den Einfluss von Vemurafenib auf die Viabilität, die Proliferation sowie die Invasion von humanen immortalisierten Keratinozyten der Zelllinie HaCaT untersucht, zeigte, dass es zwar zu einem zytotoxischen Effekt auf die HaCaT Zellen kommt, dieser aber im Vergleich zu BRAF mutierten Zellen deutlich geringer ausfällt.

Gleichzeitig war jedoch eine gesteigerte Proliferation der verbliebenen Zellen zu beobachten. In der vorliegenden Studie war ebenfalls ein zytotoxischer Einfluss von Vemurafenib auf primäre Keratinozyten feststellbar. Dieser war zudem stärker als bei den Melanomzellen mit BRAF-Mutation und könnte an der Verwendung der primären Zellen im Vergleich zu der immortalisierten HaCaT Zelllinie liegen [215]. Welchen Einfluss hierbei unterschiedliche Zelllinien ausüben, ist nur durch einen direkten Vergleich zu spezifizieren. Anders als bei Melanomzellen mit BRAF^{V600E}-Mutation kommt es bei primären Keratinozyten nicht zu einem gezielten G1-Zellzyklus Arrest, was sich durch eine Analyse des Zellzyklus beweisen ließ. Ob neben dem zytotoxischen Effekt auch eine gesteigerte Proliferation einzelner Keratinozyten entsteht und inwiefern diese sich zwischen der zweidimensionalen und der dreidimensionalen Kultivierung unterscheidet, muss in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden.

Die dreidimensionalen epidermalen Melanommodelle der Linie MM96L und SKMEL28 weisen zwar ebenfalls einen signifikanten Rückgang der Viabilität nach der Vemurafenib-Behandlung auf, jedoch tritt dieser bei der Linie SKMEL28 erst bei einer Konzentration von 5 µM auf und ist bei beiden Linien deutlich schwächer ausgeprägt als in der zweidimensionalen Monokultur dieser Melanomzelllinien. Zum einen kann dies an der dreidimensionalen Orientierung und der Kokultivierung innerhalb eines *in vivo* ähnlichen Gewebekonstrukts liegen. Die daraus entstehende Diffusionsbarriere sowie der zelluläre Crosstalk könnten Faktoren sein, die zu einer verminderten Wirksamkeit führen. Zum anderen hat die Bestimmung der Viabilität über die Messung der metabolischen Aktivität des gesamten Modells den entscheidenden Nachteil, dass keine Differenzierung der Viabilität der einzelnen im Modell enthaltenen Zelltypen möglich ist. Die Bewertung der Viabilität der Modelle zeigte nur geringe Effekte und unterstreicht die Notwendigkeit prädikativerer Messmethoden.

Da die dreidimensionalen Melanommodelle aus Keratinozyten und Melanomzellen generiert werden, erfordert die Analyse spezifische Methoden, die eine Unterscheidung zwischen beiden Zellpopulationen ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal ein Protokoll etabliert werden, das es ermöglicht, entweder Keratinozyten oder Melanomzellen spezifisch aus den Modellen zu reisolieren. Dem zugrunde liegt das Adhäsionsverhalten von Melanomzellen, das sich nachweislich durch die veränderte Expression von Adhäsionsstrukturen von Melanozyten unterscheidet [220]. Zurückzuführen ist dieses reduzierte

Adhäsionsverhalten der Melanomzellen unter anderem auf die verminderte Expression von Syndecan 4, die im Modell über den Nachweis der Proteinsekretion feststellbar war. Die enzymatische Dissoziation mit Accutase führte im Epidermismodell nicht zum Herauslösen von einzelnen intakten Keratinozyten. Im Gegensatz dazu gelang dies bei den Melanomzellen im Melanommodell. Trypsin dagegen ermöglichte die Untersuchung von herausgelösten Keratinozyten aus dem epidermalen Modell. Über eine anschließende Antikörperfärbung war die spezifische Auftrennung über den enzymatischen Verdau mit Reinheitsgraden von deutlich über 90% nachweisbar. Eine Auftrennung über spezifische Oberflächenantigenen wie es z.B. beim Magnetic Activated Cell Sorting (MACS) der Fall ist wird so für dieses Modell überflüssig. Zwar sind diese Methoden sehr spezifisch, sie besitzen jedoch deutliche Nachteile wie hohe Kosten und einen hohen Verlust an Zellen. Da es sich bei *in vitro* Modellen um sehr kleine Konstrukte handelt, bei der im Verhältnis sehr wenige Zellen messbar sind, stellt ein Verlust von Zellen eine große Limitation dar. Die hier entwickelte Methode, die sich das veränderte Adhäsionsprofil zur Auftrennung der Zellen zunutze macht, hat zudem den Vorteil, dass sie auch auf andere Tumorarten übertragbar ist.

Da die Bewertung von einzelnen im Modell enthaltenen Zellen nur durch die vorherige Dissoziation des Gewebes möglich ist, stellt die Auftrennung dieser einen entscheidenden Schritt in der Analyse dar. Die Nutzung von durchflusszytometrischen Analysen im Anschluss an die Reisolierung ermöglichte die Beurteilung der einzelnen Zellen und bot die Möglichkeit einer Quantifizierung von Therapieeffekten. Innerhalb der Arbeit war es dadurch möglich, die Fluoreszenzintensitäten des aufgenommenen Glucose-Analogons zu quantifizieren und den Proliferationsstatus der einzelnen Zellen über eine Ki67-Färbung sowie eine Zellzyklusanalyse zu untersuchen. Ausgelöst durch Mutationen in Protoonko- sowie Tumorsuppressorgenen kommt es bei Krebszellen zu einer nicht limitierenden Proliferation. Normale Säugetierzellen dagegen weisen eine endliche Lebensdauer auf, was als Schutzmechanismus gegen unbegrenzte Proliferation angesehen wird. Dieses Phänomen, Seneszenz genannt, wird durch Telomerverkürzung angetrieben [221, 222]. Da trotz der äußerst vielfältigen und heterogenen Eigenschaften von Tumorerkrankungen die deregulierte Zellproliferation und der unterdrückte Zelltod für die Entwicklung nahezu aller Tumorentitäten nötig sind, stellen diese Parameter wichtige Targets für die

Tumorthherapie dar [223]. Die Auswirkungen der Behandlung mit Vemurafenib auf den Zellzyklus wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht, um Veränderungen in den G1-, S- und G2-Phasen des Zellzyklus zu bestimmen. In Übereinstimmung mit anderen Studien inhibierte der Wirkstoff Vemurafenib den Zellzyklus mit einem G1-Arrest in allen BRAF^{V600E} mutierten Zelllinien, während kein Effekt in den natürlich resistenten Zelllinien D08, MM127 und A11 auftrat [224, 225]. Nicht nur die Behandlung hatte Auswirkungen auf den Zellzyklus der Melanomzellen, auch die Kultivierungsart führte zu signifikanten Unterschieden. Die Zelllinien MM96L und SKMEL28 wiesen im dreidimensionalen Modell gegenüber einer zweidimensionalen Kultivierung eine signifikant größere Population an Zellen in der G0 sowie eine signifikant reduzierte Zellpopulation der S und G2/M Phase auf. Die Linie A11 zeigte zwar einen ähnlichen Trend, statistische Signifikanz ließ sich hier allerdings nicht erreichen. Ein zentraler Nachteil von zweidimensionalen Kulturen ist ihre artifiziell erhöhte Proliferationsrate [66]. Dies führt in der präklinischen Testung von Wirkstoffkandidaten, die als Ziel die Hemmung der Proliferation haben, zu einer höheren Toxizität *in vitro* als im Anschluss klinisch zu beobachten ist [226]. Proliferierende Ki67-positive Tumorzellen konnten durch immunhistologische Färbungen in den Melanommodellen sowohl in basalen als auch in höheren Schichten der Epidermis detektiert werden. Durch eine Ki67 Färbung der aus dem Modell isolierten Zellen ließ sich die Proliferation zwischen zweidimensionalen Zellkulturen und *in vitro* dreidimensionalen Modellen vergleichen und zeigte deutlich die Reduktion der Ki67 positiven Zellen im dreidimensionalen Modell. Dass sich die Proliferationsrate von Tumorzelllinien innerhalb einer dreidimensionalen Matrix im Vergleich zu einer zweidimensionalen Kultur abhängig von der Zelllinie verringert, konnte bereits in einem Lungentumormodell gezeigt werden [205]. Auch innerhalb eines dreidimensionalen Darmkrebsmodells konnte eine reduzierte Proliferation festgestellt werden, die eine höhere Ähnlichkeit zur *in vivo* Situation aufweist als die nahezu 100% Ki67-positiven Zellen in herkömmlichen zweidimensionalen Zellkulturen [114]. Vemurafenib führte bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien MM96L und SKMEL28 zu einer Reduktion der Ki67 positiven Zellen. Auf Zellen der Linie A11 konnte kein Effekt gezeigt werden, was die selektive Wirksamkeit des Therapeutikums auf Zelllinien mit BRAF-Mutation eindeutig unterstreicht.

Auch bei Keratinozyten ließ sich ein Einfluss der Kultivierungsform auf den Zellzyklus detektieren, der abhängig vom Differenzierungsstatus ist. Zudem ließ sich der

Zellzyklus der *in vivo* Situation der Biopsate mit dem des Modells abgleichen. Die Mechanismen, die an der Regulation der Keratinozyten-Differenzierung beteiligt sind, sind stark aufeinander abgestimmt. Die Differenzierung geht mit einer gleichzeitigen Veränderung in den Expressionsmustern der Zellzyklusregulationsproteine einher [227]. Dies erklärt den Einfluss auf die Zellzyklusphasen, der durch die Kultivierung in der zweidimensionalen Kultur entsteht. Durch die Isolierung der primären Zellen entsteht eine Kultur mit vorwiegend basal undifferenzierten Keratinozyten. Erst nach dem Aufbau der dreidimensionalen Modelle und dem Zusatz von Calciumchlorid und Ascorbinsäurephosphat, die die Differenzierung stimulieren, entspricht die Verteilung des Zellzyklus wieder der *in vivo* Situation der Haut.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass *in vitro* Modelle, die die organspezifische Mikroumgebung nachahmen, wichtig sind, um die Tumorselektivität von Therapien nachzuweisen. Aus der Literatur geht ebenfalls hervor, dass primäre Keratinozyten durch Kombinationstherapien sensitiviert werden können, was von den Kultivierungsbedingungen sowie vom Differenzierungszustand der Zellen abhängig zu sein scheint [228-230]. Hieraus wird deutlich, wie notwendig ein *in vivo* getreues physiologisches humanes Modellsystem für die Therapieentwicklung und die Auswahl von neuen Wirkstoffkandidaten ist, um mögliche zytotoxische Effekte nachweisen und damit vorhersagen zu können.

Mit Hilfe des in der Klinik verwendeten Wirkstoffs Vemurafenib ließ sich belegen, dass das Modell zur Vorhersage der Wirkung gezielter Krebstherapien auf Tumore mit unterschiedlichen Treibermutationen einsetzbar ist. In der Therapieentwicklung sind die Wirkungen meist noch unbekannt. Für die Implementierung des Modells in die präklinische Therapieentwicklung kam der Wirkstoffkandidat natürlichen Ursprungs Dimethylacrylshikonin (DMAS) zum Einsatz. Bei der Suche nach neuen Medikamenten spielten Pflanzen und ihre Bestandteile schon immer eine entscheidende Rolle. Auch heutzutage sind etwa 49% aller neu zugelassenen Medikamente Naturprodukte oder direkt davon abgeleitet. Im Bereich der Tumorthapeutika beträgt die Anzahl natürlich inspirierter Substanzen über 70% [231]. Die Wurzeln des Raublattgewächses *Onosma paniculata* haben in der chinesischen Medizin zur Behandlung von diverseren Erkrankungen wie Hautinfektionen, Ekzemen und auch Tumoren eine lange Tradition. Forscher der Medizinischen Universität Graz konnten in *in vitro* Untersuchungen bereits die antitumorale Eigenschaft der Pflanze und einzelner darin enthaltener

Wirkstoffe bestätigen und eine Apoptoseinduktion in Caspase-abhängiger Weise nachweisen [232, 233]. Der Bestandteil Dimethylacrylshikonin (DMAS) zeigte die höchste wachstumshemmende Aktivität gegenüber einer Reihe von Melanomzelllinien und findet daher in dieser Studie Anwendung [233].

Neben dem Einsatz eines geeigneten Wirkstoffkandidaten wurde das Modell durch die Verwendung einer neuen Melanomzelllinie weiter an die Bedürfnisse der präklinischen Therapietestung angepasst. Sofern dreidimensionale *in vitro* Modelle der Haut mit Zellen aus primärem Biopsiematerial aufgebaut werden, spiegeln diese die *in vivo* Situation sehr akkurat wieder [202, 234]. Für den Aufbau von Tumormodellen werden jedoch meist Tumorzelllinien eingesetzt, die sich in ihrer Morphologie und im Phänotyp bereits stark von der *in vivo* Situation entfernt haben [235, 236]. Die Entwicklung von Melanomzelllinien, die vergleichbare Eigenschaften zum *in vivo* Zustand haben, ist daher insbesondere für die präklinische Therapietestung entscheidend. Die neuartige hochpigmentierte und gut charakterisierte NRAS-mutierte humane Melanomzelllinie MUG-Mel2 wurde durch die Kultivierung in einem Nanofibrillarcellulose-Hydrogel gewonnen, um den *in vivo*-Zustand so gut wie möglich zu erhalten [126]. So war es möglich, den Phänotyp des Melanoms - die stabile braune Färbung - über alle Passagen in der Zellkultur zu erhalten. Die Expression der Marker und die dendritische Zellmorphologie blieben ebenfalls konsistent. Zellkulturmodelle, die die Charakteristika des *in vivo*-Zustands auch nach langfristigen Kulturbedingungen beibehalten, sind entscheidende Forschungsmodelle, um neue und relevante Behandlungsziele zu erforschen. Die Erfüllung dieser Kriterien sollte durch die Verwendung der Zelllinie MUG-Mel2 zum Aufbau eines epidermalen Melanommodells gewährleistet werden. Die Integration und das Wachstum der Zelllinie MUG-Mel2 im dreidimensionalen Melanommodell zeigte große Ähnlichkeiten zu der *in vivo* Situation und zum Mausmodell [126]. Auch in der dreidimensionalen *in vitro* Kultur blieb die starke Pigmentierung der Zellen erhalten. Tumorcluster konnten dadurch bereits makroskopisch identifiziert werden.

Wie zuvor mit Vemurafenib etabliert, wurde der Einfluss von DMAS auf den Zellzyklus, die Stoffwechsellparameter Glucose und Lactat, die metabolische Aktivität und die Expression von Ki67 im Modell und in zweidimensionalen Zellkulturen untersucht. In der zweidimensionalen Kultur konnte bei allen Parametern ein starker Einfluss des Wirkstoffkandidaten detektiert werden. Die metabolische Aktivität ging nach Zugabe von DMAS auch bei Keratinozyten in 2D stark zurück. Die Zellzyklusanalyse zeigte

allerdings, dass es bei Keratinozyten im Gegensatz zu den Melanomzellen MUG-Mel2 zu keinem gezielten Zellzyklusarrest kommt. Die Ergebnisse für die zweidimensionale Kultur stimmen mit denen der Forscher in Graz überein. Für die dreidimensionalen Modelle war nur bei der Expression von Ki67 ein Einfluss von DMAS auf die Melanomzellen festzustellen. Um zu prüfen, ob diese veränderte Wirkung ausschließlich durch die dreidimensionale Orientierung verursacht wurde, fand eine Messung des Einflusses der Kulturbedingungen statt. Dabei zeigte sich, dass der Wirkstoff in hohem Maß an die Zellkulturoberflächen bindet, insbesondere auch an die Polycarbonatmembran der Inserts. Die Bindung des Stoffes führte letztlich zu einem Rückgang der Konzentration am gewünschten Wirkungsort. Zwar zeigte sich ein Rückgang der Viabilität auch in Inserts kultivierten Zellen, wie ein parallel sowohl auf einer flachen Oberfläche als auch im Insert durchgeführter zweidimensionaler Versuch demonstrierte, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß als auf der planen Oberfläche. Daraus lässt sich mutmaßen, dass sowohl die dreidimensionale Orientierung als auch die Kokultur eine veränderte Wirkung hervorrufen können. Beweisen lässt sich dies jedoch nur durch Applikation des Wirkstoffes in einer Formulierung, die eine Bindung verhindert und dennoch gewährleistet, dass der Stoff am gewünschten Wirkungsort ankommt.

Die Ergebnisse zeigen trotz allem, dass die Entwicklung eines malignen Melanoms innerhalb eines epidermalen Modells, welches sich zur Testung von Wirkstoffkandidaten und deren Formulierungen eignet, innerhalb dieser Arbeit erfolgreich umgesetzt werden konnte.

5.2. Weitere Annäherungen des Melanommodells an die *in vivo* Situation

Das entwickelte epidermale Melanommodell bietet ein System, das die Mikroumgebung des Tumors widerspiegelt sowie eine Standardisierung ermöglicht und so in Hochdurchsatz-Screenings implementiert werden kann. Einschränkungen weist es im Falle einer Anwendung im Bereich topischer Behandlungen auf. Hier ist eine Barrierefunktion nahe der *in vivo* Situation notwendig, um Substanzen unter möglichst physiologischen Bedingungen untersuchen zu können. Die Hautmodelle, die derzeit für die Forschung verwendet werden, bilden alle epidermalen Schichten wie sie auch in nativer humaner Haut vorkommen aus. Die unterschiedlichen Funktionen der Hautmodelle, insbesondere im Bereich der Barrierefunktion, sind allerdings noch nicht mit dem physiologischen Zustand nativer Haut vergleichbar. Hautmodelle weisen

gegenüber der nativen humanen Haut eine deutlich erhöhte Permeabilität auf [95, 118]. Eine Abschätzung der Wirksamkeit bzw. der Effekte von topisch aufgetragenen Substanzen ist bislang kaum möglich. Aus diesem Grund sind *in vitro* Epidermismodelle von regulatorischer Seite noch nicht für die Testung der Hautadsorption zugelassen. Im Falle einer Anwendung des in dieser Arbeit entwickelten Testsystems im Bereich topischer Behandlungen von Melanomen, zum Beispiel zur Behandlung nicht-operabler Satelliten- und In-transit-Metastasen mittels Immunmodulatoren, ist eine Barrierefunktion nahe der *in vivo* Situation notwendig, um Substanzen unter möglichst physiologischen Bedingungen untersuchen zu können. Ein Teilaspekt der Arbeit war daher die Heranführung der Barrierefunktion des *in vitro* Modells an den physiologischen Zustand. Eine Penetrationsstudie der *in vitro* Modelle auf Basis der OECD-Testrichtlinie 428 zeigte eine deutlich höhere Resorption von Coffein und Testosteron im Vergleich zu nativer Haut. Die geringere bis nichtvorhandene Verzögerungszeit im *in vitro* Modell ist ebenfalls auf die deutlich geringere Barriereeigenschaft *in vitro* zurückzuführen. Die erhaltenen Ergebnisse des epidermalen Modells bezüglich der mangelhaften Barrierefunktion der Hautäquivalente stimmt mit der Literatur überein [118].

In vivo sind als Ursachen für eine reduzierte Barriereeigenschaft eine veränderte Lipidzusammensetzung, der Einfluss der Luftfeuchtigkeit oder die Calcium-Homöostase zu nennen [119-122]. Kommt es zu einer veränderten Zusammensetzung der Lipide innerhalb des *stratum corneum*, wie zum Beispiel durch eine veränderte Kettenlänge oder eines veränderten Sättigungsstatus der Fettsäuren, kann dies die Barrierefunktion negativ beeinflussen [121, 237]. In anderen Arbeiten konnte zudem gezeigt werden, dass die verminderte Barrierefunktion aus Veränderungen der Lipidorganisation des *stratum corneum* resultiert, das bei *in vitro* Modellen hauptsächlich in hexagonaler und bei nativer Haut in einer dichteren orthorhombischen Anordnung vorliegt [118, 238-240]. Als Hauptgründe für diese veränderte Lipidorganisation werden ein verringerter Gesamtfettsäuregehalt und ein erhöhter Anteil an einfach ungesättigten Fettsäuren im Modell im Vergleich zum humanen *stratum corneum* aufgeführt [241, 242]. Für die Kultivierung von Hautmodellen wird in der Regel auf Medien zur Kultivierung von Keratinozyten zurückgegriffen. Diesen fehlt jedoch der Zusatz von Lipiden. Der Zusatz einer Lipidmischung, bestehend aus Fettsäuren (Arachidonsäure, Linolsäure, Linolensäure, Myristinsäure, Ölsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure) und Cholesterol zum Zellkulturmedium sollte daher in der

vorliegenden Arbeit die Bereitstellung aller notwendigen Fettsäuren gewährleisten und dadurch die Barriere positiv beeinflussen. Durch einen Barriertest war eine konzentrationsbedingte Veränderung der Barriere durch die Zugabe von definierten Lipiden feststellbar. Die besten Ergebnisse wurden durch die Zugabe von 1 mg/l erzielt und konnten bei drei unterschiedlichen Donoren statistisch signifikante Verstärkungen der Barriere erzielen. Eine Erhöhung der Konzentration der Lipidmischung über 1 mg/l führte zu einer schlechteren Barriereeigenschaft. Zu erklären ist dieses Verhalten mit einer Änderung der Einlagerung von Lipiden, was zu negativen Lipideigenschaften im *stratum corneum* führt [243]. Diese Ergebnisse stimmen mit den Ergebnissen von Thakoersing et al. überein, die ebenfalls feststellten, dass die Supplementierung mit Lipiden die Lipidzusammensetzung des *stratum corneum* und somit die Barrierefunktion der Haut beeinflusst [243]. Der Einfluss der zugesetzten Lipide auf das *stratum corneum* wurde durch immunhistologische Färbungen von Schlüsselenzymen und Strukturproteinen, die eine entscheidende Rolle bei der Bildung und Aufrechterhaltung der Barrierefunktionen spielen, bestimmt. Dafür wurden die Strukturproteine Filaggrin, Involucrin sowie Ceramide und das Enzym SDC-1 ausgewählt. Filaggrin hat zunächst eine strukturbildende Funktion durch Vernetzung der Keratin-Filamente und wird schließlich in Aminosäuren proteolysiert, die zum sauren pH-Gradienten des *stratum corneum* beitragen [244]. Durch Filaggrin-Gendefekte kommt es zu Hautkrankheiten wie der Ichthyosis vulgaris, die zu Funktions- und Strukturveränderungen des *stratum corneum* führen [245, 246]. Im Vergleich zum Standardprotokoll wurde ein stärkeres Signal im optimierten Modell beobachtet, was eine stärkere Barriere nahelegt. Bis zu 50% des Trockengewichtes der Lipide des *stratum corneum* werden aus Ceramiden gebildet. Bei einer Störung des Gleichgewichts der Ceramide kommt es zu trockener Haut oder zu krankhaften Hautveränderungen in Folge einer reduzierten Barriereeigenschaft. Das native Gewebe zeigte deutlich stärkere Signale im *stratum corneum* im Vergleich zu den RHE Modellen und bestätigt erneut die reduzierte Barriereeigenschaft der Modelle. Involucrin ist ein Transglutaminase-Protein, das als Anker zwischen dem *cornified envelope* und der Lipidhülle fungiert, einer Monoschicht interzellulärer unpolarer Lipide [247, 248]. Das Signal war im Standardprotokoll zwar stärker, jedoch scheint durch die Zugabe von Lipiden die Präsenz im *stratum corneum* verstärkt zu sein. Involucrin ist durch Veresterung hauptsächlich seines Glutamarestes an omega-hydroxylierte Ceramidspezies oder freie Fettsäuren gebunden [249, 250]. Eine veränderte

Expression von SCD1 wird mit einer Steigerung von ungesättigten Fettsäuren im *stratum corneum* und gleichzeitiger Verringerung der Barrierefunktion in Verbindung gebracht [119]. Die Lokalisation von SCD1 war in den Standard-Modellen im Vergleich zu nativer humaner Haut verändert. SCD1 war in nativer Haut fast ausschließlich im *stratum basale* nachzuweisen, während in beiden Modellen starke Signale auch in höheren Schichten detektiert wurden. Diese Beobachtungen stimmen mit denen der Literatur überein [119, 243].

Neben der Möglichkeit, Lipide als spezifische Bausteine zuzuführen, sollten hauteigene Prozesse zur Steigerung der Barrierefunktion genutzt werden. Je nach Häufigkeit der Anwendung und Konzentration von Detergenzien kommt es nach deren Anwendung als Hautreinigungsprodukt entweder zur Stimulation der Barrierefunktion oder zur Verminderung der Hautbarriere [251, 252]. In der vorliegenden Arbeit war durch eine einmalige Anwendung des Detergens Triton X-100 und eine nachfolgende Regenerationszeit eine Steigerung der Barriere möglich. Diese war abhängig von der Dauer der Anwendung. Eine zu lange Inkubationszeit wirkte sich negativ auf die Barrierefunktion aus. Studien zeigten bereits, dass die mRNA-Expression von Involucrin, Transglutaminase und Filaggrin konzentrationsabhängig als Reaktion auf die Exposition gegenüber Detergenzien anstieg [252]. Dies weist eine veränderte Expression von Markern der Keratinozytendifferenzierung nach. Auch eine Steigerung der mRNA-Expression von Enzymen, die Barrierelipide in Keratinozyten synthetisieren, war nach der Exposition gegenüber Detergenzien nachweisbar [252]. Eine Steigerung der Barrierefunktion konnte sowohl mittels Lipidzugabe als auch durch die Stimulation von Regenerationsprozessen erfolgen. Eine Hypothese ist, dass die Bereitstellung von Lipiden und eine zusätzliche Modulation der Enzymaktivität die Barriere weiter verbessern könnte [243]. Ob durch die Kombination der beiden entwickelten Methoden damit eine weitere Optimierung zu erreichen ist, soll in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Dies kann zur Entwicklung einer neuen Generation von Hautmodellen beitragen, die über Barriereigenschaften sowie eine Lipidzusammensetzung und -organisation verfügen, die noch vergleichbarer zu nativer humaner Haut ist.

Eine weitere Einschränkung des epidermalen Melanommodells liegt im Fehlen von zellulären Schlüsselkomponenten begründet. Prozesse der Invasion bzw. der Metastasierung von Melanomzellen sind bei vielen Fragestellungen wichtig und lassen

sich im epidermalen Modell nicht adressieren. Zell-Zell- bzw. Tumor-Stroma-Interaktionen spielen eine große Rolle im Krankheitsverlauf und in der Progression von Tumoren [253]. Diese bestehen letztlich nicht nur aus malignen Zellen, sondern aus einer komplexen dynamischen Mischung von Tumorzellen, Fibroblasten, Endothel- und Immunzellen, die miteinander interagieren und das Tumorstromawachstum vorantreiben [254, 255]. Fibroblasten im speziellen haben nachweislich einen Einfluss auf das Tumorstromawachstum, die Tumorstromorganisation sowie auf die Resistenzbildung bei Therapien des malignen Melanoms [256]. Diese sogenannten Krebs-assoziierten Fibroblasten (CAFs) stellen eine Schlüsselkomponente der Tumor-Mikroumgebung mit verschiedenen Funktionen dar [257]. Wie wichtig die Nachbildung der Tumormikroumgebung *in vitro* ist, ließ sich beispielsweise in einem dreidimensionalen Darmkrebsmodell zeigen. Nur unter dem Einfluss einer Kokultur mit Fibroblasten wurde die Bildung von tumorähnlichen Aggregaten, die von Fibroblasten umgeben waren, induziert [114]. Die Tumormikroumgebung hat ebenfalls starken Einfluss auf die Endothelzellen und fördert durch die Sekretion verschiedener Faktoren nicht nur deren Proliferation, sondern auch die Angiogenese bzw. Vasculogenese [30].

Daher ist die Erweiterung des epidermalen Melanommodells um eine Dermis und ein vereinfachtes Gefäßsystem von großem Interesse und soll dazu dienen, das Modell für weitere Fragestellungen nutzen zu können. Für tumorspezifische Untersuchungen ist die Integration weiterer Schichten und Zelltypen wichtig, um beispielsweise die Invasion oder die Angiogenese zu erforschen. Das erste Hautmodell bestehend aus einer dermalen und einer epidermalen Komponente beschrieben Bell et al. [92]. Seitdem wurden verschiedene Techniken zur Generierung einer dermalen Komponente entwickelt. Fibroblasten werden in natürlichen Hydrogelen aus Kollagen oder Fibrin [258, 259] oder auch in synthetischen Polymeren eingebettet [260-262]. Darüber hinaus wird die natürliche extrazelluläre Matrix der Dünndarmsubmukosa (SIS) als Membran verwendet [263]. Die SIS bietet neben einem dreidimensionalen Gerüst, das Zellmigration und räumliche Organisation ermöglicht, die Option, Wechselwirkungen zwischen Epithel- oder Mesenchymzellen und einer natürlich vorkommenden extrazellulären Matrix zu untersuchen. Zudem bietet sich durch das Aufbringen einer Endothelzellschicht die Möglichkeit, Angiogenesevorgänge näher untersuchen zu können. Die Endothelzellen bildeten eine für Gefäße typische geschlossene Schicht und wiesen den endothelzellspezifischen Marker CD31/PECAM-1 auf. Beim Vergleich einer synthetischen Membran mit der SIS zeigten

intestinale Epithelzellen ein physiologischeres Verhalten in den Bereichen Morphologie und Funktionalität bei der Verwendung der natürlichen Matrix [264]. Die SIS weist auch noch nach der Dezellularisierung die konservierte Crypt-Villus-Struktur des Dünndarms auf und führt so zu papillaren Strukturen an der dermoepidermalen Grenzfläche, wie sie auch in der nativen humanen Haut vorliegen. Diese Mikrostrukturierung führt sowohl bei der Erzeugung von *in vitro* intestinalem Gewebe, als auch im Bereich der Haut zu einer physiologischeren Morphologie. In den hydrogelbasierten Vollhautmodellen fehlen derartige papilläre Strukturen. Der Kollagengehalt liegt zudem in einem unphysiologischen Bereich, wodurch es zu einer Kontraktion der Äquivalente von bis zu 60% kommt, was sie für viele Fragestellungen unbrauchbar werden lässt [265, 266].

In beide der in dieser Arbeit entwickelten Vollhautmodelle ließen sich Melanomzellen erfolgreich integrieren und durch die Standardmarker HMB45, S100 und Melan-A nachweisen. Es kam zu einer Aufwärtmigration der Tumorzellen innerhalb der epidermalen Schicht, wobei eine Invasion in den dermalen Anteil nur in Ausnahmefällen zu identifizieren war. Eine Erklärung hierfür könnte die noch zu geringe Interaktion der Melanomzellen mit den differenzierten Keratinozyten der oberen epidermalen Schichten sein, was einer Übereinstimmung zur *in vivo* Situation entspricht. In der frühen Phase des Melanoms kommt es zunächst zu einer radialen Wachstumsphase mit Ausbreitung auch in höher gelegene Schichten der Epidermis bevor ein Übergang in ein invasives Stadium stattfindet, in dem die Tumorzellen die Basalmembran durchdringen und in die Dermis eindringen. Längere Kultivierungsdauern könnten demonstrieren, ob ein solch invasives Wachstum auch im Melanommodell darstellbar ist und die Hypothese der Übereinstimmung des Wachstumsverhaltens der Modelle und der *in vivo* Situation festigen. Im Vergleich zu den epidermalen Modellen war histologisch ein vermindertes Wachstum von Melanomzellen in den Vollhautmodellen zu beobachten. Zwar konnten Golan et al. nachweisen, dass Melanomzellen mit einer höheren Rate wachsen, sofern sie mit Endothelzellen kokultiviert werden [31]; diese Beobachtung scheint nach den ersten Eindrücken im dreidimensionalen Vollhautmodell jedoch nicht zuzutreffen. Vielmehr führte die dreidimensionale Orientierung, die Kokultivierung sowie die Kultivierungsbedingungen zu einer Reduktion der Proliferationsraten und damit zu einer Annäherung an die *in vivo* Situation.

Durch die beschriebene Weiterentwicklung ist nun ein Modell entstanden, das über einen dermalen sowie endothelialen Anteil innerhalb einer natürlichen Matrix verfügt. Es gewinnt dadurch deutlich an Aussagekraft und bietet die Möglichkeit, weitere Fragestellungen innerhalb der Forschung zu adressieren.

6. Fazit und Ausblick

Die in dieser Arbeit entwickelten *in vitro* Testsysteme des Melanoms spiegeln in vielen Punkten die *in vivo* Situation wider (Abbildung 6-1). Das epidermale Modell bildet diese zwar nur vereinfacht ab, bietet jedoch die Möglichkeit des *upscaling* und verfügt über ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit. Dadurch ergeben sich eine Reihe von Anwendungen in der präklinischen Testung, im Wirkstoffscreening oder auch als Einsatz in der personalisierten Medizin. Das Vollhautmodell nähert sich deutlich an die *in vivo* Situation an. Mit der Integration weiterer Zellarten, der Verwendung einer natürlichen Matrix und einer vereinfachten Gefäßstruktur bildet es die wichtigsten Komponenten der physiologischen Situation ab. Die starke Erhöhung der Komplexität wirkt sich jedoch negativ auf die Erhöhung des Durchsatzes sowie die Reproduzierbarkeit aus. Eine Anwendung erscheint somit zunächst nur für Forschungszwecke sinnvoll.

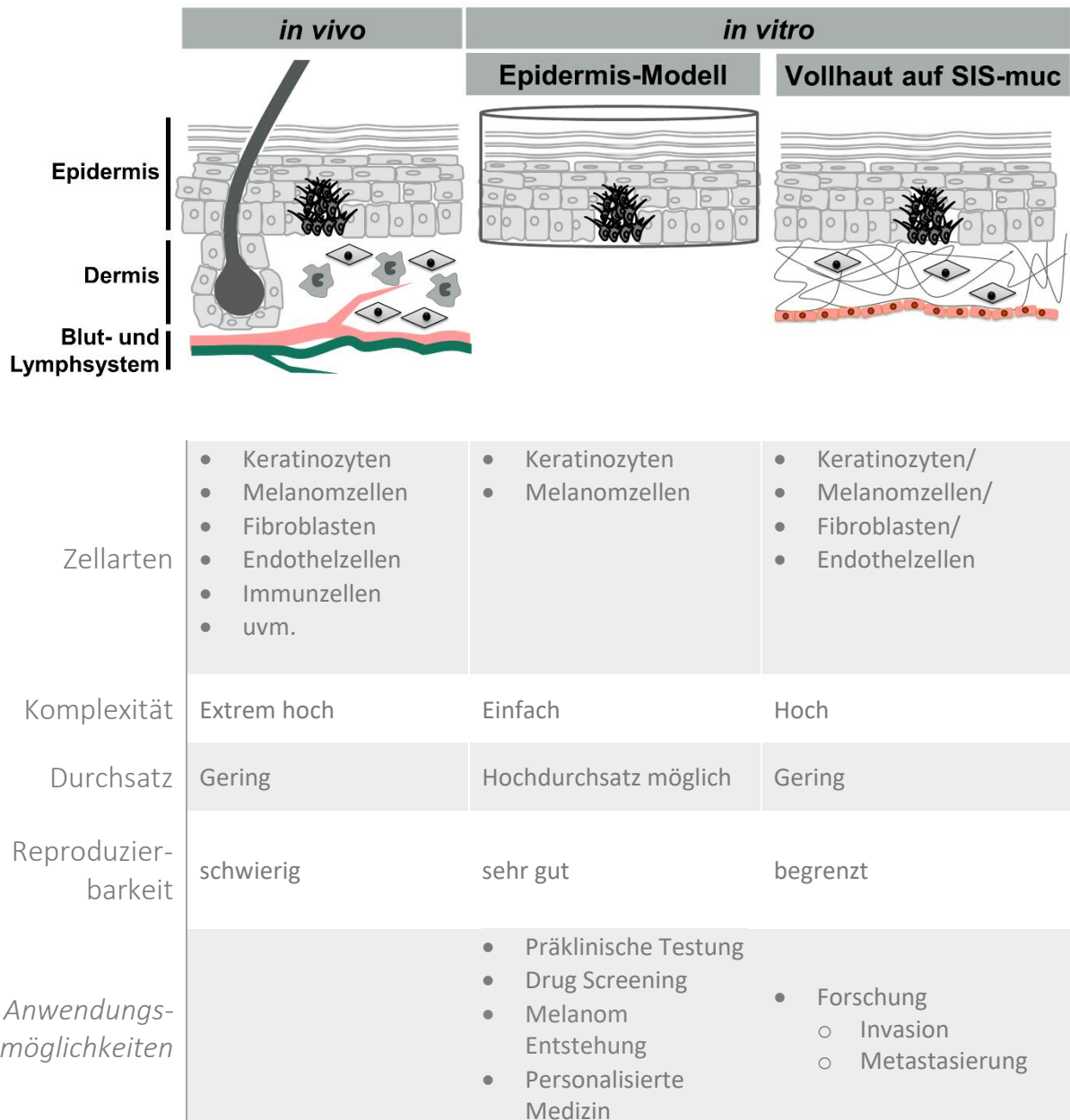


Abbildung 6-1: Vergleich der *in vivo* Situation mit den entwickelten Modellen

Graphisch ist der Aufbau der Haut *in vivo* sowie des epidermalen und des Vollhautmodells auf SIS-muc dargestellt. Tabellarisch sind die Unterschiede der Modelle zur *in vivo* Situation aufgeführt.

Das entwickelte dreidimensionale epidermale Modell bietet einen sehr guten Kompromiss zwischen Standardisierung und wissenschaftlicher Aussagekraft. Wie dargestellt, eignet es sich zur präklinischen Testung von Wirkstoffkandidaten, womit es als Werkzeug in der Arzneimittelforschung nützlich sein kann. Die Untersuchungen mit dem BRAF-Inhibitor Vemurafenib demonstrierten, dass zielgerichtete Therapien im Modell beurteilt werden können. Neben diesen zeigen bei der Behandlung des malignen Melanoms auch spezifische Immuntherapien eine signifikante Erhöhung der

Überlebensrate von Patienten [267]. Dem hier vorgestellten Modell fehlen zur Forschung in diesem Bereich zelluläre Komponenten des adaptiven Immunsystems. Durch die Integration von T-Zellen kann aus dem Modell eine immunkompetente Testplattform zur Überprüfung der Wirksamkeit von Immuntherapeutika wie Checkpoint-Inhibitoren oder chimären Antigenrezeptor-T-Zellen (CAR-T-Zellen) entwickelt werden [268]. Neben den Immunzellen zählen auch die Krebs-assoziierten Fibroblasten („cancer-associated fibroblasts“, CAFs) zur Tumormikroumgebung. Die CAFs tragen zur Tumorentwicklung bei indem sie Proliferation, Invasion und Metastasierung durch Abgabe von verschiedenen Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Chemokinen fördern. Eine Erweiterung des Modells um diese Komponenten ermöglicht es, weitere Fragestellungen zu adressieren.

Aufgrund patientenspezifischer Unterschiede und der zellulären Heterogenität des malignen Melanoms spricht nur ein Teil der Patienten auf Standard-Antitumorthapien an. Die personalisierte Medizin stellt in dieser Hinsicht einen zentralen therapeutischen Ansatz dar [269, 270]. *In vitro* Testsysteme, die in diesem Bereich zum Einsatz kommen, müssen patientenspezifische Unterschiede berücksichtigen können, um das Ansprechen auf eine mögliche Therapie zu simulieren. Durch die Verwendung von patienteneigenen Tumorzellen kann das Modell als neues Werkzeug in der personalisierten Medizin dienen und eine Vorhersage individueller Therapien ermöglichen.

Die Ergebnisse dieser Forschungsarbeit zeigen deutliche Unterschiede zwischen dreidimensionaler und zweidimensionaler Kultivierung und Behandlung der Melanomzellen und bestätigen die Notwendigkeit für physiologischere Gewebemodelle. Zur Abbildung der Tumorprogression fehlen dem entwickelten Modell allerdings noch wichtige Komponenten. Zwar konnte das Modell in der vorliegenden Arbeit bereits um eine Endothelzellschicht erweitert werden, einen Schlüsselprozess der Karzinogenese stellt jedoch die Vaskularisierung dar [271, 272]. Diese ist im Modell jedoch noch nicht repräsentiert. Die Vaskularisierung basiert auf einem komplexen Zusammenspiel von Endothel- und Tumorzellen. Sie ist wichtig, um einen wachsenden Tumor mit Nährstoffen und Sauerstoff zu versorgen. Das Eindringen der Tumorzellen in die Gefäßsysteme führt zur Verteilung der Zellen über den Körper und zur Ausbildung von Metastasen. Um diese Prozesse *in vitro* zu

untersuchen, wird ein Gefäßnetzwerk benötigt, das z.B. über die Implementierung von Endothelzellen, xenogenen vaskularisierten Matrices [273] oder neuartigen Bio-Printing-Ansätzen [274] denkbar wäre. Die Verwendung des xenogenen standardisierten biologischen Gerüsts BioVaSc®-TERM basiert auf dezellularisierten Segmenten eines porcinen Jejunums und konnte bereits die Erzeugung eines vaskularisierten Hautäquivalents mit einem perfundierten vaskulären Netzwerk ermöglichen [275] [113]. Eine Erweiterung des Krankheitsmodells durch ein solches System erscheint sinnvoll, da insbesondere die Untersuchung des Metastasierungsprozesses in seriellen Bioreaktoren über die Untersuchung der Ausbreitung einzelner Tumorzellen in die künstliche „Blut“-Zirkulation möglich erscheint.

Das entwickelte Modell kann dazu führen, Tierversuche im Bereich der Melanomforschung zu reduzieren und Speziesunterschiede zu überwinden und so dem von Burch und Russel geprägten 3-R-Prinzip entsprechen [77]. Allerdings sind derzeit zum Aufbau der Modelle noch Komponenten tierischen Ursprungs notwendig. Um den Einsatz von Tieren weiter zu minimieren, sollten in Zukunft auch tierische Bestandteile für die Zellkultur für den Aufbau des Modells ersetzt werden.

Zusammenfassend lässt sich folgern, dass das in dieser Arbeit entwickelte Gewebemodell die Grundlagen schafft, die Vorhersagekraft der *in vitro* Melanommodelle sowie die *in vitro* - *in vivo* Korrelation deutlich zu verbessern. Es wurde ein skalierbarer Ansatz zur Generierung von *in vitro* Melanommodellen, die die native Mikroumgebung des Primärtumors nachahmt, entwickelt. Mit dem neuartigen Verfahren der Reisolation von Melanomzellen und Keratinozyten aus den Tumormodellen ist es möglich, die Wirkung von Antitumorthérapien spezifisch zu untersuchen. Die Kombination des Melanommodells mit einer darauf abgestimmten Analytik bietet ein neuartiges Werkzeug für die präklinische Forschung zur Testung von pharmazeutischen Wirkstoffen, das dazu beitragen könnte, die hohen Misserfolgsraten in der Medikamentenentwicklung der Onkologie zu reduzieren.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Schematischer Aufbau der Haut im physiologischen Zustand und melanozytären Tumoren.....	2
Abbildung 1-2: Häufige Mutationen und Angriffspunkte zielgerichteter Therapie des malignen Melanoms.....	3
Abbildung 1-3: Inzidenz- sowie Mortalitätsraten des malignen Melanoms in Deutschland	4
Abbildung 1-4: Schematische Darstellung der Unterschiede im Glukose-Stoffwechselweg von normalen Zellen zu Tumorzellen	5
Abbildung 1-5: Kreislauf des Tissue Engineerings.....	16
Abbildung 4-1: Mikroskopische Aufnahmen der Melanomzelllinien MM127, A11, D08, MM96L und SKMEL28.....	47
Abbildung 4-2: Immunhistochemische Färbungen der Melanomzelllinien (A11, MM96L, SKMEL28, MM127, D08) sowie Keratinozyten (heK) in zweidimensionaler Kultur.....	48
Abbildung 4-3: Schematische Darstellung des Aufbaus humaner epidermaler Melanom Modelle.	49
Abbildung 4-4: Vergleich der <i>in vivo</i> Situation mit den <i>in vitro</i> generierten Modellen im physiologischen und pathologischen Zustand. Der Maßstab entspricht 50 µm.....	51
Abbildung 4-5: Histologische Übersichtsfärbung sowie immunhistochemische Färbungen eines epidermalen Modells (RHE) sowie der Melanommodelle (M-RHE)	52
Abbildung 4-6: Immunhistochemische Färbung Melanom-assoziiierter Marker der 3D Modelle.	54
Abbildung 4-7: Interaktionen zwischen Melanomzellen und Keratinozyten über Notch-Signaling	55
Abbildung 4-8: Multiplex Assay zur Bestimmung tumorassoziiierter Proteine.....	58
Abbildung 4-9: Veränderter Glukoseverbrauch und Laktatproduktion in Melanommodellen im Vergleich zu epidermalen Modellen (RHE).....	59
Abbildung 4-10: Isolierungserfolg von Einzelzellsuspensionen nach enzymatischem Verdau mittels Accutase und Trypsin.	62
Abbildung 4-11: Effektivität der Aufreinigung der isolierten Zellen aus 3D Gewebeäquivalenten.	63
Abbildung 4-12: Unterschiede in der Expression von Ki67 zwischen einer 2D zu 3D Kultivierung der Zellen	64
Abbildung 4-13: Zellzyklus Analyse von Keratinozyten in unterschiedlichen Kultivierungsstadien	66
Abbildung 4-14: Unterschiede des Zellzyklus von Melanomzellen in zweidimensionaler (2D) zu dreidimensionaler (3D) Kultur	67
Abbildung 4-15: Monitoring des Glukosemetabolismus durch das fluoreszenzmarkierte Desoxyglukose-Analogen 2-Deoxy-2-[(7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]-D-glucose (2-NBDG).....	69
Abbildung 4-16: Technische Umsetzung eines Messaufbaus zur Bestimmung des TEWL <i>in vitro</i>	71
Abbildung 4-17: Etablierung der <i>in vitro</i> Messung des transepidermalen Wasserverlusts (TEWL)	72
Abbildung 4-18: Vergleich der Impedanzspektroskopie mit dem TEWL.....	73
Abbildung 4-19: Messung der Hautbarriere von epidermalen (RHE) sowie Melanommodellen	74
Abbildung 4-20: Schema zur Durchführung der Validierung des Testsystems durch das etablierte Tumorthapeutikum Vemurafenib	76
Abbildung 4-21: Einfluss des Tumorthapeutikums Vemurafenib auf die metabolische Aktivität	78
Abbildung 4-22: Einfluss des Testaufbaus auf die Wirkung von Vemurafenib	79
Abbildung 4-23: Schema des Zellzyklus	80
Abbildung 4-24: Zellzyklusanalyse von Melanomzellen und Keratinozyten nach Behandlung	81

Abbildung 4-25: Zellzyklusanalyse von Epidermismodellen (RHE) und Melanommodellen (M-RHE) nach Behandlung mit Vemurafenib.....	82
Abbildung 4-26: Glukose- und Laktatwerte gemessen im Zellkulturüberstand.....	83
Abbildung 4-27: Untersuchung des Glukosemetabolismus nach Behandlung.	85
Abbildung 4-28: Immunfluoreszenzfärbung von Ki67 nach Behandlung mit Vemurafenib.....	86
Abbildung 4-29: Wachstum von MUG-Mel2 <i>in vivo</i> , im Mausmodell und <i>in vitro</i>	87
Abbildung 4-30: Schema der Behandlung und Validierung der Testung mit dem neuartigen Wirkstoffkandidat	88
Abbildung 4-31: Einfluss der Behandlung von DMAS auf die Viabilität und die Morphologie in zweidimensionalen Kulturen.	89
Abbildung 4-32: Einfluss der Behandlung auf die Histologie, die Viabilität sowie den Glukoseverbrauch bzw.die Laktatproduktion.	89
Abbildung 4-33: Zellzyklus Analyse von Keratinozyten und der Melanomzelllinie MUG-Mel2 in 2D und 3D.....	90
Abbildung 4-34: Untersuchung des Glukosemetabolismus von MUG-Mel2 Zellen	91
Abbildung 4-35: Immunfluoreszenzfärbung von Ki67 nach Behandlung von Melanommodellen MUG-Mel2 (M-RHE) und epidermalen Modellen (RHE) mit DMAS	92
Abbildung 4-36: Absorption von Koffein und Testosteron bei exzidiierter humaner Haut (hSkin) und rekonstruierter humaner Epidermis (RHE).	94
Abbildung 4-37: Einfluss einer modifizierten Medienzusammensetzung auf die Hautbarriere.....	96
Abbildung 4-38: Stimulation der Regenerationsprozesse in Epidermismodellen (RHE)	97
Abbildung 4-39: Schematische Darstellung eines epidermalen Melanommodells sowie zwei unterschiedlich komplexer Vollhaut-Melanommodelle.	98
Abbildung 4-40: Histologische Übersichtsfärbung sowie immunhistochemische Färbungen eines hydrogelbasierten Vollhautmodells (VHM) sowie der entsprechenden Melanommodelle ..	99
Abbildung 4-41: Histologische Übersichtsfärbung sowie immunhistochemische Färbungen eines SIS-muc basierten Vollhautmodells (VHM _{muc}) sowie der entsprechenden Melanommodelle..	101
Abbildung 6-1: Vergleich der <i>in vivo</i> Situation mit den entwickelten Modellen	128

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Verwendete Antikörper	24
Tabelle 2-2: Verwendete Enzymlösungen	24
Tabelle 2-3: Medien und Lösungen sowie deren Zusammensetzung	25
Tabelle 2-4: Lösungen für die Histologie.....	26
Tabelle 2-5: Eingesetzte Kits.....	26
Tabelle 2-6: Chemikalienliste mit Angaben des Herstellers.....	26
Tabelle 2-7: Labormaterialien sowie dessen Hersteller mit Firmensitz.....	28
Tabelle 2-8: Verbrauchsmaterial sowie deren Hersteller mit Firmensitz.....	29
Tabelle 2-9: Auführung der verwendeten Geräte mit deren Hersteller und Firmensitz	30
Tabelle 2-10: Liste spezieller Software	31
Tabelle 3-1: Aussaatverhältnis von Melanomzellen zu Keratinozyten der jeweiligen Zelllinie	38
Tabelle 3-2: Durchführung der Entparaffinierung von Schnittpräparaten	42
Tabelle 3-3: Durchführung der Hämatoxylin-Eosin Färbung.....	42
Tabelle 3-4: Durchführung der aufsteigenden Alkoholreihe.....	43
Tabelle 3-5: Protokoll zur Immunfluoreszenzfärbung.....	43
Tabelle 3-6: Protokoll zur immunohistochemischen Färbung	44
Tabelle 4-1: Eigenschaften der Zelllinien MM127, A11, D08, MM96L und SKMEL28.	47

9. Literaturverzeichnis

1. Yaar, M. and B.A. Gilchrest, *Ageing and photoageing of keratinocytes and melanocytes*. Clin Exp Dermatol, 2001. **26**(7): p. 583-91.
2. Carsberg, C.J., H.M. Wahrenius, and P.S. Friedmann, *Ultraviolet radiation-induced melanogenesis in human melanocytes. Effects of modulating protein kinase C*. J Cell Sci, 1994. **107 (Pt 9)**: p. 2591-7.
3. Brenner, M. and V.J. Hearing, *The protective role of melanin against UV damage in human skin*. Photochem Photobiol, 2008. **84**(3): p. 539-49.
4. Boulais, N. and L. Misery, *The epidermis: a sensory tissue*. Eur J Dermatol, 2008. **18**(2): p. 119-27.
5. Alonso, L. and E. Fuchs, *Stem cells of the skin epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100 Suppl 1**: p. 11830-5.
6. Sterry, W., *Kurzlehrbuch Dermatologie*. Vol. 2. 2018, Stuttgart: Thieme Verlag.
7. Miller, A.J. and M.C. Mihm, Jr., *Melanoma*. N Engl J Med, 2006. **355**(1): p. 51-65.
8. Bandarchi, B., et al., *From melanocyte to metastatic malignant melanoma*. Dermatol Res Pract, 2010. **2010**.
9. Garbe, C., et al., *Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline*. Eur J Cancer, 2010. **46**(2): p. 270-83.
10. Dhillon, A.S., et al., *MAP kinase signalling pathways in cancer*. Oncogene, 2007. **26**(22): p. 3279-90.
11. Cargnello, M. and P.P. Roux, *Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases*. Microbiol Mol Biol Rev, 2011. **75**(1): p. 50-83.
12. Goel, V.K., et al., *Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(1): p. 154-60.
13. Ascierto, P.A., et al., *MEK162 for patients with advanced melanoma harbouring NRAS or Val600 BRAF mutations: a non-randomised, open-label phase 2 study*. Lancet Oncol, 2013. **14**(3): p. 249-56.
14. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
15. Carvajal, R.D., et al., *KIT as a therapeutic target in metastatic melanoma*. JAMA, 2011. **305**(22): p. 2327-34.
16. Giblin, A.V. and J.M. Thomas, *Incidence, mortality and survival in cutaneous melanoma*. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2007. **60**(1): p. 32-40.
17. Leitlinie (Langversion) Malignes Melanom, *S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms*. 2013, AWMF-Register-Nummer: 032-024OL, Langversion 1.1.
18. Breitbart, E.W., et al., *Systematic skin cancer screening in Northern Germany*. J Am Acad Dermatol, 2012. **66**(2): p. 201-11.
19. Mazurek, S. and E. Eigenbrodt, *The tumor metabolome*. Anticancer Res, 2003. **23**(2A): p. 1149-54.
20. Warburg, O., F. Wind, and E. Negelein, *The Metabolism of Tumors in the Body*. J Gen Physiol, 1927. **8**(6): p. 519-30.
21. Warburg, O., *Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle*. Die Naturwissenschaften, 1924. **12**(50): p. 1131-1137.
22. Liberti, M.V. and J.W. Locasale, *The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells?* Trends Biochem Sci, 2016. **41**(3): p. 211-218.

23. DeBerardinis, R.J. and N.S. Chandel, *Fundamentals of cancer metabolism*. Sci Adv, 2016. **2**(5): p. e1600200.
24. Vander Heiden, M.G., *Targeting cancer metabolism: a therapeutic window opens*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(9): p. 671-84.
25. Spratlin, J.L., N.J. Serkova, and S.G. Eckhardt, *Clinical applications of metabolomics in oncology: a review*. Clin Cancer Res, 2009. **15**(2): p. 431-40.
26. Fischer, G.M., et al., *Metabolic strategies of melanoma cells: Mechanisms, interactions with the tumor microenvironment, and therapeutic implications*. Pigment Cell Melanoma Res, 2018. **31**(1): p. 11-30.
27. Pavlova, N.N. and C.B. Thompson, *The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism*. Cell Metab, 2016. **23**(1): p. 27-47.
28. Herlyn, M. and I.M. Shih, *Interactions of melanocytes and melanoma cells with the microenvironment*. Pigment Cell Res, 1994. **7**(2): p. 81-8.
29. Balkwill, F.R., M. Capasso, and T. Hagemann, *The tumor microenvironment at a glance*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 23): p. 5591-6.
30. Villanueva, J. and M. Herlyn, *Melanoma and the tumor microenvironment*. Curr Oncol Rep, 2008. **10**(5): p. 439-46.
31. Golan, T., et al., *Interactions of Melanoma Cells with Distal Keratinocytes Trigger Metastasis via Notch Signaling Inhibition of MITF*. Mol Cell, 2015. **59**(4): p. 664-76.
32. Breslow, A., *Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma*. Ann Surg, 1970. **172**(5): p. 902-8.
33. Balch, C.M., et al., *Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification*. J Clin Oncol, 2009. **27**(36): p. 6199-206.
34. Xia, J., et al., *Expression of microphthalmia transcription factor, S100 protein, and HMB-45 in malignant melanoma and pigmented nevi*. Biomed Rep, 2016. **5**(3): p. 327-331.
35. Bacchi, C., et al., *HMB-45: A Review*. Applied Immunohistochemistry, 1996. **4**(2): p. 73-85.
36. Massi, G. and P.E. LeBoit, *Histological Diagnosis of Nevi and Melanoma*. Vol. 2. 2014: Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 752.
37. Willis, B.C., et al., *SOX10: a useful marker for identifying metastatic melanoma in sentinel lymph nodes*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2015. **23**(2): p. 109-12.
38. Krahn, G., et al., *S100 beta is a more reliable tumor marker in peripheral blood for patients with newly occurred melanoma metastases compared with MIA, albumin and lactate-dehydrogenase*. Anticancer Res, 2001. **21**(2B): p. 1311-6.
39. Krug, B., et al., *Role of PET in the initial staging of cutaneous malignant melanoma: systematic review*. Radiology, 2008. **249**(3): p. 836-44.
40. Perng, P., C. Marcus, and R.M. Subramaniam, *(18)F-FDG PET/CT and Melanoma: Staging, Immune Modulation and Mutation-Targeted Therapy Assessment, and Prognosis*. AJR Am J Roentgenol, 2015. **205**(2): p. 259-70.
41. Fletcher, J.W., et al., *Recommendations on the use of 18F-FDG PET in oncology*. J Nucl Med, 2008. **49**(3): p. 480-508.
42. Polsky, D. and C. Cordon-Cardo, *Oncogenes in melanoma*. Oncogene, 2003. **22**(20): p. 3087-91.
43. Kunz, M., *Oncogenes in melanoma: an update*. Eur J Cell Biol, 2014. **93**(1-2): p. 1-10.
44. Sandru, A., et al., *Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma*. J Med Life, 2014. **7**(4): p. 572-6.

45. Hodis, E., et al., *A landscape of driver mutations in melanoma*. Cell, 2012. **150**(2): p. 251-63.
46. Niezgodna, A., P. Niezgodna, and R. Czajkowski, *Novel Approaches to Treatment of Advanced Melanoma: A Review on Targeted Therapy and Immunotherapy*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 851387.
47. Bollag, G., et al., *Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma*. Nature, 2010. **467**(7315): p. 596-9.
48. Lee, J.T., et al., *PLX4032, a potent inhibitor of the B-Raf V600E oncogene, selectively inhibits V600E-positive melanomas*. Pigment Cell Melanoma Res, 2010. **23**(6): p. 820-7.
49. Larkin, J., et al., *Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma*. N Engl J Med, 2014. **371**(20): p. 1867-76.
50. Topalian, S.L., C.G. Drake, and D.M. Pardoll, *Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy*. Cancer Cell, 2015. **27**(4): p. 450-61.
51. Franklin, C., et al., *Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions*. Eur J Surg Oncol, 2017. **43**(3): p. 604-611.
52. Hodi, F.S., et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(8): p. 711-23.
53. Weber, J.S., et al., *Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2015. **16**(4): p. 375-84.
54. Ribas, A., et al., *Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma*. JAMA, 2016. **315**(15): p. 1600-9.
55. La Porta, C.A., *Drug resistance in melanoma: new perspectives*. Curr Med Chem, 2007. **14**(4): p. 387-91.
56. DiMasi, J.A., R.W. Hansen, and H.G. Grabowski, *The price of innovation: new estimates of drug development costs*. J Health Econ, 2003. **22**(2): p. 151-85.
57. Roses, A.D., *Pharmacogenetics in drug discovery and development: a translational perspective*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(10): p. 807-17.
58. Smith, A., *Screening for drug discovery: the leading question*. Nature, 2002. **418**(6896): p. 453-9.
59. Mayr, L.M. and D. Bojanic, *Novel trends in high-throughput screening*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(5): p. 580-8.
60. Mayr, L.M. and P. Fuerst, *The future of high-throughput screening*. J Biomol Screen, 2008. **13**(6): p. 443-8.
61. Begley, C.G. and L.M. Ellis, *Raise standards for preclinical cancer research*. Nature, 2012. **483**: p. 531.
62. Spielberg, P., *Tierversuche in der medizinischen Forschung: Druck von allen Seiten*. Dtsch Arztebl International, 2010. **107**(36): p. 1676-81.
63. Kelland, L.R., *"Of mice and men": values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development*. European Journal of Cancer, 2004. **40**(6): p. 827-836.
64. Bhattacharjee, Y., *Pharma Firms Push for Sharing of Cancer Trial Data*. Science, 2012. **338**(6103): p. 29-29.
65. van der Worp, H.B., et al., *Can animal models of disease reliably inform human studies?* PLoS Med, 2010. **7**(3): p. e1000245.

66. Cree, I.A., S. Glaysher, and A.L. Harvey, *Efficacy of anti-cancer agents in cell lines versus human primary tumour tissue*. Current Opinion in Pharmacology, 2010. **10**(4): p. 375-379.
67. Riedl, A., et al., *Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT-mTOR-S6K signaling and drug responses*. J Cell Sci, 2017. **130**(1): p. 203-218.
68. Hsu, M.Y., F. Meier, and M. Herlyn, *Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host*. Differentiation, 2002. **70**(9-10): p. 522-36.
69. Shih, I.M., et al., *Regulation of Mel-CAM/MUC18 expression on melanocytes of different stages of tumor progression by normal keratinocytes*. Am J Pathol, 1994. **145**(4): p. 837-45.
70. Hartung, T., *Look back in anger - what clinical studies tell us about preclinical work*. ALTEX, 2013. **30**(3): p. 275-91.
71. Hartung, T., *Food for thought ... on alternative methods for cosmetics safety testing*. ALTEX, 2008. **25**(3): p. 147-62.
72. Leist, M., L. Efremova, and C. Karreman, *Food for thought ... considerations and guidelines for basic test method descriptions in toxicology*. ALTEX, 2010. **27**(4): p. 309-17.
73. Glazko, G., et al., *Eighty percent of proteins are different between humans and chimpanzees*. Gene, 2005. **346**: p. 215-9.
74. Knight, A., *Systematic reviews of animal experiments demonstrate poor contributions toward human healthcare*. Rev Recent Clin Trials, 2008. **3**(2): p. 89-96.
75. Hartung, T., *From alternative methods to a new toxicology*. Eur J Pharm Biopharm, 2011. **77**(3): p. 338-49.
76. Hartung, T., *Food for thought... on animal tests*. ALTEX, 2008. **25**(1): p. 3-16.
77. Russell, W.M.S. and R.J. Burch, *The principles of humane experimental technique*. 1959: London: Methuen & Co. Ltd.
78. Kandarova, H. and S. Letasiova, *Alternative methods in toxicology: pre-validated and validated methods*. Interdiscip Toxicol, 2011. **4**(3): p. 107-13.
79. Tabata, Y., *Biomaterial technology for tissue engineering applications*. J R Soc Interface, 2009. **6 Suppl 3**: p. S311-24.
80. Hamilton, G., *Multicellular spheroids as an in vitro tumor model*. Cancer Letters, 1998. **131**(1): p. 29-34.
81. Sutherland, R.M., *Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicell spheroid model*. Science, 1988. **240**(4849): p. 177-84.
82. Görlach, A. and H. Acker, *pO₂- and pH-gradients in multicellular spheroids and their relationship to cellular metabolism and radiation sensitivity of malignant human tumor cells*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 1994. **1227**(3): p. 105-112.
83. Haass, N.K., et al., *The Mitogen-Activated Protein/Extracellular Signal-Regulated Kinase Kinase Inhibitor AZD6244 (ARRY-142886) Induces Growth Arrest in Melanoma Cells and Tumor Regression When Combined with Docetaxel*. Clinical Cancer Research, 2008. **14**(1): p. 230-239.
84. Marrero, B., J.L. Messina, and R. Heller, *Generation of a tumor spheroid in a microgravity environment as a 3D model of melanoma*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2009. **45**(9): p. 523-34.
85. Ikada, Y., *Challenges in tissue engineering*. J R Soc Interface, 2006. **3**(10): p. 589-601.

86. Watson, C.J. and J.H. Dark, *Organ transplantation: historical perspective and current practice*. Br J Anaesth, 2012. **108 Suppl 1**: p. i29-42.
87. Chapekar, M.S., *Tissue engineering: challenges and opportunities*. J Biomed Mater Res, 2000. **53**(6): p. 617-20.
88. Langer, R.S. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering: the challenges ahead*. Sci Am, 1999. **280**(4): p. 86-9.
89. Langer, R. and J.P. Vacanti, *Tissue engineering*. Science, 1993. **260**(5110): p. 920-6.
90. Curtis, A. and M. Riehle, *Tissue engineering: the biophysical background*. Phys Med Biol, 2001. **46**(4): p. R47-65.
91. Persidis, A., *Tissue engineering*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(5): p. 508-10.
92. Bell, E., et al., *Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness*. Science, 1981. **211**(4486): p. 1052-4.
93. Prunieras, M., M. Regnier, and D. Woodley, *Methods for cultivation of keratinocytes with an air-liquid interface*. J Invest Dermatol, 1983. **81**(1 Suppl): p. 28s-33s.
94. MacNeil, S., *Progress and opportunities for tissue-engineered skin*. Nature, 2007. **445**(7130): p. 874-80.
95. Zhang, Z. and B.B. Michniak-Kohn, *Tissue engineered human skin equivalents*. Pharmaceutics, 2012. **4**(1): p. 26-41.
96. Rosdy, M. and L.C. Clauss, *Terminal epidermal differentiation of human keratinocytes grown in chemically defined medium on inert filter substrates at the air-liquid interface*. J Invest Dermatol, 1990. **95**(4): p. 409-14.
97. Groeber, F., et al., *Skin tissue engineering--in vivo and in vitro applications*. Clin Plast Surg, 2012. **39**(1): p. 33-58.
98. OECD, *Test No. 439: In Vitro Skin Irritation - Reconstructed Human Epidermis Test Method*. 2013, OECD Publishing.
99. OECD, *Test No. 431: In Vitro Skin Corrosion: Reconstructed Human Epidermis (Rhe) Test Method*. 2014, OECD Publishing.
100. De Wever, B., D. Petersohn, and K.R. Mewes, *Overview of human three-dimensional (3D) skin models used for dermal toxicity assessment — part 1*. Househ. Pers. Care Today 2013. **8**: p. 18–23.
101. Pratt, L.F., et al., *The highly differentiated 3D epidermal skin model (epiCS®) to characterize skin sensitizers in mixtures*. Toxicology Letters, 2014. **229**: p. S141.
102. Alépée, N., et al., *The usefulness of the validated SkinEthic™ RHE test method to identify skin corrosive UN GHS subcategories*. Toxicology in Vitro, 2014. **28**(4): p. 616-625.
103. Alépée, N., et al., *Assessment of cosmetic ingredients in the in vitro reconstructed human epidermis test method EpiSkin™ using HPLC/UPLC-spectrophotometry in the MTT-reduction assay*. Toxicology in Vitro, 2016. **33**: p. 105-117.
104. Chapman, K.E., et al., *Automation and validation of micronucleus detection in the 3D EpiDerm™ human reconstructed skin assay and correlation with 2D dose responses*. Mutagenesis, 2014. **29**(3): p. 165-175.
105. Jung, K.-M., et al., *KeraSkin™-VM: A novel reconstructed human epidermis model for skin irritation tests*. Toxicology in Vitro, 2014. **28**(5): p. 742-750.
106. Katoh, M., et al., *Assessment of human epidermal model LabCyte EPI-MODEL for *in vitro* skin irritation testing according to European Centre for the*

- Validation of Alternative Methods (ECVAM)-validated protocol.* The Journal of Toxicological Sciences, 2009. **34**(3): p. 327-334.
107. Meier, F., et al., *Combined targeting of MAPK and AKT signalling pathways is a promising strategy for melanoma treatment.* Br J Dermatol, 2007. **156**(6): p. 1204-13.
108. Eves, P., et al., *Melanoma invasion in reconstructed human skin is influenced by skin cells--investigation of the role of proteolytic enzymes.* Clin Exp Metastasis, 2003. **20**(8): p. 685-700.
109. Van Kilsdonk, J.W.J., et al., *Keratinocytes drive melanoma invasion in a reconstructed skin model.* Melanoma Research, 2010. **20**(5): p. 372-380.
110. Hill, D.S., et al., *A Novel Fully Humanized 3D Skin Equivalent to Model Early Melanoma Invasion.* Molecular Cancer Therapeutics, 2015. **14**(11): p. 2665-2673.
111. Hansmann, J., et al., *Bioreactors in tissue engineering - principles, applications and commercial constraints.* Biotechnol J, 2013. **8**(3): p. 298-307.
112. Badylak, S.F., et al., *Engineered whole organs and complex tissues.* Lancet, 2012. **379**(9819): p. 943-52.
113. Groeber, F., et al., *A first vascularized skin equivalent as an alternative to animal experimentation.* ALTEX, 2016. **33**(4): p. 415-422.
114. Nietzer, S., et al., *Mimicking Metastases Including Tumor Stroma: A New Technique to Generate a Three-Dimensional Colorectal Cancer Model Based on a Biological Decellularized Intestinal Scaffold.* Tissue Eng Part C Methods, 2016. **22**(7): p. 621-35.
115. Novosel, E.C., C. Kleinhan, and P.J. Kluger, *Vascularization is the key challenge in tissue engineering.* Adv Drug Deliv Rev, 2011. **63**(4-5): p. 300-11.
116. Khademhosseini, A., J.P. Vacanti, and R. Langer, *Progress in tissue engineering.* Sci Am, 2009. **300**(5): p. 64-71.
117. Cheng, L. and L. Changyong, *Advantages, Limitations, and Future Trends for Biofabrication Techniques in Tissue Engineering,* in *International Conference on Information Sciences, Machinery, Materials and Energy (ICISMME 2015).* 2015, Atlantis Press: Chongqing. p. 409-4012.
118. Thakoersing, V.S., et al., *Unraveling barrier properties of three different in-house human skin equivalents.* Tissue Eng Part C Methods, 2012. **18**(1): p. 1-11.
119. Thakoersing, V.S., et al., *Increased presence of monounsaturated fatty acids in the stratum corneum of human skin equivalents.* J Invest Dermatol, 2013. **133**(1): p. 59-67.
120. Rawlings, A.V. and C.R. Harding, *Moisturization and skin barrier function.* Dermatol Ther, 2004. **17 Suppl 1**: p. 43-8.
121. Feingold, K.R. and P.M. Elias, *Role of lipids in the formation and maintenance of the cutaneous permeability barrier.* Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(3): p. 280-94.
122. Rinnerthaler, M., et al., *Skin aging, gene expression and calcium.* Exp Gerontol, 2015. **68**: p. 59-65.
123. Bouwstra, J.A., et al., *Water distribution and natural moisturizer factor content in human skin equivalents are regulated by environmental relative humidity.* J Invest Dermatol, 2008. **128**(2): p. 378-88.
124. Lotz, C., et al., *Replacing the Draize eye test: Impedance spectroscopy as a 3R method to discriminate between all GHS categories for eye irritation.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 15049.

125. Mertsching, H., et al., *Generation and transplantation of an autologous vascularized bioartificial human tissue*. *Transplantation*, 2009. **88**(2): p. 203-10.
126. Rinner, B., et al., *MUG-Mel2, a novel highly pigmented and well characterized NRAS mutated human melanoma cell line*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 2098.
127. Garbe, C., et al., *Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline – Update 2016*. *European Journal of Cancer*, 2016. **63**: p. 201-217.
128. Balch, C.M., et al., *Final Version of 2009 AJCC Melanoma Staging and Classification*. *Journal of Clinical Oncology*, 2009. **27**(36): p. 6199-6206.
129. Satyamoorthy, K., et al., *Melanoma cell lines from different stages of progression and their biological and molecular analyses*. *Melanoma research*, 1997. **7 Suppl 2**: p. S35-42.
130. Vincent, K.M. and L.-M. Postovit, *Investigating the utility of human melanoma cell lines as tumour models*. *Oncotarget*, 2017. **8**(6): p. 10498-10509.
131. Kuzu, O.F., et al., *Current State of Animal (Mouse) Modeling in Melanoma Research*. *Cancer Growth Metastasis*, 2015. **8**(Suppl 1): p. 81-94.
132. Riedl, A., et al., *Comparison of cancer cells in 2D vs 3D culture reveals differences in AKT–mTOR–S6K signaling and drug responses*. *Journal of Cell Science*, 2017. **130**(1): p. 203-218.
133. Dalby, M.J., et al., *Nucleus alignment and cell signaling in fibroblasts: response to a micro-grooved topography*. *Exp Cell Res*, 2003. **284**(2): p. 274-82.
134. Ponsonnet, L., et al., *Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour*. *Materials Science and Engineering: C*, 2003. **23**(4): p. 551-560.
135. Pampaloni, F., E.G. Reynaud, and E.H. Stelzer, *The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(10): p. 839-45.
136. Mak, I.W., N. Evaniew, and M. Ghert, *Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment*. *Am J Transl Res*, 2014. **6**(2): p. 114-8.
137. Mestas, J. and C.C. Hughes, *Of mice and not men: differences between mouse and human immunology*. *J Immunol*, 2004. **172**(5): p. 2731-8.
138. Hucker, H.B., *Species differences in drug metabolism*. *Annu Rev Pharmacol*, 1970. **10**: p. 99-118.
139. Nishimura, E.K., et al., *Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination*. *Nature*, 2002. **416**(6883): p. 854-60.
140. Wang, J.X., M. Fukunaga-Kalabis, and M. Herlyn, *Crosstalk in skin: melanocytes, keratinocytes, stem cells, and melanoma*. *J Cell Commun Signal*, 2016. **10**(3): p. 191-196.
141. Sutherland, R.M. and R.E. Durand, *Growth and cellular characteristics of multicell spheroids*. *Recent Results Cancer Res*, 1984. **95**: p. 24-49.
142. Kunz-Schughart, L.A., et al., *A heterologous 3-D coculture model of breast tumor cells and fibroblasts to study tumor-associated fibroblast differentiation*. *Exp Cell Res*, 2001. **266**(1): p. 74-86.
143. Krueger, S., et al., *Interactions between human colon carcinoma cells, fibroblasts and monocytic cells in coculture--regulation of cathepsin B expression and invasiveness*. *Cancer Lett*, 2005. **223**(2): p. 313-22.
144. Ghosh, S., et al., *Use of multicellular tumor spheroids to dissect endothelial cell-tumor cell interactions: a role for T-cadherin in tumor angiogenesis*. *FEBS Lett*, 2007. **581**(23): p. 4523-8.

145. Tannock, I.F., et al., *Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(3): p. 878-84.
146. Meier, F., et al., *Human melanoma progression in skin reconstructs : biological significance of bFGF*. Am J Pathol, 2000. **156**(1): p. 193-200.
147. Eves, P., et al., *Characterization of an in vitro model of human melanoma invasion based on reconstructed human skin*. Br J Dermatol, 2000. **142**(2): p. 210-22.
148. Li, L., M. Fukunaga-Kalabis, and M. Herlyn, *The three-dimensional human skin reconstruct model: a tool to study normal skin and melanoma progression*. J Vis Exp, 2011(54).
149. Gibot, L., et al., *Development of a tridimensional microvascularized human skin substitute to study melanoma biology*. Clin Exp Metastasis, 2013. **30**(1): p. 83-90.
150. Vorsmann, H., et al., *Development of a human three-dimensional organotypic skin-melanoma spheroid model for in vitro drug testing*. Cell Death Dis, 2013. **4**: p. e719.
151. Marques, C.M. and S. MacNeil, *Use of a Tissue Engineered Human Skin Model to Investigate the Effects of Wounding and of an Anti-Inflammatory on Melanoma Cell Invasion*. PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0156931.
152. Haridas, P., et al., *Quantitative comparison of the spreading and invasion of radial growth phase and metastatic melanoma cells in a three-dimensional human skin equivalent model*. PeerJ, 2017. **5**: p. e3754.
153. Bourland, J., J. Fradette, and F.A. Auger, *Tissue-engineered 3D melanoma model with blood and lymphatic capillaries for drug development*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 13191.
154. Commandeur, S., et al., *In-vitro melanoma models: invasive growth is determined by dermal matrix and basement membrane*. Melanoma Res, 2014. **24**(4): p. 305-14.
155. Michielon, E., et al., *Micro-environmental cross-talk in an organotypic human melanoma-in-skin model directs M2-like monocyte differentiation via IL-10*. Cancer Immunol Immunother, 2020. **69**(11): p. 2319-2331.
156. Patton, E.E., et al., *Melanoma models for the next generation of therapies*. Cancer Cell, 2021. **39**(5): p. 610-631.
157. Kamposioras, K., et al., *Malignant melanoma of unknown primary site. To make the long story short. A systematic review of the literature*. Critical Reviews in Oncology/Hematology, 2011. **78**(2): p. 112-126.
158. Haass, N.K. and M. Herlyn, *Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma*. J Investig Dermatol Symp Proc, 2005. **10**(2): p. 153-63.
159. Cichorek, M., et al., *Skin melanocytes: biology and development*. Postepy Dermatol Alergol, 2013. **30**(1): p. 30-41.
160. Gurzu, S., M.A. Beleaua, and I. Jung, *The role of tumor microenvironment in development and progression of malignant melanomas - a systematic review*. Rom J Morphol Embryol, 2018. **59**(1): p. 23-28.
161. Banerjee and Harris, *Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma*. Histopathology, 2000. **36**(5): p. 387-402.
162. Jungbluth, A.A., et al., *A103: An Anti-Melan-A Monoclonal Antibody for the Detection of Malignant Melanoma in Paraffin-Embedded Tissues*. The American Journal of Surgical Pathology, 1998. **22**(5): p. 595-602.

163. Pracht, M., et al., *Prognostic and predictive values of oncogenic BRAF, NRAS, c-KIT and MITF in cutaneous and mucous melanoma*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2015. **29**(8): p. 1530-8.
164. Pavey, S., et al., *Microarray expression profiling in melanoma reveals a BRAF mutation signature*. Oncogene, 2004. **23**: p. 4060.
165. Stark, M. and N. Hayward, *Genome-Wide Loss of Heterozygosity and Copy Number Analysis in Melanoma Using High-Density Single-Nucleotide Polymorphism Arrays*. Cancer Research, 2007. **67**(6): p. 2632-2642.
166. Johansson, P., S. Pavey, and N. Hayward, *Confirmation of a BRAF mutation-associated gene expression signature in melanoma*. Pigment Cell Res, 2007. **20**(3): p. 216-21.
167. Takahashi, H., et al., *Isomers of a marine diterpene distinguish sublines of human melanoma cells on the basis of apoptosis, cell cycle arrest and differentiation markers*. Melanoma Res, 1992. **1**(5-6): p. 359-66.
168. Treloar, K.K., et al., *Multiple types of data are required to identify the mechanisms influencing the spatial expansion of melanoma cell colonies*. BMC Syst Biol, 2013. **7**: p. 137.
169. Chalmers, A.H., et al., *Resistance of human melanoma cells to ultraviolet radiation*. Cancer Res, 1976. **36**(6): p. 1930-4.
170. Chenevix-Trench, G., N.G. Martin, and K.A. Ellem, *Gene expression in melanoma cell lines and cultured melanocytes: correlation between levels of c-src-1, c-myc and p53*. Oncogene, 1990. **5**(8): p. 1187-93.
171. Cozzi, S.-J., et al., *Induction of Senescence in Diterpene Ester-Treated Melanoma Cells via Protein Kinase C-Dependent Hyperactivation of the Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway*. Cancer Research, 2006. **66**(20): p. 10083-10091.
172. Haridas, P., et al., *Standard melanoma-associated markers do not identify the MM127 metastatic melanoma cell line*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 24569.
173. Jakob, J.A., et al., *NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma*. Cancer, 2012. **118**(16): p. 4014-23.
174. Yang, Y., et al., *GAB2 induces tumor angiogenesis in NRAS-driven melanoma*. Oncogene, 2013. **32**(31): p. 3627-37.
175. Perez-Lorenzo, R., et al., *A tumor suppressor function for the lipid phosphatase INPP4B in melanocytic neoplasms*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(5): p. 1359-1368.
176. Zimmer, D.B., et al., *The S100 protein family: history, function, and expression*. Brain Res Bull, 1995. **37**(4): p. 417-29.
177. Hirobe, T., *Keratinocytes regulate the function of melanocytes*. Dermatologica Sinica, 2014. **32**(4): p. 200-204.
178. Gimotty, P.A., et al., *Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma*. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology, 2005. **23**(31): p. 8048-8056.
179. Hartman, M.L., et al., *Vemurafenib and trametinib reduce expression of CTGF and IL-8 in V600EBRAF melanoma cells*. Laboratory Investigation, 2017. **97**(2): p. 217-227.
180. Okuyama, R., H. Tagami, and S. Aiba, *Notch signaling: Its role in epidermal homeostasis and in the pathogenesis of skin diseases*. Journal of Dermatological Science, 2008. **49**(3): p. 187-194.

181. Ferreira, L.M., *Cancer metabolism: the Warburg effect today*. *Exp Mol Pathol*, 2010. **89**(3): p. 372-80.
182. Scott, D.A., et al., *Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: beyond the Warburg effect*. *J Biol Chem*, 2011. **286**(49): p. 42626-34.
183. Bayley, J.P. and P. Devilee, *Warburg tumours and the mechanisms of mitochondrial tumour suppressor genes. Barking up the right tree?* *Curr Opin Genet Dev*, 2010. **20**(3): p. 324-9.
184. Som, P., et al., *A fluorinated glucose analog, 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F-18): nontoxic tracer for rapid tumor detection*. *J Nucl Med*, 1980. **21**(7): p. 670-5.
185. Schadendorf, D., et al., *IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor*. *J Immunol*, 1993. **151**(5): p. 2667-75.
186. Mattei, S., et al., *Expression of cytokine/growth factors and their receptors in human melanoma and melanocytes*. *Int J Cancer*, 1994. **56**(6): p. 853-7.
187. TYLER, D.S., et al., *Interleukin-1 Production in Tumor Cells of Human Melanoma Surgical Specimens*. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 1995. **15**(4): p. 331-340.
188. Hofmann, U.B., et al., *Matrix metalloproteinases in human melanoma*. *J Invest Dermatol*, 2000. **115**(3): p. 337-44.
189. Hofmann, U.B., et al., *Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression*. *Br J Cancer*, 1999. **81**(5): p. 774-82.
190. Beauvais, D.M. and A.C. Rapraeger, *Syndecans in tumor cell adhesion and signaling*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2004. **2**: p. 3.
191. Woods, A. and J.R. Couchman, *Syndecan-4 and focal adhesion function*. *Curr Opin Cell Biol*, 2001. **13**(5): p. 578-83.
192. Woods, A. and J.R. Couchman, *Syndecan 4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread focal adhesion component*. *Mol Biol Cell*, 1994. **5**(2): p. 183-92.
193. Lendorf, M.E., et al., *Syndecan-1 and syndecan-4 are independent indicators in breast carcinoma*. *J Histochem Cytochem*, 2011. **59**(6): p. 615-29.
194. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, D.K., AWMF), *Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanom*. 2020, AWMF Registernummer: 032/024OL, Langversion 3.3.
195. Groeber, F., et al., *Impedance spectroscopy for the non-destructive evaluation of in vitro epidermal models*. *Pharm Res*, 2015. **32**(5): p. 1845-54.
196. Rogiers, V. and E. Group, *EEMCO guidance for the assessment of transepidermal water loss in cosmetic sciences*. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol*, 2001. **14**(2): p. 117-28.
197. Chilcott, R.P., et al., *Transepidermal water loss does not correlate with skin barrier function in vitro*. *J Invest Dermatol*, 2002. **118**(5): p. 871-5.
198. Parish, W.E., J. Read, and S.E. Paterson, *Changes in basal cell mitosis and transepidermal water loss in skin cultures treated with vitamins C and E*. *Exp Dermatol*, 2005. **14**(9): p. 684-91.
199. Gysler, A., U. Konigsmann, and M. Schafer-Korting, *[Tridimensional skin models recording percutaneous absorption]*. *ALTEX*, 1999. **16**(2): p. 67-72.
200. Srinivasan, B., et al., *TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems*. *J Lab Autom*, 2015. **20**(2): p. 107-26.

201. Mewes, K.R., et al., *Catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase I)*. *Toxicol In Vitro*, 2016. **36**: p. 238-253.
202. Groeber, F., et al., *Catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase II)*. *Toxicol In Vitro*, 2016. **36**: p. 254-261.
203. Kahn, C.R., et al., *Human corneal epithelial primary cultures and cell lines with extended life span: in vitro model for ocular studies*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1993. **34**(12): p. 3429-41.
204. Almuhaideb, A., N. Papathanasiou, and J. Bomanji, *(18)F-FDG PET/CT Imaging In Oncology*. *Annals of Saudi Medicine*, 2011. **31**(1): p. 3-13.
205. Fecher, D., et al., *Human Organotypic Lung Tumor Models: Suitable For Preclinical 18F-FDG PET-Imaging*. *PLoS One*, 2016. **11**(8): p. e0160282.
206. Yamada, K., et al., *Measurement of glucose uptake and intracellular calcium concentration in single, living pancreatic beta-cells*. *J Biol Chem*, 2000. **275**(29): p. 22278-83.
207. Zou, C., Y. Wang, and Z. Shen, *2-NBDG as a fluorescent indicator for direct glucose uptake measurement*. *J Biochem Biophys Methods*, 2005. **64**(3): p. 207-15.
208. Yoshioka, K., et al., *A novel fluorescent derivative of glucose applicable to the assessment of glucose uptake activity of Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1996. **1289**(1): p. 5-9.
209. He, Y., et al., *The changing 50% inhibitory concentration (IC50) of cisplatin: a pilot study on the artifacts of the MTT assay and the precise measurement of density-dependent chemoresistance in ovarian cancer*. *Oncotarget*, 2016. **7**(43): p. 70803-70821.
210. Sebaugh, J.L., *Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation*. *Pharm Stat*, 2011. **10**(2): p. 128-34.
211. Kim, A. and M.S. Cohen, *The discovery of vemurafenib for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma*. *Expert opinion on drug discovery*, 2016. **11**(9): p. 907-916.
212. Bollag, G., et al., *Vemurafenib: the first drug approved for BRAF-mutant cancer*. *Nat Rev Drug Discov*, 2012. **11**(11): p. 873-86.
213. Yamazaki, N., et al., *Phase I/II study of vemurafenib in patients with unresectable or recurrent melanoma with BRAF(V) (600) mutations*. *J Dermatol*, 2015. **42**(7): p. 661-6.
214. Dummer, R., et al., *Vemurafenib in patients with BRAF(V600) mutation-positive melanoma with symptomatic brain metastases: final results of an open-label pilot study*. *Eur J Cancer*, 2014. **50**(3): p. 611-21.
215. Roh, M.R., et al., *Low-concentration vemurafenib induces the proliferation and invasion of human HaCaT keratinocytes through mitogen-activated protein kinase pathway activation*. *J Dermatol*, 2015. **42**(9): p. 881-8.
216. Sun, T., et al., *Culture of skin cells in 3D rather than 2D improves their ability to survive exposure to cytotoxic agents*. *J Biotechnol*, 2006. **122**(3): p. 372-81.
217. Chu, E.Y., et al., *Diverse cutaneous side effects associated with BRAF inhibitor therapy: a clinicopathologic study*. *J Am Acad Dermatol*, 2012. **67**(6): p. 1265-72.
218. Gutzmer, R., et al., *Cutaneous side effects of new antitumor drugs: clinical features and management*. *Dtsch Arztebl Int*, 2012. **109**(8): p. 133-40.

219. Holderfield, M., et al., *Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond*. Nat Rev Cancer, 2014. **14**(7): p. 455-67.
220. Haass, N.K., K.S. Smalley, and M. Herlyn, *The role of altered cell-cell communication in melanoma progression*. J Mol Histol, 2004. **35**(3): p. 309-18.
221. Michaloglou, C., et al., *BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 720-4.
222. Evan, G.I. and K.H. Vousden, *Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 342-8.
223. Sellers, W.R. and D.E. Fisher, *Apoptosis and cancer drug targeting*. J Clin Invest, 1999. **104**(12): p. 1655-61.
224. Niehr, F., et al., *Combination therapy with vemurafenib (PLX4032/RG7204) and metformin in melanoma cell lines with distinct driver mutations*. J Transl Med, 2011. **9**: p. 76.
225. Sondergaard, J.N., et al., *Differential sensitivity of melanoma cell lines with BRAFV600E mutation to the specific Raf inhibitor PLX4032*. J Transl Med, 2010. **8**: p. 39.
226. Fernando, A., et al., *Effect of culture conditions on the chemosensitivity of ovarian cancer cell lines*. Anti-Cancer Drugs, 2006. **17**(8).
227. Martinez, L.A., et al., *Coordinated changes in cell cycle machinery occur during keratinocyte terminal differentiation*. Oncogene, 1999. **18**(2): p. 397-406.
228. Leverkus, M., et al., *Proteasome inhibition results in TRAIL sensitization of primary keratinocytes by removing the resistance-mediating block of effector caspase maturation*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(3): p. 777-90.
229. Leverkus, M., et al., *Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in primary and transformed human keratinocytes*. Cancer Res, 2000. **60**(3): p. 553-9.
230. Jansen, B.J., et al., *Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand triggers apoptosis in dividing but not in differentiating human epidermal keratinocytes*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(6): p. 1433-9.
231. Newman, D.J. and G.M. Cragg, *Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010()*. Journal of natural products, 2012. **75**(3): p. 311-335.
232. Hasenoehrl, C., et al., *Anti-tumor effects of shikonin derivatives on human medullary thyroid carcinoma cells*. Endocr Connect, 2017. **6**(2): p. 53-62.
233. Kretschmer, N., et al., *Naphthoquinones from Onosma paniculata Induce Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Melanoma Cells*. Journal of Natural Products, 2012. **75**(5): p. 865-869.
234. Lotz, C., et al., *Cross-linked Collagen Hydrogel Matrix Resisting Contraction To Facilitate Full-Thickness Skin Equivalents*. ACS Appl Mater Interfaces, 2017. **9**(24): p. 20417-20425.
235. Burdall, S.E., et al., *Breast cancer cell lines: friend or foe?* Breast Cancer Res, 2003. **5**(2): p. 89-95.
236. Osborne, C.K., K. Hobbs, and J.M. Trent, *Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories*. Breast Cancer Research and Treatment, 1987. **9**(2): p. 111-121.
237. Elias, P.M., et al., *Formation and functions of the corneocyte lipid envelope (CLE)*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1841**(3): p. 314-8.
238. Bouwstra, J.A., et al., *Phase behavior of lipid mixtures based on human ceramides: coexistence of crystalline and liquid phases*. J Lipid Res, 2001. **42**(11): p. 1759-70.

239. Bouwstra, J.A., et al., *Structural investigations of human stratum corneum by small-angle X-ray scattering*. J Invest Dermatol, 1991. **97**(6): p. 1005-12.
240. Damien, F. and M. Boncheva, *The extent of orthorhombic lipid phases in the stratum corneum determines the barrier efficiency of human skin in vivo*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(2): p. 611-4.
241. Bouwstra, J., et al., *New aspects of the skin barrier organization*. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2001. **14 Suppl 1**: p. 52-62.
242. Mojumdar, E.H., et al., *The role of ceramide chain length distribution on the barrier properties of the skin lipid membranes*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1838**(10): p. 2473-83.
243. Thakoersing, V.S., et al., *Modulation of stratum corneum lipid composition and organization of human skin equivalents by specific medium supplements*. Exp Dermatol, 2015. **24**(9): p. 669-74.
244. Kezic, S. and I. Jakasa, *Filaggrin and Skin Barrier Function*. Curr Probl Dermatol, 2016. **49**: p. 1-7.
245. Manabe, M., et al., *Interaction of filaggrin with keratin filaments during advanced stages of normal human epidermal differentiation and in ichthyosis vulgaris*. Differentiation, 1991. **48**(1): p. 43-50.
246. Gruber, R., et al., *Filaggrin genotype in ichthyosis vulgaris predicts abnormalities in epidermal structure and function*. Am J Pathol, 2011. **178**(5): p. 2252-63.
247. Nemes, Z., et al., *A novel function for transglutaminase 1: attachment of long-chain omega-hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(15): p. 8402-7.
248. Behne, M., et al., *Omega-hydroxyceramides are required for corneocyte lipid envelope (CLE) formation and normal epidermal permeability barrier function*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(1): p. 185-92.
249. Lazo, N.D., J.G. Meine, and D.T. Downing, *Lipids are covalently attached to rigid corneocyte protein envelopes existing predominantly as beta-sheets: a solid-state nuclear magnetic resonance study*. J Invest Dermatol, 1995. **105**(2): p. 296-300.
250. Marekov, L.N. and P.M. Steinert, *Ceramides are bound to structural proteins of the human foreskin epidermal cornified cell envelope*. J Biol Chem, 1998. **273**(28): p. 17763-70.
251. Okuda, M., T. Yoshiike, and H. Ogawa, *Detergent-induced epidermal barrier dysfunction and its prevention*. J Dermatol Sci, 2002. **30**(3): p. 173-9.
252. Wei, T., et al., *Detergents with different chemical properties induce variable degree of cytotoxicity and mRNA expression of lipid-metabolizing enzymes and differentiation markers in cultured keratinocytes*. Toxicol In Vitro, 2006. **20**(8): p. 1387-94.
253. Zigrino, P., S. Löffek, and C. Mauch, *Tumor-stroma interactions: their role in the control of tumor cell invasion*. Biochimie, 2005. **87**(3): p. 321-328.
254. Bissell, M.J. and D. Radisky, *Putting tumours in context*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(1): p. 46-54.
255. Ruitter, D., et al., *Melanoma-stroma interactions: structural and functional aspects*. Lancet Oncol, 2002. **3**(1): p. 35-43.
256. Flach, E.H., et al., *Fibroblasts contribute to melanoma tumor growth and drug resistance*. Mol Pharm, 2011. **8**(6): p. 2039-49.
257. Sahai, E., et al., *A framework for advancing our understanding of cancer-associated fibroblasts*. Nat Rev Cancer, 2020. **20**(3): p. 174-186.

258. Parenteau, N.L., et al., *The organotypic culture of human skin keratinocytes and fibroblasts to achieve form and function*. Cytotechnology, 1992. **9**(1-3): p. 163-71.
259. Stark, H.J., et al., *Epidermal homeostasis in long-term scaffold-enforced skin equivalents*. J Investig Dermatol Symp Proc, 2006. **11**(1): p. 93-105.
260. Ng, K.W. and D.W. Hutmacher, *Reduced contraction of skin equivalent engineered using cell sheets cultured in 3D matrices*. Biomaterials, 2006. **27**(26): p. 4591-8.
261. Bruin, P., et al., *Biodegradable lysine diisocyanate-based poly(glycolide-co-epsilon-caprolactone)-urethane network in artificial skin*. Biomaterials, 1990. **11**(4): p. 291-5.
262. Ng, K.W., H.L. Khor, and D.W. Hutmacher, *In vitro characterization of natural and synthetic dermal matrices cultured with human dermal fibroblasts*. Biomaterials, 2004. **25**(14): p. 2807-18.
263. Lindberg, K. and S.F. Badylak, *Porcine small intestinal submucosa (SIS): a bioscaffold supporting in vitro primary human epidermal cell differentiation and synthesis of basement membrane proteins*. Burns, 2001. **27**(3): p. 254-66.
264. Pusch, J., et al., *The physiological performance of a three-dimensional model that mimics the microenvironment of the small intestine*. Biomaterials, 2011. **32**(30): p. 7469-78.
265. Braziulis, E., et al., *Modified plastic compression of collagen hydrogels provides an ideal matrix for clinically applicable skin substitutes*. Tissue Eng Part C Methods, 2012. **18**(6): p. 464-74.
266. Smola, H., et al., *Dynamics of basement membrane formation by keratinocyte-fibroblast interactions in organotypic skin culture*. Exp Cell Res, 1998. **239**(2): p. 399-410.
267. Nogrady, B., *Game-changing class of immunotherapy drugs lengthens melanoma survival rates*. Nature, 2020. **580**: p. S14+.
268. Wallstabe, L., et al., *ROR1-CAR T cells are effective against lung and breast cancer in advanced microphysiologic 3D tumor models*. JCI Insight, 2019. **4**(18).
269. Garraway, L.A. and P.A. Jänne, *Circumventing Cancer Drug Resistance in the Era of Personalized Medicine*. Cancer Discovery, 2012. **2**(3): p. 214.
270. Verma, M., *Personalized medicine and cancer*. J Pers Med, 2012. **2**(1): p. 1-14.
271. Folkman, J., *Tumor angiogenesis: therapeutic implications*. N Engl J Med, 1971. **285**(21): p. 1182-6.
272. Bergers, G. and L.E. Benjamin, *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(6): p. 401-10.
273. Kress, S., et al., *Evaluation of a Miniaturized Biologically Vascularized Scaffold in vitro and in vivo*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 4719.
274. Moroni, L., et al., *Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology*. Trends Biotechnol, 2018. **36**(4): p. 384-402.
275. Schanz, J., et al., *Vascularised human tissue models: a new approach for the refinement of biomedical research*. J Biotechnol, 2010. **148**(1): p. 56-63.

10. Publikationen und Konferenzbeiträge

Publikationen

Schmid FF*, Kleinhans C*, Schmid FV, Kluger PJ: Comparison of osteoclastogenesis and resorption activity of human osteoclasts on tissue culture polystyrene and on natural extracellular bone matrix in 2D and 3D; *Journal of Biotechnology*. 2015

Schmid FF, Schwarz T, Klos M, Schuberthan W, Walles H, Hansmann J, and Groeber FK: Applicability of a Dual-Arm Robotic System for Automated Downstream Analysis of Epidermal Models. *Applied In Vitro Toxicology*. 2016

Lotz C, **Schmid FF**, Rossi A, Kurdyn S, Kampik D, De Wever B, Walles H, Groeber FK: Alternative methods for the replacement of eye irritation testing; *ALTEX*. 2015

Groeber F, Engelhardt L, Lange J, Kurdyn S, **Schmid FF**, Rücker C, Mielke S, Walles H, Hansmann J: A first vascularized skin equivalent for as an alternative to animal experimentation; *ALTEX*. 2016

Groeber F, Schober L, **Schmid FF**, Traube A, Kolbus-Hernandez S, Daton K, Hoffmann S, Petersohn S, Schäfer-Korting M, Walles H., Mewes: Catch-up validation study of an *in vitro* skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase II), *Toxicology in Vitro*, Volume 36, 2016

Lotz C*, **Schmid FF***, Oechsle E, Monaghan MG, Walles H, Groeber-Becker F: Cross-linked Collagen Hydrogel Matrix Resisting Contraction To Facilitate Full-Thickness Skin Equivalents, *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2017

Schmid FV, Kleinhans C, **Schmid FF**, Kluger PJ: Osteoclast Formation within a Human Co-Culture System on Bone Material as an *In Vitro* Model for Bone Remodeling Processes; *JMFK*, 2018

Schmid FF*, Groeber-Becker F*, Schwab S, Thude S, Goebeler M, Walles H, Hansmann J: A standardized method based on pigmented epidermal models evaluates sensitivity against UV-irradiation; *ALTEX*, 2018

Lotz C., Kiesewetter L., **Schmid FF.**, Hansmann J., Walles H., Groeber-Becker F: Replacing the Draize eye test: Impedance spectroscopy as a 3R method to discriminate between all GHS categories for eye irritation; Sci Rep, 2018

Schmidt, FF, Nowakowski, S., Kluger, PJ: Improvement of a Three-Layered in vitro Skin Model for Topical Application of Irritating Substances. Front Bioeng Biotechnol, 2020

Leikeim A*, Wußmann M*, **Schmidt FF***, Neto NGB, Benz F, Tiltmann K, Junger C, Monaghan MG, Schilling B, Groeber-Becker FK,: Preclinical Model of Cutaneous Melanoma Based on Reconstructed Human Epidermis; Sci Rep, (under revision)

* *geteilte Erstautorenschaft*

Veröffentlichungen in Sachbüchern

Rico Brendtke, Bart De Wever, Freia Schmid, Florian Groeber, Jan Hansmann, Heike Walles: High-Throughput Screening Techniques, in Alternatives for Dermal Toxicity Testing, C. Eskes, E. van Vliet, and H.I. Maibach, Editors. 2017, Springer International Publishing: Cham. p. 579-592.

Konferenzbeiträge

EuroBioMat 2011, (Jena, D); 2011

Poster: Artificial Human Skin as *In Vitro* Test System for Implant Materials

ÖGMBT Jahrestagung 2011, (Puch, AU); 2011

Poster: Interactions of primary human skin cells and diamond coated implant material for endo-exo-prosthesis

3D Cell Culture (Freiburg, D); 2014

Poster: A co-culture model of human monocytes and mesenchymal stem cells for the investigation of bone remodeling processes

Galenus (Saarbrücken, D); 2015

Poster: Automation of production and quality control of a reconstructed human epidermis

SOT (San Diego, USA); 2015

Poster: Automated assessment of the barrier function of reconstructed human epidermis using a dual-arm robotic system

WITE (Würzburg, D); 2016

Poster: Automated assessment of the barrier function of reconstructed human epidermis using a dual-arm robotic system

3D Cell Culture (Freiburg, D); 2016

Poster: Increasing the barrier function of reconstructed human epidermis through biophysically optimized culture

Cell Culture Days (Graz, AU); 2017

Talk: Advanced *in vitro* skin models for risk and efficacy testing

TERMIS (Rhodos, GRC); 2019

Poster: Improvement of a 3-layered *in vitro* skin model for topical application of irritating substances

11. Curriculum Vitae

12. Danksagung

Bedanken möchte ich mich ganz besonders bei...

...*Prof. Dr. Heike Walles*, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit bei ihr am Lehrstuhl für Tissue Engineering und Regenerative Medizin durchführen zu können, für die Übernahme des Erstgutachtens und vor allem für ihr großes Engagement und ihre Herzlichkeit.

...*Prof. Dr. Matthias Goebeler*, für die Übernahme des Zweitgutachtens sowie für die Anregungen und Ratschläge, die sehr zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen haben.

...*Prof. Dr. Jan Hansmann* für die stets motivierende und begeisternde Art, die den einen oder anderen Rückschlag leichter machten.

...*Dr. Florian Groeber-Becker*, der als hochmotivierter Betreuer meine Ideen gefördert und meine wissenschaftliche Entwicklung vorangetrieben hat. Vielen Dank für diese außerordentliche Unterstützung!

...*Dr. Joachim Nickel* für die Möglichkeit ans QIMR nach Australien zu reisen und damit meinen Fokus auf das maligne Melanom zu lenken.

...*Nick Hayward, Lauren and Vaish* for an amazing and instructive time in Brisbane at the QIMR.

...*Beate Rinner* und *Alexander* für die Unterstützung mit den MUG-Mel2 Zellen.

...*Courage+Khazaka* für die gute Zusammenarbeit.

...*Kendra Tiltmann, Amelie Reigl* und *Anton Xu* für Ihre großartige und motivierte Arbeit.

...allen Mitarbeitern des Lehrstuhls für Tissue Engineering und Regenerative Medizin sowie des Fraunhofer ISC, für die außerordentliche Arbeitsatmosphäre

...*Angela, Christa, Lisa, Matthias* und *Christian* für die Integration in die fränkische Lebensweise.

...*Anni* und *Kaddi* für die Korrektur.

...*meiner Familie* und *meinen Freunden* – denn *immer wenn ich euch seh' wird's in mir wieder Frühling!*

und in unbeschreiblichem Maße bei *meinem Arno*.....*a thousand days and the sun won't shine, before I come back to you'*.

-I'm making my way home-