



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

Sektion Biomedizin

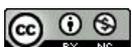
**Humane organotypische 3D Modelle des Malignen
Melanoms als in vitro Testsystem für die Bewertung der
Wirksamkeit von anti-Tumor Therapeutika**

Human organotypic 3D models of malignant melanoma as an in vitro test
system to evaluate the efficacy of anti-tumor therapeutics

vorgelegt von

Maximiliane Wußmann

Würzburg 2023



Eingereicht am:

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzende/r: Prof. Dr. Christian Janzen

1. Betreuer: Dr. Florian Kai Groeber-Becker

2. Betreuer: Priv.-Doz. Dr. med. Niklas Beyersdorf

3. Betreuer: Prof. Dr. med. Bastian Schilling

4. Betreuerin: Prof. Dr. Svenja Meierjohann

Tag des Promotionskolloquiums:

Zusammenfassung

Das maligne Melanom, eine der seltensten, aber gleichzeitig auch die tödlichste dermatologische Malignität, gekennzeichnet durch die Neigung zu einer frühen Metastasierung sowie die rasche Entwicklung von Therapieresistenzen, zählt zu den Tumorentitäten mit dem höchsten Anstieg der Inzidenz weltweit. Mausmodelle werden häufig verwendet, um die Melanomagense zu erforschen und neue effektive therapeutische Strategien zu entwickeln, spiegeln die menschliche Physiologie allerdings nur unzureichend wider. In zweidimensionalen (2D) Zellkulturen mangelt es dagegen an wichtigen Komponenten der Mikroumgebung des Tumors und dem dreidimensionalen Gewebekontext. Um dieses Manko zu beheben und die Entwicklung von auf den Menschen übertragbaren Tumormodellen in der onkologischen Forschung voranzutreiben, wurde als Alternative zu Zellkulturen und Tierversuchen humane organotypische dreidimensionale (3D) Melanom-Modelle als in vitro Testsystem für die Bewertung der Wirksamkeit von anti-Tumor Therapeutika entwickelt.

Im Zuge dieser Arbeit konnte das in vitro Melanom-Modell entscheidend weiterentwickelt werden. So konnten Modelle unterschiedlichster Komplexität etabliert werden, wobei abhängig von der Fragestellung einfachere epidermale bis hin zu unterschiedlich komplexen Vollhautmodellen Anwendung finden. Durch Simulation der Tumor-Mikroumgebung eignen sich diese zur präklinischen Validierung neuer Tumor-Therapeutika, sowie der Erforschung pathologischer Vorgänge, von der Tumor-Formierung bis zur Metastasierung. Zudem konnten erfolgreich unterschiedlichste humane Melanomzelllinien ins Modell integriert werden; dadurch, dass sich diese durch ihre Treibermutationen, die zur Krankheitsentstehung beitragen, unterscheiden, stellen sie unterschiedliche Ansprüche an potentielle therapeutische Angriffspunkte und ermöglichen das Widerspiegeln vieler Melanom-Subtypen im Modell. Ferner ist es möglich, verschiedene Stadien der Tumor-Entwicklung über die Zugabe von Melanomzellen in Einzelsuspension bzw. von Melanom-Sphäroiden widerzuspiegeln. Es konnte für bestimmte Therapie-Ansätze, wie zielgerichtete Therapien, z.B. die Gabe von sich in der Klinik im Einsatz befindlicher BRAF-/MEK-Inhibitoren, gezeigt werden, dass sich die etablierten Modelle hervorragend als präklinische Testsysteme zur Wirksamkeitsbewertung eignen. Zudem bieten sich einzigartige Möglichkeiten, um die Interaktion humaner Tumorzellen und gesunder Zellen in einem Gewebeverband zu untersuchen. Ferner konnten drei neue technische Analyse-Verfahren zur nicht-invasiven Detektion der Tumor- Pro- und Regression, Beurteilung der Wirksamkeit von potenziellen Anti-Tumor-Therapien sowie der Evaluierung des Tumor-Metabolismus implementiert werden. Perspektivisch ermöglichen immun-kompetente Melanom-Modelle die Austestung neuer Immun- und Zelltherapien in einem voll humanen System; gleichzeitig leisten die etablierten Modelle einen signifikanten Beitrag zur Reduktion von Tierexperimenten.

Abstract

Malignant melanoma, one of the rarest but also the most lethal dermatological malignancies, characterized by a propensity for early metastasis as well as the rapid development of therapy resistance, is among the tumor entities with the highest increase in incidence worldwide. Mouse models are widely used to study melanomagenesis and develop new effective therapeutic strategies, but do not adequately reflect human physiology. In contrast, two-dimensional (2D) cell cultures lack important components of the tumor microenvironment and three-dimensional tissue context. To address this shortcoming and to advance the development of human-transferable tumor models in oncology research, human organotypic three-dimensional (3D) models of malignant melanoma were developed as an alternative to cell cultures and animal experiments as an *in vitro* test system for evaluating the efficacy of anti-tumor therapeutics.

In the course of this work, the *in vitro* melanoma model could be significantly further developed. Thus, melanoma models of different complexity could be established, with simpler epidermal to differently complex full skin models being applied, depending on the research question. By simulating the tumor microenvironment, these are suitable for the preclinical validation of new tumor therapeutics, as well as the study of pathological processes, from tumor shaping to metastasis. In addition, a wide variety of human melanoma cell lines have been successfully integrated into the model; by differing in their driver mutations that contribute to disease development, they pose different requirements for potential therapeutic targets and allow many melanoma subtypes to be reflected in the model. Furthermore, it is possible to reflect different stages of tumor development via the addition of melanoma cells in single suspension or melanoma spheroids. For certain therapeutic approaches in malignant melanoma, such as targeted therapies, e.g. the administration of BRAF/MEK inhibitors currently in use in the clinic, it could be shown that the established models are excellently suited as preclinical test systems for efficacy evaluation. In addition, unique opportunities are provided to study the interaction of human tumor cells and healthy cells in a tissue composite. Furthermore, three new technical analysis methods for non-invasive detection of tumor progression and regression, assessment of efficacy of potential anti-tumor therapies, and evaluation of tumor metabolism could be implemented. In perspective, immune-competent melanoma models enable the testing of new immune and cell therapies in a fully human system; at the same time, the established models contribute significantly to the reduction of animal experiments.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	III
Abstract	IV
Inhaltsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Das maligne Melanom.....	1
1.2. Das Tumormetabolom und Interaktion innerhalb der Tumormikroumgebung.....	5
1.3. Klassifikation, Diagnosemethoden, Therapie-Strategien und -Entwicklung beim malignen Melanom.....	9
1.4. In vitro Melanom-Modelle in der onkologischen Forschung	14
1.5. Zielsetzung der Dissertation	16
2. Material	17
2.1. Chemikalienliste.....	17
2.2. Puffer und Lösungen.....	19
2.3. Zellkulturmedien und Supplemente.....	21
2.4. Antikörper	22
2.5. Laborgeräte	24
2.6. Laborausstattung	26
2.7. Verbrauchsmaterialien.....	26
2.8. Software.....	28
3. Methoden.....	29
3.1. Zellkultur Methoden.....	29
3.1.1. Isolation von primären humanen Hautzellen und Herstellung von Trägerstruktur-Materialien	29
3.1.2. Zweidimensionale Zellkultur	32
3.1.3. Kultivierung und Fixierung von Zellen auf Glasplättchen.....	35
3.1.4. Induktion von Krebs-assoziierten Fibroblasten.....	35
3.1.5. Generierung aktivierter CD3+ T Zellen.....	36
3.1.6. Bestimmung der Proliferationsraten mittels XCelligence®	37
3.1.7. Generierung von dreidimensionalen Gewebe-Äquivalenten.....	38
3.2. Messung der zellulären Aktivität.....	42
3.2.1. MTT Zellviabilitäts-Assay	42
3.2.2. Bestimmung der Metabolit-Konzentration	42
3.2.3. Zwei-Photonen Fluoreszenz-Lifetime-Imaging-Mikroskopie.....	43
3.3. MIA ELISA-Assay	43
3.4. Durchflusszytometrische Analyse	44
3.5. Nicht-invasives Monitoring maligner Melanome	44
3.5.1. MediTOM.....	44

3.5.2. Optische Kohärenz-Tomographie	45
3.6. Methoden zur histologischen Analyse der Gewebe-Äquivalente.....	45
3.6.1. Paraffineinbettung, Schnittpräparation, Entparaffinierung und Rehydrierung von Paraffinschnitten.....	45
3.6.2. Dehydrierung von Paraffinschnitten und Einbetten von Proben	46
3.6.3. Hämatoxylin- und Eosin-Färbung.....	46
3.6.4. Immunhistochemie und Immunfluoreszenz.....	47
3.6.5. TUNEL-Färbung	49
3.7. Anwendung organotypischer Modelle des malignen Melanoms als präklinische Testsysteme.....	50
3.7.1. Zielgerichtete Behandlung des malignen Melanoms.....	50
3.7.2. Anti-Tumor-Therapie mit Peptid RDP22	51
4. Ergebnisse.....	52
4.1. Entwicklung humaner organotypischer 3D Modelle des malignen Melanoms	52
4.1.1. Etablierung und Charakterisierung epidermaler Melanom-Modelle.....	53
4.1.2. Etablierung und Charakterisierung dermal-epidermaler Melanom-Modelle auf Kollagen-Hydrogel-Basis.....	58
4.1.3. Widerspiegeln unterschiedlicher Melanom-Subtypen im in vitro Modell	62
4.1.4. Interaktion des Melanoms mit der Mikroumgebung und Charakterisierung der unterschiedlichen Tumorstadien	63
4.1.5. Etablierung und Charakterisierung dermal-epidermaler Melanom-Modelle auf Basis vollsynthetischer PA6-Fasern	66
4.2. Implementierung nicht-invasiver Monitoring-Methoden.....	69
4.2.1. Detektion der Tumorpro- und -regression mittels MediTOM	69
4.2.2. Detektion nicht-pigmentierter Melanome mittels Optischer Kohärenz-Tomographie ..	71
4.2.3. Ortsaufgelöste Messung des Zell- und Tumor-Metabolismus mittels Zwei-Photonen Fluoreszenz-Lifetime-Imaging-Mikroskopie	74
4.3. Anwendung organotypischer Modelle des malignen Melanoms als präklinische Testsysteme zur Wirksamkeits-Testung von anti-Tumor Therapeutika	75
4.3.1. Zielgerichtete medikamentöse Behandlung des malignen Melanoms	75
4.3.2. Anti-Tumor Therapie mit Peptid RDP22	89
4.4. Steigerung der Komplexität des organotypischen Modells durch Integration und Analyse des Einflusses von Komponenten der Tumormikroumgebung.....	92
4.4.1. Analyse des Einflusses auf die Melanomentwicklung stromaler Komponenten im in vitro Melanom-Modell	92
4.4.2. Integration und Analyse der Auswirkungen von Krebs-assoziierten Fibroblasten.....	98
4.4.3. Integration von T Zellen in die organotypischen Gewebe-Äquivalente.....	104
5. Diskussion	110
6. Fazit und Ausblick.....	124
Literaturverzeichnis	126
Appendix.....	142
Abbildungsverzeichnis.....	142

Tabellenverzeichnis	151
Eidesstattliche Erklärung	XIII
Affidavit	XIII
Publikationen und Konferenzbeiträge.....	XIV
Curriculum Vitae.....	XVI
Danksagung.....	XVIII

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
2D	zweidimensional
2-P FLIM	Zwei-Photonen Fluoreszenz-Lifetime-Imaging-Mikroskopie
3D	dreidimensional
AA ₂ P	L-Ascorbic acid 2-phosphate
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ALI	Air-Liquid-Interface
AMBER	Advanced Materials and Bioengineering Research Centre
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenin-Tri-Phosphat
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BRAF	v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
BSA	Bovine Serum Albumine
C	Cobimetinib
Ca ²⁺	Calcium
CaCl ₂	Calciumchlorid Dihydrat
CAF	Cancer Associated Fibroblast
CAR T Zelle	chimären Antigenrezeptor-T Zelle
CASP.3	gespaltene Caspase-3, Caspase-3
CeDeD	Center of Device Development
CI	Zell-Index
CK	Cytokeratin
cm	Centimeter
CM	konditioniertes Medium
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Cobimetinib	[3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-iodophenyl)amino]phenyl][3-hydroxy-3-(2S)-2-piperidinyl-1-azetidiny]-Methanon
Coll	Collagen I
CollIV	KollagenIV
CT	Computertomographie
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
d	Tag(e)

D.....	<i>Deutschland, Dermis</i>
DAB.....	<i>Diaminobenzidine</i>
DAPI.....	<i>4',6-Diamidin-2-phenylindol</i>
DKFZ.....	<i>Deutsches Krebsforschungszentrum</i>
DKTK.....	<i>Deutsches Konsortium für translationale Krebsforschung</i>
DMEM.....	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO.....	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA.....	<i>Desoxyribonukleinsäure</i>
E-Cadherin.....	<i>epitheliales Cadherin</i>
ECM.....	<i>extrazelluläre Matrix</i>
EDTA.....	<i>Ethylendiamintetraacetat</i>
ELISA.....	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMT.....	<i>epitheliale mesenchymale Transition</i>
ERK.....	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
F&E.....	<i>Forschung und Entwicklung</i>
FACS.....	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAD.....	<i>Flavin-Adenin-Dinukleotid</i>
FAP.....	<i>Fibroblast Activated Protein, Fibroblast Activated Protein</i>
Fc- Region.....	<i>fragmentkristallisierbare Region</i>
FCS.....	<i>Fetales Kälberserum</i>
FDA.....	<i>Food and Drug Administration</i>
FTSE.....	<i>Full Thickness Skin Equivalent</i>
FTSE ^{PA6}	<i>full thickness skin equivalent on PA6 basis</i>
g.....	<i>Gramm</i>
GNL.....	<i>Gelneutralisationlösung</i>
GvHD.....	<i>Graft-versus-Host Erkrankung</i>
h.....	<i>Stunde(n)</i>
H ₂ O.....	<i>Wasser</i>
hdF.....	<i>humaner dermaler Fibroblast</i>
HE.....	<i>Hämatoxylin- und Eosin</i>
heKs.....	<i>humaner epidermaler Keratinozyt</i>
HEPES.....	<i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
HGF.....	<i>Hepatocyte Growth Factor</i>
HKGS.....	<i>Human Keratinocyte Growth Supplement</i>
HMB-45.....	<i>Human Melanoma Black-45</i>
HRP.....	<i>horse radish peroxidase</i>
ICI.....	<i>Immun-Checkpoint-Inhibitor</i>

IF.....	<i>Immunfluoreszenz</i>
IHC.....	<i>Immunhistochemie</i>
IL.....	<i>Interleukin</i>
KGF.....	<i>Human Keratinocyte Growth Factor</i>
Kol I.....	<i>Kollagen Typ I</i>
L.....	<i>Liter</i>
LDH.....	<i>Laktatdehydrogenase</i>
m.....	<i>Milli</i>
M.....	<i>Membran</i>
MACS®.....	<i>magnetic cell sorting</i>
MAPK.....	<i>Mitogen-aktivierte Proteinkinase</i>
MART-1.....	<i>Melanoma-associated antigen recognized by T cells 1</i>
MC1R.....	<i>Melanocortin-Rezeptor 1</i>
MEK.....	<i>Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase</i>
mFTSE.....	<i>melanoma full thickness skin equivalent</i>
mFTSE ^{PA6}	<i>melanoma full thickness skin equivalent on PA6 basis</i>
Mg ²⁺	<i>Magnesium</i>
MIA.....	<i>melanoma inhibitory activity</i>
Min.....	<i>Minute(n)</i>
MiTF.....	<i>Microphthalmia-associated transcription factor</i>
mm.....	<i>Millimeter</i>
MMP.....	<i>Matrix-Metalloproteinase</i>
mOS-REp.....	<i>melanoma open source reconstructed epidermis</i>
MRT.....	<i>Magnetresonanztomographie</i>
MTT.....	<i>3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid</i>
NAD(P)H.....	<i>Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid(phosphat)</i>
N-Cadherin.....	<i>neurales Cadherin</i>
NGS.....	<i>Next Generation Sequencing</i>
nm.....	<i>Nanometer</i>
nM.....	<i>Nanomolar</i>
NRAS.....	<i>neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>
ns.....	<i>Nanosekunde(n)</i>
OCT.....	<i>optical coherence tomography</i>
ORR.....	<i>optical redox ratio</i>
OS-REp.....	<i>open source reconstructed epidermis</i>
P.....	<i>Passage</i>
P/S.....	<i>Penicillin/Streptomycin</i>

PA6	<i>Polyamid 6</i>
PBMC.....	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS.....	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
P-Cadherin	<i>Placental Cadherin</i>
PD-1.....	<i>Programmed cell death protein 1</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PD-L1	<i>Programmed cell death ligand 1</i>
PET	<i>Positronen-Emissions-Tomographie</i>
PFA.....	<i>Paraformaldehyd</i>
pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
PRAME	<i>Preferentially Expressed Antigen in Melanoma</i>
PROTAC	<i>proteolysis targeting chimera</i>
PS	<i>Phosphatidylserin</i>
RDP22	<i>Peptid R-DIM-P-LF11-322</i>
RHE	<i>Reconstructed Human Epidermis</i>
RNA	<i>Ribonukleinsäure</i>
ROI.....	<i>Regionen von Interesse</i>
RT	<i>Raumtemperatur</i>
RTCA	<i>real-time cell analysis</i>
SB.....	<i>Stratum Basale</i>
SC.....	<i>Stratum Corneum</i>
SDF-1.....	<i>Stromal Cell Derived Factor 1</i>
SDS.....	<i>Natriumdodecylsulfat</i>
SG.....	<i>Stratum Granulosum</i>
SS.....	<i>Stratum Spinosum</i>
T Z.....	<i>T Zelle</i>
TAM	<i>tumorassoziierter Makrophage</i>
TdT.....	<i>terminale Desoxynukleotidtransferase</i>
TGF.....	<i>Transforming Growth Factor</i>
TMB	<i>Tetramethylbenzidin</i>
TME	<i>Tumor Microenvironment</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling</i>
U.	<i>Unit</i>
ü.N	<i>über Nacht</i>
USA.....	<i>United States of America</i>
UV.....	<i>ultraviolett</i>
V.....	<i>Vemurafenib</i>

V600E	<i>spezifische Valinsubstitution durch Glutaminsäure am Codon 600</i>
V600K	<i>spezifische Valinsubstitution durch Lysin am Codon 600</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
Vemurafenib	<i>N-[3-[[5-(4-chlorophenyl)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl]carbonyl]-2,4-difluorophenyl]-1-Propanesulfonamid</i>
x g	<i>times gravity</i>
z.B.	<i>zum Beispiel</i>
α MSH	<i>α-Melanozyten-stimulierendes Hormon</i>
α SMA	<i>α-Smooth Muscle Actin</i>
μ	<i>mikro</i>
μ M	<i>Mikromolar</i>
T_{avg}	<i>durchschnittliche Fluoreszenzlebensdauer</i>

1. Einleitung

1.1. Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist eine der seltensten, aber gleichzeitig auch die tödlichste dermatologische Malignität. Obwohl das maligne Melanom weniger als 5 % aller Hautkrebserkrankungen ausmacht, ist es für bis zu 90 % aller hautkrebsbedingten Todesfälle weltweit verantwortlich [1, 2]. Die hohe Sterblichkeitsrate von Melanompatienten ist vor allem auf die Neigung zu einer frühen Metastasierung sowie auf die rasche Entwicklung von Therapieresistenzen zurückzuführen [3, 4]. Trotz zahlreicher Präventionsbemühungen, wie 2008 der Einführung eines Hautkrebscreenings ab dem 35. Lebensjahres [5], hat die weltweite Inzidenz des Melanoms in den letzten Jahrzehnten kontinuierlich zugenommen, was das maligne Melanom zu einem ernststen Problem der öffentlichen Gesundheit macht [6, 7]. So stieg allein in Deutschland die Inzidenz in den Jahren 1970-2012 um das Siebenfache, womit das maligne Melanom mittlerweile den 4. (bei den Frauen) bzw. 5. (bei den Männern) Platz der häufigsten Tumorerkrankungen [5, 8] belegt mit etwa 22000 Neuerkrankungen und 3000 Todesfällen pro Jahr. Zudem wird in den nächsten 20 Jahren mit einer Verdoppelung der Neuerkrankungsrate gerechnet [9]. Trotz steigender Inzidenz und hoher Metastasierungsrate ist die Mortalität vergleichsweise niedrig mit einer relativen 5-Jahres-Überlebensrate von rund 95 %. Grund hierfür ist, dass etwa 2/3 aller Melanome in einem frühen Tumorstadium (UICC I) entdeckt und operativ entfernt werden können [8, 5]. Mit zunehmendem Stadium sinkt die Überlebensrate rapide und beträgt für Patien:innen mit Stadium IV-Melanom bei Erstdiagnose lediglich 31,9%.

Nichtsdestotrotz unterstreicht die hohe Aggressivität des malignen Melanoms die Notwendigkeit einer frühzeitigen Diagnose und der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien.

Umwelteinflüsse und genetische Dispositionen sind zwei der vielen Faktoren, die zur Erkrankung beitragen können. Eine erhöhte Anzahl an melanozytären oder dysplastischen Nävi, ein Melanom in der eigenen oder familiären Krankengeschichte sowie niedrige Phototypen (helle Haut, blonde oder rote Haare und blaue Augen) sind weitere Risikofaktoren. Die Dauer und Stärke natürlicher oder künstlicher UV-Exposition gilt als wichtigster exogener Einfluss, insbesondere in der Kindheit und Jugend [10, 1] vor allem in Form wiederkehrender Sonnenbrände und starker Sonnenlichtexposition [9]. Weitere Ursachen sind medikamentöse, toxische oder endokrine Einflüsse.

Ein malignes Melanom differenziert in ca. 30 % der Fälle aus den kongenitalen bzw. erworbenen Nävi, wohingegen sich ca. 60 % de novo entwickeln [11]. Bis heute ist dabei unklar, ob ein malignes Melanom aus ausdifferenzierten Melanozyten oder aus Vorläuferzellen, sogenannten Melanoblasten oder melanozytären Stammzellen, hervorgeht [12, 13].

Das maligne Melanom kann sich aus pigmentproduzierenden Melanozyten, die aus der Neuralleiste stammen und in der Basalschicht der Epidermis angesiedelt sind, durch eine bösartige Transformation, die als Melanomagenese bezeichnet wird [14], entwickeln. Melanozyten synthetisieren Melanin in pigmentproduzierenden Organellen, den Melanosomen, und geben es an benachbarte Keratinozyten ab, wobei ein Melanozyt ca. 36 Keratinozyten mit dem Melaninpigment versorgt [15]. Das Hautpigment Melanin, das sich oberhalb des Zellkerns anreichert, schützt die genomische Desoxyribonukleinsäure (DNA) aufgrund seiner lichtstreuenden und absorbierenden Eigenschaften vor Schäden durch schädliche ultraviolette (UV) Strahlung [16].

Als Reaktion auf durch UV-Strahlung verursachte DNA-Schäden schütten Keratinozyten das α -Melanozyten-stimulierende Hormon (α MSH) aus, das an den Melanocortin-Rezeptor 1 (MC1R) auf Melanozyten bindet und so die Produktion und Freisetzung von Melanin in Form einer positiven Rückkopplungsschleife erhöht [17]. Durch die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen regulieren die basalen Keratinozyten auch das Wachstum, das Überleben, die Adhäsion, die Migration und die Differenzierung der Melanozyten in der gesunden menschlichen Haut. Bei der malignen Transformation entziehen sich die Melanozyten der strengen Kontrolle der basalen Keratinozyten, was Wachstum, Überleben und Invasion der Tumorzellen begünstigt [18, 19].

Selten können Melanome auch andere Körperregionen betreffen, wie das Auge (Bindehaut und Aderhaut), die Hirnhäute und Schleimhäute verschiedener Lokalisation. Das kutane Melanom ist jedoch die häufigste Form [20]. Klinisch und histologisch werden folgende Melanom-Subtypen unterschieden:

- Lentigo Maligna Melanom, ca. 10%
- Superfiziell Spreitendes Melanom, ca. 60%
- Noduläres Melanom, ca. 20%
- Akral Lentiginöses Melanom, ca. 5%

Die Melanomagenese ist durch einen mehrstufigen Prozess von Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen gekennzeichnet, die den Zellzyklus verändern und Melanozyten anfälliger für die karzinogenen Wirkungen UV-Strahlung machen [21]. Am häufigsten betroffen sind die Onkogene v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B (BRAF) und

neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog (NRAS), die für Proteine des Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalweges kodieren, der das Zellwachstum, die Proliferation und die Differenzierung von Melanozyten reguliert [22–25]. Mutationen von BRAF und NRAS führen zu einer kontinuierlich aktivierten Signaltransduktion, die folglich die Zellproliferation und das Überleben fördert [22, 20]. Somatische Punktmutationen in BRAF wurden bei bis zu 66 % der malignen Melanome festgestellt [25, 22, 26, 27], während NRAS-Mutationen nur bei 15-30 % der primären und metastasierten Melanome auftreten [28]. Etwa 70 % der Fälle mit BRAF-Mutation zeigen eine spezifische Valinsubstitution durch Glutaminsäure am Codon 600 (V600E), während bei 20 % der Patienten Lysin (V600K) das gleiche Valin ersetzt. Nur etwa 6 % fallen auf andere Genotypen [29]. Darüber hinaus wurden neben NRAS- und BRAF-Mutationen auch andere Treibermutationen identifiziert, die zur Entstehung des malignen Melanoms beitragen [30].

Die Melanomagenese ist, wie bereits erwähnt, nicht das Ergebnis eines einzigen Mutationsereignisses, sondern vielmehr durch mehrere genetische Veränderungen gekennzeichnet, durch welche sich das maligne Melanom im Laufe der Zeit über histopathologisch gut charakterisierte Phasen entwickelt, erstmals 1991 von Clark beschrieben [31]. Das Clark-Modell der Melanomagenese schildert die histologischen Veränderungen, die während dieses langsamen Transformationsprozesses auftreten, ausgehend von gesunden Melanozyten in fünf verschiedenen Stadien (*Abbildung 1-1*).

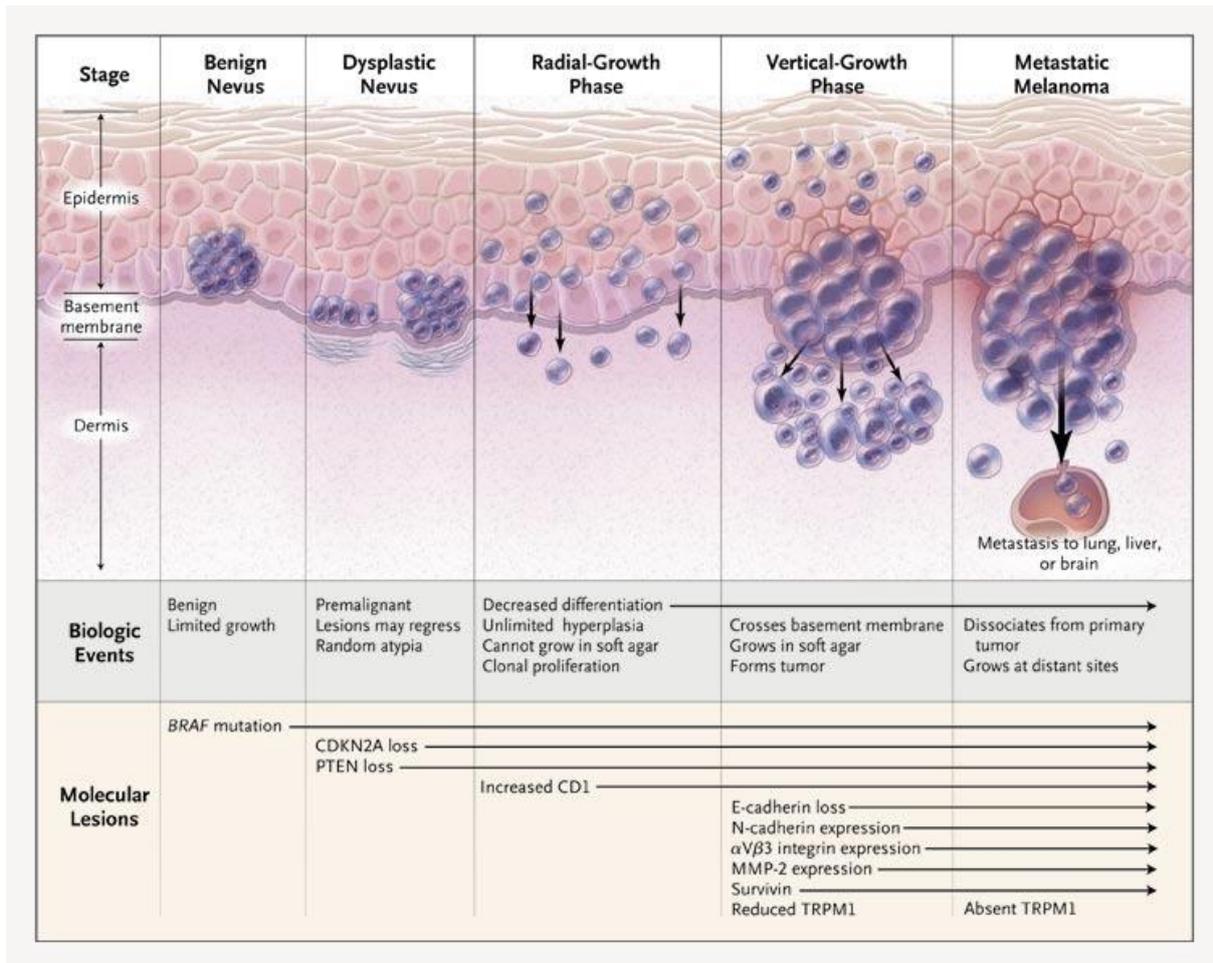


Abbildung 1-1: **Das 5 Stadien umfassende Modell der Melanomagenese nach Clark.** Biologische Ereignisse und molekulare Veränderungen während der Melanom-Progression, charakteristisch für ein jedes Stadium. Entnommen aus [1].

Laut Clark [31] beginnt die Melanomentwicklung mit einem gutartigen melanozytären Nävus, der aus angesammelten und proliferativ aktiven Melanozyten, in der Basalschicht der Epidermis lokalisiert, besteht. Diese Nävi können das Ergebnis einer einzigen Mutation sein, z. B. einer BRAF-Mutation, die zu einer erhöhten Melanozytenproliferation und Hyperpigmentierung führt. Da die durch das Onkogen verursachte Zellseneszenz ihre Proliferationskapazität vorübergehend einschränkt, entwickeln sich melanozytäre Nävi nur selten zu Krebs, obwohl die Wachstumskontrolle in diesen Zellen gestört ist.

Der Erwerb zusätzlicher molekularer Läsionen bei Genen und Proteinen, die an der Zellzykluskontrolle beteiligt sind, kann jedoch das Fortschreiten von gutartigen Nävi zu dysplastischen Nävi ermöglichen. Dysplastische Nävi unterscheiden sich von benignen Nävi durch abweichende Differenzierung und zytologische Atypien.

Die aberranten Zellen der dysplastischen Nävi können mit zunehmender Dedifferenzierung in die radiale Wachstumsphase eintreten. Die malignen Zellen breiten sich in dieser Phase horizontal in der Epidermis aus und disseminieren in die suprabasalen Schichten. Einzelne

Zellen beginnen, ein invasives Potenzial zu entwickeln, obwohl das melanozytäre Wachstum normalerweise auf das epidermale Kompartiment beschränkt ist.

Durch den Eintritt der Zellen in die vertikale Wachstumsphase, wo sie weitere migratorische und invasive Eigenschaften erwerben, wird die Melanomagenese fortgesetzt. Der Verlust des epithelialen (E)-Cadherin und die Expression von neuralem (N)-Cadherin kennzeichnen den Übergang von der radialen Wachstumsphase zur vertikalen Wachstumsphase. Dies ermöglicht den Zellen, mit anderen N-Cadherin-exprimierenden Zellen des dermalen Kompartiments zu interagieren. Die Expression von α 3-Integrin wird während des epithelial-mesenchymalen Übergangs ausgelöst, was zur Expression von Matrix-Metalloproteinase 2 (MMP-2) führt, einem Enzym, das in der Lage ist, Kollagen der Basalmembran abzubauen und somit das invasive Wachstum von Melanomzellen zu ermöglichen.

Die metastatische Ausbreitung ist der letzte Schritt der Melanomprogression nach der lokalen Invasion in die Dermis und dem intradermalen Wachstum des Melanoms. Bevorzugt bilden sich Sekundärläsionen durch Anschluss an das lymphogene und hämatogene System in Leber, Lunge und Gehirn [1, 31].

1.2. Das Tumormetabolom und Interaktion innerhalb der Tumormikroumgebung

Eine bedeutende Veränderung der Stoffwechselaktivität von Tumorzellen, die sich in einer erhöhten Glukoseumsatzrate und einer verstärkten Laktatproduktion äußert, ist mit der Melanomagenese verbunden, wobei sich der Stoffwechsel von Tumorzellen und normalen Zellen erheblich unterscheidet [32]. Eine hohe glykolytische und glutaminolytische Verstoffwechslung und hohe Werte an Phosphometaboliten sind Merkmale des Tumormetaboloms, welches die Vermehrung von Tumorzellen unter starken Schwankungen der Sauerstoff- und Glukoseversorgung [33] ermöglicht. Otto Warburg stellte erstmals diese erhöhte glykolytische Verstoffwechslung von Glukose in Gegenwart von Sauerstoff fest [34, 35] (*Abbildung 1-2*).

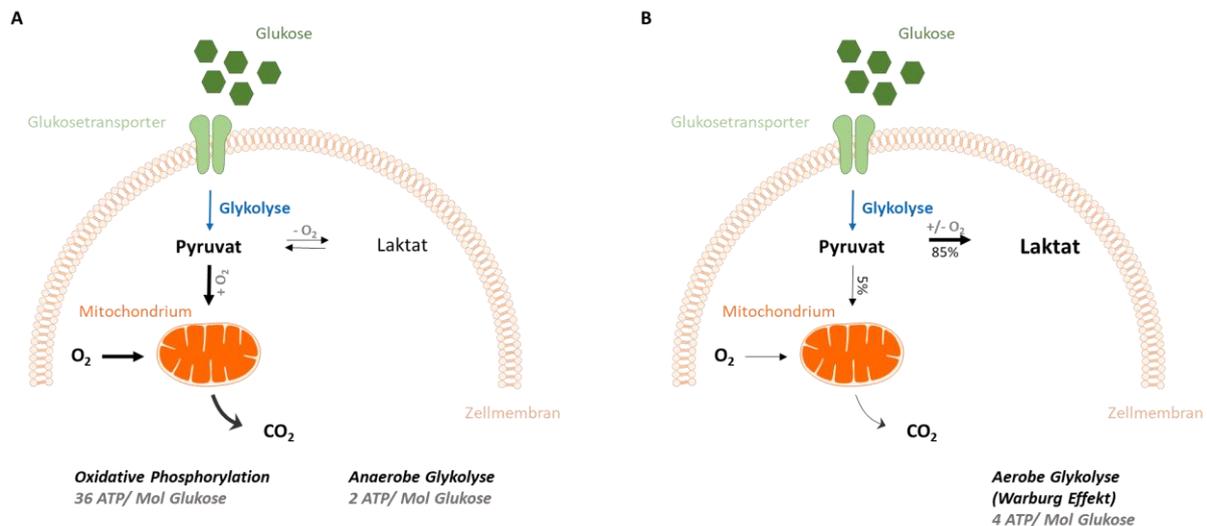


Abbildung 1-2: **Schematische Darstellung des Glukose-Stoffwechsels von gesunden (links) und Tumorzellen (rechts).** (A) Normale Zellen verstoffwechseln in Gegenwart von Sauerstoff zunächst Glukose über die Glykolyse zu Pyruvat und oxidieren dann den größten Teil dieses Pyruvats in den Mitochondrien während des Prozesses der oxidativen Phosphorylierung vollständig zu CO_2 und produzieren so ungefähr 36 ATP pro Glukosemolekül. In einer hypoxischen Umgebung werden Pyruvate angesammelt und erzeugen nur zwei ATP. (B) Krebszellen nutzen, unabhängig davon, ob Sauerstoff vorhanden ist oder nicht, nahezu ausschließlich den Glykolyseprozess; pro Glukosemolekül werden 4 ATP produziert.

Gesunde Zellen verstoffwechseln in Gegenwart von Sauerstoff zunächst Glukose zu Pyruvat und oxidieren dann den größten Teil davon in den Mitochondrien während der oxidativen Phosphorylierung vollständig zu CO_2 , wohingegen in einer hypoxischen Umgebung Pyruvate angesammelt werden (Abbildung 1-2 A).

Tumorzellen auf der anderen Seite wandeln, unabhängig vom Sauerstoffgehalt, anders als gesunde Zellen, die aufgenommene Glukose hauptsächlich in Laktat um (Abbildung 1-2 B). Otto Warburg bezeichnete dieses Phänomen als aerobe Glykolyse [33, 36]. Unklar ist dabei allerdings noch immer, warum Tumorzellen ihren Stoffwechsel von einem effizienten Stoffwechsel mit der Produktion von 36 ATP (Adenin-Tri-Phosphat) auf einen ineffizienteren Weg mit der Produktion von 4 ATP umstellen [37].

Bekanntermaßen haben schnell proliferierende Zellen einen erhöhten Energieverbrauch und benötigen eine schnelle ATP-Produktion sowie eine erhöhte Synthese und schnelle Bereitstellung von Makromolekülen [38]. Es wird daher spekuliert, dass Tumorzellen über den Warburg-Effekt einerseits eine schnellere ATP-Synthese trotz geringerer Ausbeute erreichen und andererseits Biomasse, wie Nukleotide, Aminosäuren und Lipide bilden, indem sie über verzweigte Stoffwechselwege zahlreiche Zwischenprodukte der Glykolyse als Kohlenstoffquelle nutzen [39, 37].

Gleichzeitig ändern die Tumorzellen die metabolische Zusammensetzung des umliegenden extrazellulären Milieus, was die Mikroumgebung des Tumors beeinflusst [40]. Zudem haben nicht nur Tumorzellen einen veränderten Stoffwechsel, sondern auch Zellen in der Tumormikroumgebung (TME, Tumor Microenvironment), wie krebsassoziierte Fibroblasten

(CAFs, Cancer Associated Fibroblasts), haben ihren Stoffwechsel auf aerobe Glykolyse umgestellt. Mit Nährstoffen und Laktat unterstützen die CAFs das Wachstum der Tumorzellen und schaffen so eine energiereiche Umgebung für sie. Dieser Effekt wird auch als „umgekehrter Warburg-Effekt“ bezeichnet [41, 42].

Generell umfasst das TME das Tumorstroma, zu deren wichtigsten Bestandteilen CAFs, Gefäßzellen, infiltrierende Immunzellen wie Makrophagen und Lymphozyten, lösliche Moleküle und die extrazelluläre Matrix (ECM) zählen [43]. Die dynamische Interaktion zwischen dem TME und den Tumorzellen ist dabei sehr wichtig für das Wachstum, das Überleben, die lokale Invasion und die metastatische Ausbreitung von Tumorzellen [44]. Zudem spielt die Interaktion zwischen Immunzellen im TME und dem Tumor eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Arzneimittelresistenzen und der Umgehung des Immunsystems [45]. Aufgrund der Bedeutung des Tumorstromas wird es zunehmend in Tumortherapien adressiert.

Das Stroma bildet einen bedeutenden Anteil der gesamten Tumormasse, auf das solide Tumore mit einem Durchmesser von mehr als 1 bis 2 mm zum Überleben angewiesen sind. Denn die verschiedenen Bestandteile sind maßgeblich an bösartigen Prozessen beteiligt und tragen zu unterschiedlichen Tumorphänotypen bei. Durch die Sekretion verschiedener Wachstumsfaktoren, darunter Platelet-Derived Growth Factor (PDGF), Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), basic Fibroblast Growth Factor (bFGF) oder Transforming Growth Factor (TGF) wird z.B. der zelluläre Schritt der Tumorsuppression und Apoptose abgeschwächt, können sie die replikative Unsterblichkeit von Tumorzellen ermöglichen, angiogene Prozesse auslösen und ihren Energiestoffwechsel ändern. Die Freisetzung dieser Substanzen aus der ECM kann durch Proteasen wie MMPs durch Fibroblasten und Tumorzellen erfolgen.

Unter physiologischen Bedingungen bilden humane dermale Fibroblasten (hDFs) durch Sekretion von Komponenten wie Laminin und Kollagen eine ECM aus Stromazellen. Obwohl Fibroblasten Tumore unterdrücken können, haben Fibroblasten, die hauptsächlich im Tumorstroma vorkommen, paradoxerweise genau die gegenteilige Funktion. Diese Fibroblasten sind für die Umgestaltung der ECM zugunsten des Tumors verantwortlich und leisten tumorunterstützende Arbeiten [46]. Fibroblasten werden durch eine Vielzahl von Faktoren rekrutiert und aktiviert. Durch die Herunterregulierung von E-Cadherin, das es Keratinozyten ermöglicht, das Wachstum von Melanozyten zu kontrollieren, wird zum einen die Rekrutierung von Fibroblasten und zum anderen eine erhöhte Expression von N-Cadherin erzielt [47]. Dadurch haben Melanomzellen die Möglichkeit, mit anderen Zellen, die N-Cadherin exprimieren, wie Fibroblasten und Endothelzellen, zu interagieren [48, 49], was dazu führen könnte, dass Fibroblasten aktiviert werden. Diese aktivierten Fibroblasten, die auch als

CAFs bezeichnet werden, sind beweglicher und invasiver als normale Fibroblasten und ähneln Myofibroblasten.

Außerdem sind Gene für die Adhäsion, Zellproliferation und Zelltod stark reguliert. TGF- β , PDGF und bFGF sind Faktoren, die von Melanomzellen während der Tumorentwicklung exprimiert werden und die Aktivierung der hFAs zu CAFs verursachen können. Verschiedene Faktoren, die die Tumorentwicklung und Metastasierung fördern, werden von CAFs freigesetzt. So erhöhen CAFs die Expression von Proteinen, die für den Umbau der ECM verantwortlich sind. In neunzig Prozent aller CAFs wird das Glykoprotein Fibroblast Activated Protein (FAP) exprimiert, das Kollagen spaltet und somit das Tumorwachstum stimuliert [50, 51]. Neben der Expression der membrangebundenen Peptidase FAP exprimieren CAFs auch lösliche Proteasen vom Typ der MMPs [52], die verschiedene Bestandteile der ECM wie Fibrinogen, Kollagen, Laminin, Elastin und andere Wachstumsfaktoren spalten [53, 54]. Der Tumor hat nach dem Abbau der ECM sofort mehr Raum, um sich auszubreiten [53]. Das Tumorwachstum wird durch die Aktivierung von MMPs und die Spaltung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen weiter gefördert.

Zum Beispiel aktivieren MMPs VEGF und bFGF, die zuvor in der ECM inaktiv waren. Diese Faktoren fördern die Angiogenese, was zu einer besseren Tumorversorgung führt [55]. Die Abbauprodukte von Fibronectin und Kollagen ziehen chemotaktische Zellen des Immunsystems an und fördern deren Wachstum [56]. Dies führt dazu, dass viele tumorassoziierte Makrophagen (TAMs) entstehen. Diese sezernieren MMPs, VEGF, Hepatocyte Growth Factor (HGF) und Interleukin 6 (IL-6) und fördern somit das Wachstum und die Metastasierung von Tumoren [56]. Neben den Proteinen, die für die Transformation der ECM verantwortlich sind, synthetisieren CAFs auch Wachstumsfaktoren und Zytokine. Zu den sezernierten Faktoren gehören TGF- β , HGF, VEGF, PDGF, Stromal Cell Derived Factor 1 (SDF-1), bFGF und Interleukine IL-6, IL-8 und IL-1 β .

Diese Faktoren haben alle eine Stimulation des Tumorwachstums oder des Metastisierungspotenzials des Tumors zur Folge [57, 58, 53]. Sezernierte Wachstumsfaktoren wie HGF und TGF- β beeinflussen die Tumorprogression. CAFs exprimieren TGF- β , ein parakriner Faktor, der das Wachstum und die Metastasierung von fortgeschrittenem Melanom fördert [59, 60]. Die Auswirkungen des HGF auf die Entwicklung von Tumoren sind zahlreich. So führt HGF beispielsweise zur Einleitung der epithelialen mesenchymalen Transition (EMT) in Tumorzellen [61] und zum Schutz von Tumorzellen vor Apoptose [62]. HGF, das von CAFs sezerniert wird, fördert die Proliferation von Melanomzellen durch die Tyrosyl-Phosphorylierung von Proteinen, einschließlich MAPK und extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) [63]. Sezerniertes VEGF ist sowohl für die Vaskularisierung des Tumorgewebes als auch für die erhöhte Durchlässigkeit der Gefäße verantwortlich [64]. Dieser Mechanismus unterstützt das kontinuierliche Wachstum des Tumors durch die

Versorgung des Melanoms mit Nährstoffen durch Angiogenese [65]. Das Chemokin SDF-1 schützt Tumorzellen vor Chemotherapie und fördert gleichzeitig ihre Versorgung mit Nährstoffen und Sauerstoff [66]. Zudem hat es eine chemotaktische Wirkung auf endotheliale Vorläuferzellen, die in das Tumorgewebe einwandern und neue Gefäßformen bilden [67]. Die Sekretion von Interleukinen durch CAFs führt zu einem entzündungsfördernden Milieu, das sich positiv auf das Wachstum des Tumors auswirkt, indem es die Infiltration von Immunzellen und damit die Angiogenese hemmt und die Metastasierung fördert [68, 69, 53].

Daneben stehen die Tumorzellen in engen Kontakt mit den Keratinozyten. Diese regulieren die Proliferation von Melanozyten [70]. Melanomzellen können dieser Kontrolle durch Herunterregulieren von Zelladhäsionsmolekülen, wie z. B. E-Cadherin, Placental (P)-Cadherin, Desmoglein und Connexine entgehen. Gleichzeitig kommt es zu einer Hochregulierung von N-Cadherin, wodurch die Interaktion mit Fibroblasten und Endothelzellen gefördert wird [60]. E-Cadherin spielt eine Rolle als Tumorsuppressor bei der EMT, während der es von den Transkriptionsfaktoren Snail, Slug, Twist und Zeb1/2 unterdrückt wird, was zu einem Verlust der epithelialen Eigenschaften und einer erhöhten Migrations- und Invasionsfähigkeit atypischer Melanozyten führt [71].

Melanozyten und Keratinozyten haben eine schwächere Zell-Zell-Adhäsion als Folge der verminderten Expression von E-Cadherin. Zudem werden einzelne Melanomzellen aus dem Primärtumor leichter freigesetzt. Im Gegensatz dazu erhöht die vermehrte Expression von N-Cadherin die Invasion und Metastasierung atypischer Melanozyten [72]. Zudem führt die Veränderung der Mikroumgebung zur radialen Wachstumsphase des Melanoms. Währenddessen kommt es zur Interaktion von Melanomzellen mit distal differenzierten Notch-Liganden exprimierenden Keratinozyten. Dies initiiert die Invasion durch die Basalmembran der Epidermis und ermöglicht die Migration in die Dermis [73].

1.3. Klassifikation, Diagnosemethoden, Therapie-Strategien und -Entwicklung beim malignen Melanom

Für das spätere Behandlungskonzept und die abgeleitete Prognose ist die Klassifizierung des malignen Melanoms von entscheidender Bedeutung. Die AWMF (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften)-Leitlinie schreibt für die primäre Diagnostik von Hauttumoren eine gründliche Untersuchung des gesamten Integuments, einschließlich aller sichtbaren Schleimhäute, sowie die Palpation der Lymphknoten vor [8] unter Beachtung der ABCDE-Regel:

- A = Assymetrie: ungleichmäßige, asymmetrische, veränderte Form
- B = Begrenzung: ausgefranster, unebener, rauher Rand
- C= Farbe (engl. Colour): unterschiedliche Farbbereiche in einem Mal
- D = Durchmesser; i.d.R. ≥ 5 mm
- E = Erhabenheit; i.d.R. ≥ 1 mm

Bei klinischem Verdacht auf eine Malignität erfolgt eine histopathologische Befundung mit Fokus auf einer Bewertung der Symmetrie des Tumors und der lateralen Begrenzung in Bezug auf das Vorhandensein von Melanomzellen im Randbereich. Eine immunhistologische Untersuchung der melanozytären Differenzierung erfolgt mittels der Standard-Melanom-Marker HMB-45, Melan-A und S100 β [8]. Zunehmend kommen auch PRAME (Preferentially Expressed Antigen in Melanoma) und MiTF (Microphthalmia-associated transcription factor) zum Einsatz [74].

HMB-45 (Human Melanoma Black) [75, 76] bindet an das Antigen gp100 melanozytärer Tumore, sowie fetaler und neonataler Melanozyten, nicht aber an adulte ruhende Melanozyten. Eine Färbung mit HMB-45 ist hilfreich, um Melanome von Nävi abzugrenzen, da in letzteren oft nur oberflächliche Anteile positiv sind.

Melan-A, auch bekannt als MART-1 (Melanoma-associated antigen recognized by T cells 1), befindet sich auf der Oberfläche von Melanozyten und wird dazu verwendet, Zellen mit melanozytärer Differenzierung zu erkennen. Zudem ist Melan-A hilfreich, um melanozytäre Tumore von insbesondere metastasierenden Tumoren zu differenzieren, da dieser empfindlicher ist als HMB-45 [77].

S100 β , ein Kalzium-bindendes Protein, weist für das maligne Melanom eine hohe Sensitivität bei guter Spezifität auf. Dabei korreliert S100 mit der Invasionstiefe und der Tumordicke und kann stadienabhängig erhöht im Serum vorkommen [78].

Die Bewertung der Tumordicke nach Breslow ist ein wichtiger Prognosefaktor, eingeführt 1970 von Alexander Breslow [79]; gemessen wird der als Breslow-Index bekannte Wert von der Oberseite des Statum corneum bis zur am tiefsten liegenden Tumorzelle. Die Einteilung der Tumordicke erfolgt seit 2001 nach der AJCC (American Joint Committee on Cancer)-Klassifikation ($\leq 1,0$ mm; 1,01-2,0 mm; 2,01-4,0 mm; $\geq 4,0$ mm).

Neben der Tumordicke spielen auch Ulzerationen und die Mitoserate bei Primärmelanomen mit einer Tumordicke von $< 1,0$ mm eine entscheidende Rolle.

Abschließend erfolgt eine Einteilung in die international gültige TNM-Klassifikation bzw. in die 4 Stadien der AJCC [80]:

- T = Tumor; Ausdehnung des Tumors
- N = Lymphknoten (engl. nodules); Zahl und Lage der befallenen Lymphknoten
- M = Metastasen; Vorhandensein bzw. Fehlen von Metastasen

- I = Tumordicke ≤ 2 mm, keine Ulzeration des Tumors
keine Metastasen
- II = Tumordicke ≥ 2 mm, mit Ulzeration des Tumors
keine Metastasen
- III = jede Tumordicke
mit Metastasen in nahe gelegene Hautbezirke oder Lymphknoten
- IV = jede Tumordicke
mit Fernmetastasen

Zusätzlich angewandte Untersuchungen, als Alternative oder Zusatz zu den obengenannten Staginguntersuchungen, sind neben einem hochauflösenden Ultraschall zur Dickenabschätzung, die Computertomographie (CT), die Magnetresonanztomographie (MRT), die Skelettszintigraphie oder auch die PET (Positronen-Emissions-Tomographie)/CT-Diagnostik. Zusätzlich kann eine stadienabhängige Ausbreitungsdiagnostik hinsichtlich der S100 β -, LDH (Laktatdehydrogenase)-, MIA (melanoma inhibitory activity) -Level im Serum erfolgen [8].

Es gibt verschiedene Methoden zur Behandlung von malignen Melanomen, wobei verschiedene Faktoren den Behandlungsplan und somit die Heilungschancen beeinflussen. Dazu gehören insbesondere eine frühzeitige Diagnose, das Stadium, das Vorliegen von Satelliten-/Fernmetastasen, das Vorhandensein einer genetischen Veränderung im Tumor, der Allgemeinzustand des Patienten, Begleiterkrankungen und seine medizinische Vorgeschichte. Nach wie vor besonders herausfordernd in der Behandlung des malignen Melanoms ist die rasche Entwicklung von Therapieresistenzen.

Folgende Therapie-Säulen stehen zur Verfügung:

- Operative Entfernung
- Strahlentherapie
- Chemotherapie
- Zielgerichtete Therapie
- Immuntherapie
- Adjuvante Therapie zur Rezidiv-Verhinderung

Die Behandlung von malignen Melanomen hat sich in den letzten sechzig Jahren erheblich verändert. Wurde in den 70er Jahren noch auf Chemotherapie und palliative Bestrahlung gesetzt, wird heutzutage der Behandlungsplan auf eine Sequenzierung der Tumormutation (Next Generation Sequencing, NGS), eine differenzierte und chirurgische Entfernung, sowie

auf gezielte mutationsspezifische und immunonkologische Wirkstoffkombinationen basiert. Dank neuer Medikamente konnte seit den 2000ern das Gesamtüberleben, sowie die Wirksamkeit der Therapie und die Lebensqualität, gerade in späteren Erkrankungsstadien, deutlich gesteigert werden [81, 82].

Bei der ersten modernen Behandlungs-Säule handelt es sich um die zielgerichtete Therapie, welche bei ca. der Hälfte aller Erkrankten zum Einsatz kommen kann [83]. Die Entwicklung spezifischer molekularer Inhibitoren des MAPK-Signalwegs, wie BRAF- und Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase (MEK)-Inhibitoren, hat die Behandlung von BRAF-mutierten Melanomen revolutioniert und basierte auf der Entdeckung spezifischer Treibermutationen in aktivierenden Signalwegen.

Im August 2011 genehmigte die Food and Drug Administration (FDA) die Zulassung des RAF-Inhibitors Vemurafenib (PLX4032), auch bekannt als Zelboraf®, als erstes zielgerichtetes Medikament für die gezielte Behandlung von fortgeschrittenem und metastasiertem Melanom auf dem US-Markt [84]. Ein halbes Jahr später gab die Europäische Kommission die Zulassung auf dem europäischen Markt bekannt. Vemurafenib, ein äußerst spezifischer und potenter BRAF-Inhibitor, bewirkt zunächst einen G0/G1-Zellzyklusstillstand, was zu einer starken Wachstumshemmung und schließlich zum Zelltod führt [85]. Obwohl die Vemurafenib-Monotherapie verschiedene Vorteile im Vergleich zu chemotherapeutischen Methoden für Melanompatienten bietet, gibt es schwerwiegende, unerwünschte Nebenwirkungen. Etwa fünfzig Prozent der Patienten, die auf Vemurafenib ansprachen, entwickelten bereits 6 bis 8 Monate nach Beginn der Therapie eine Tumorprogression aufgrund rasch auftretender Resistenzmechanismen [86]. Darüber hinaus gab es Berichte über paradoxe Auswirkungen auf Keratinozyten des BRAF-Wildtyps [87], die über eine konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalwegs zur Entwicklung neuer Hauterkrankungen beitragen [86, 87].

Vemurafenib wird häufig in Kombination mit MEK-Inhibitoren wie Cobimetinib (Cotellic®) eingenommen, um die Entwicklung von Resistenzen zu verzögern und die paradoxen Nebenwirkungen zu reduzieren [88]. Die Kombination von BRAF- und MEK-Inhibitoren kann im Vergleich zur Einzeltherapie die Remissionsphase verlängern, indem die doppelte Blockierung des MAPK-Signalwegs erreicht wird [89], hilft jedoch nicht, eine primäre oder erworbene Resistenz zu verhindern.

Bei der zweiten neueren Behandlungs-Säule handelt es sich um die Immuntherapie. Die Behandlung mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren (ICI) ist ein moderner Ansatz, der die Aktivierung körpereigener Immunzellen zugrunde liegt und besonders erfolgreich ist. Immun-Checkpoints regulieren neben der T Zell-Aktivierung und ihre Effektorfunktionen normalerweise die Immunantwort, wodurch Autoimmunreaktionen verhindert werden [90, 91]. Tumorzellen können diese Checkpoints nutzen, um dem Immunsystem zu entkommen (Immunevasion). Hier greifen die ICIs an, indem sie die Checkpoints blockieren, wodurch die

Immunantwort der T Zellen gegen den Tumor verstärkt wird. Seit 2011 wurde der monoklonale Antikörper Ipilimumab zur Behandlung von metastasiertem Melanom genehmigt, der den CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4) Checkpoint hemmt [92], was zu einer Aktivierung und Proliferation von T-Zellen führt und eine autoimmune Antwort auslöst. Später wurden die Antikörper Nivolumab und Pembrolizumab eingesetzt, die die PD-1 (Programmed cell death protein 1) – PD-L1 (Programmed cell death ligand 1) Achse beeinträchtigen [93, 94]. Kommt es durch die Bindung der therapeutischen Antikörper zur Blockade von PD-1 wird die Anti-Tumor-Immunität enthemmt und eine autoimmune Antwort gegen den Tumor kann stattfinden.

2022 waren 14 Wirkstoffe für die Behandlung des malignen Melanoms in Verwendung [95, 96] und es wird weiter an neuen Therapieansätzen zur Behandlung des malignen Melanoms geforscht. Fokussiert wird sich hierbei u.a. auf bispezifische Antikörper, niedermolekulare Wirkstoffe, sogenannte small molecules, RNA (Ribonukleinsäure)-/Gen- und Zelltherapeutika, sowie eine therapeutische Impfung mit messengerRNA-Vakzin; sowohl weltweit als auch in Deutschland werden immer mehr klinische Studien mit möglichen neuen Medikamenten gegen das maligne Melanom gestartet [96, 97].

Die Entwicklung von Medikamenten ist ein langwieriger, komplizierter und kostspieliger Prozess, der über ein gesetzlich vorgeschriebenes, mehrstufiges Verfahren läuft und stets mit vielen Zweifeln am tatsächlichen Erfolg des Medikaments verknüpft ist. Die Erfolgsquote neuer Therapien in der Onkologie ist extrem niedrig (~ 5 %) [98]. In der präklinischen Phase werden nach medizinischem Bedarf Angriffspunkte, sogenannte therapeutische Targets, im Krankheitsbild identifiziert, sowie in vivo und in vitro potentielle Wirkstoffkandidaten auf ihre Wirksamkeit und Sicherheit hin geprüft. In der klinischen Phase werden Phase I- (gesunde Probanden), Phase II- (wenige erkrankte Probanden) und schließlich Phase III- (viele erkrankte Probanden) Studien durchgeführt. Nach der Begutachtung durch eine Zulassungsbehörde erfolgen Zulassung, klinische Anwendung und Phase IV-Studien, um mögliche neue Indikationen und seltene Nebenwirkungen zu erkennen. Pro Wirkstoff dauert dieser Prozess im Durchschnitt 13 Jahre [99–101]. In einer 2021 veröffentlichten Studie eines Teams aus Gesundheitsökonominnen und Krebsforschern vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) und vom Deutschen Konsortium für translationale Krebsforschung (DKTK) wird nicht nur der langfristige Trend stetig steigender Ausgaben für Forschung und Entwicklung (F&E) pro neu zugelassenem neuen Wirkstoff bestätigt, sondern auch dass die Kosten für Krebsmedikamente mit einigem Abstand am höchsten ausfielen (802 Mio. - 3,86 Mrd. €) [102].

In den letzten Jahren zeigte sich, dass die in der Präklinik zur Ermittlung der Wirksamkeit von Substanzen verwendeten Modelle ineffizient sind, da 95% der vorher als wirksam beurteilten Substanzen in der späteren Anwendung in der Klinik scheiterten [98]. Dies macht deutlich, wie dringend in der onkologischen Forschung die Entwicklung von auf den Menschen übertragbaren Tumormodellen vorangetrieben werden muss.

1.4. In vitro Melanom-Modelle in der onkologischen Forschung

Um die Melanomagense oder die Wirksamkeit von Medikamenten zu untersuchen, wurden verschiedene In-vitro-Ansätze unter Verwendung unterschiedlicher Melanomzelllinien entwickelt [103]. Die herkömmliche 2D Zellkultur stellt jedoch nur einen reduktionistischen Ansatz dar, bei dem wichtige Merkmale des hochkomplexen TME fehlen, die das Tumorverhalten nachweislich erheblich beeinflussen [104]. Dementsprechend wurden verschiedene Mausmodelle entwickelt, um die Melanomagense, das Tumorwachstum und die Ausbreitung in einem komplexen In-vivo-System zu untersuchen [105].

Dennoch haben Maus-Melanom-Modelle wie gentechnisch veränderte Mäuse und Xenograft- oder syngene Transplantationsmausmodelle verschiedene Tücken. Neben den ethischen Bedenken, die mit Tierversuchen verbunden sind, haben Mausmodelle in den letzten Jahren zunehmend wissenschaftliche und wirtschaftliche Kritik auf sich gezogen. Ein Hauptkritikpunkt ist der geringe Vorhersagewert von Tiermodellen aufgrund ihrer geringen Reproduzierbarkeit und begrenzten Übertragbarkeit auf die menschliche Biologie, die in genetischen und phänotypischen Unterschieden zwischen den Arten oder physischen Unterschieden zwischen den Versuchstieren begründet ist. Außerdem beeinträchtigt die systemische Komplexität lebender Organismen die Fähigkeit, eine bestimmte Beobachtung auf eine mögliche Ursache zurückzuführen, da ein solches präklinisches Modellsystem durch zahlreiche Variablen gekennzeichnet ist [106, 107]. Infolgedessen ist die Erfolgsquote neuer Therapien in der Onkologie extrem niedrig (~5 %) [98].

Die Einführung neuartiger, prädiktiverer Modelle in der präklinischen Entwicklung von Arzneimitteln hat daher das Potenzial, den Zeit- und Kostenaufwand für die Entwicklung neuer Therapien erheblich zu reduzieren und die Zahl der Tierversuche zu verringern. Neben 2D-Kulturen von Melanomzelllinien und Tiermodellen gibt es mehrere Ansätze zur Untersuchung des Melanoms in vitro. 3D Modelle stellen einen guten Kompromiss zwischen dem Fehlen der Mikroumgebung in 2D-Zellkulturen und der Komplexität von Tiermodellen dar [108]. Die ersten Ansätze für eine 3D-Anordnung der Tumorzellen sind Sphäroide. Diese Modelle können aus Tumorzellen allein oder in Kombination mit anderen tumorassoziierten Zellen, z. B. Fibroblasten [109] oder Endothelzellen [110], erzeugt werden. Im Vergleich zur 2D-Zellkultur ermöglichen Sphäroide Zell-Zell-Kontakte sowie die Bildung einer heterogenen Tumormasse durch einen Sauerstoff- und Nährstoffgradienten [111–115]. Sphäroide spiegeln jedoch nur

den Tumor und nicht das gesunde Gewebe wider, in dem sich der Tumor entwickelt. Daher wird die Interaktion zwischen Tumor und Gewebe nicht ausreichend wiedergespiegelt, was die Vorhersagbarkeit bei der Arzneimittelprüfung einschränkt. Außerdem können topisch verabreichte Arzneimittel nicht in Sphäroiden getestet werden.

Hautmodelle ahmen die Anatomie der menschlichen Haut nach und können daher als elegantes Modell dienen, um die Entstehung eines Melanoms und seine Behandlung oder die zelluläre und molekulare Wechselwirkung zwischen dem Tumor und den umgebenden Hautzellen zu untersuchen.

Um allerdings in präklinische Studien eingesetzt werden zu können, müssen die Modelle eine Hochskalierung und Reproduzierbarkeit ermöglichen. Dies unterstreicht den Bedarf an der Entwicklung von neuen in vitro Melanom-Modellen.

Im Jahr 2023 befanden sich 1025 Therapien gegen das maligne Melanom in klinischen Phasen und erforderten eine beträchtliche Anzahl von Tiermodellen für Wirksamkeits- und Sicherheitstests in präklinischen Phasen [96]. Die Entwicklung und Verwendung von humanen 3D in vitro Modellen mit integrierten Melanomen wird daher das von Russel und Burch [116] erstmals beschriebene 3R-Prinzip unterstützen, indem die Zahl der Tierversuche in den präklinischen Phasen der Entwicklung von Anti-Melanom-Therapien reduziert wird.

1.5. Zielsetzung der Dissertation

Obwohl das maligne Melanom eine der seltensten dermatologischen Malignitäten darstellt und weniger als 5 % aller Hautkrebskrankungen ausmacht, ist es gleichzeitig auch die tödlichste und für bis zu 90 % aller hautkrebsbedingten Todesfälle weltweit verantwortlich. Dies ist auf die rasche Entwicklung von Therapieresistenzen und vor allem auf die Neigung zu einer frühen Metastasierung zurückzuführen. Die hohe Aggressivität des malignen Melanoms bei gleichzeitig rasch steigenden Inzidenzen weltweit unterstreicht die Notwendigkeit einer frühzeitigen Diagnose und der Entwicklung neuer therapeutischer Strategien. Allerdings scheitern 95% [98] der vorher als wirksam beurteilten Substanzen in der späteren Anwendung in der Klinik, da die in der Präklinik zur Ermittlung der Wirksamkeit von Substanzen verwendeten Modelle ineffizient sind. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Entwicklung von auf den Menschen übertragbaren Tumormodellen in der onkologischen Forschung. Die Entwicklung und Verwendung von humanen 3D in vitro Modellen mit integrierten Melanomen kann Limitationen bisheriger Modelle überwinden und ein Testen von Therapien präklinisch nahe an der in vivo Situation erlauben. Dadurch kann eine fokussierte Vorauswahl von Wirksubstanzen erfolgen und gleichzeitig die beträchtliche Zahl der Tierversuche in den präklinischen Phasen der Entwicklung von Anti-Melanom-Therapien reduziert werden.

Schwerpunkt der Dissertation ist die Entwicklung humaner organotypischer 3D Modelle des malignen Melanoms als in vitro Testsystem für die Bewertung der Wirksamkeit von anti-Tumor Therapeutika.

Hierzu sollen unterschiedlich komplexe Melanom-Modelle, von einfacheren epidermalen bis hin zu komplexeren epidermal-dermalen Modellen etabliert und charakterisiert werden, die unterschiedliche Melanom-Subtypen und potentielle Zielstrukturen potentieller Wirksubstanzen widerspiegeln und unterschiedliche Tumorstadien reflektieren. Dies soll es ermöglichen, jegliche wissenschaftliche Fragestellung und spätere Anwendungsgebiete abdecken zu können. Zudem sollen technische Analyse-Verfahren zur nicht-invasiven Detektion der Tumor-Formierung, des Therapie-Verlaufes sowie der Evaluierung des Tumor-Metabolismus implementiert werden, die – anders als bisherige Standardmethoden - ein zerstörungsfreies Monitoring maligner Melanome im in vitro Modell erlauben. Des Weiteren sollen anhand der Gabe von sich in der Klinik im Einsatz befindlicher BRAF-/MEK-Inhibitoren, sowie einem neuen Anti-Tumor Therapie-Ansatz mit Peptid RDP22 die etablierten Modelle auf ihre Eignung hin als präklinische Testsysteme zur Wirksamkeits-Testung von anti-Tumor Therapeutika evaluiert werden. Zuletzt soll die Komplexität des organotypischen Modells des Malignen Melanoms durch Integration und Untersuchung des Einflusses von Komponenten der Tumormikroumgebung gesteigert werden.

2. Material

Die in dieser Studie verwendeten Chemikalien, Medien- und Pufferzusammensetzungen, Antikörper, Laborgeräte, Materialien, sowie Software sind in den folgenden Tabellen aufgeführt.

2.1. Chemikalienliste

Tabelle 1: Liste verwendeter Chemikalien inklusive Herstellerangabe.

Chemikalie	Hersteller
[3,4-difluoro-2-[(2-fluoro-4-iodophenyl)amino]phenyl][3-hydroxy-3-(2S)-2-piperidinyl-1-azetidiny]-Methanon (Cobimetinib)	Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)
0.5% Trypsin/EDTA (10x)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
2-Propanol ≥99.8%	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), ≥99.5%	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Accutase® solution	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Aceton	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Activator Bio (System reagent for CEDEX Bio Analyzer)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)
Albumin aus Rinderserum (BSA, Bovine Serum Albumine)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Antikörperverdünnungslösung	DCS Innovative Diagnostik-Systeme GmbH & Co. KG (Hamburg, D)
Calciumchlorid Dihydrat ≥99% (CaCl ₂)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
CD3 MicroBeads, human	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, D)
CellGenix® GMP DC Medium	CellGenix (Freiburg, D)
Chondroitinsulfat	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Descosept AF	Dr. Schumacher GmbH (Malsfeld, D)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Dispase®	Life Technologies Corporation (Grand Island, NY, USA)

DMEM (1x) + GlutaMAX™-I Dulbecco's Modified Eagle Medium (4.5 g/L D-Glucose)	Life Technologies Limited (Paisley, UK)
DMEM/F12	Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, MA, USA)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Modified, without MgCl ₂ and CaCl ₂ , liquid, sterile-filtered) (PBS ⁻)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (with MgCl ₂ and CaCl ₂ , liquid, sterile-filtered) (PBS ⁺)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation	Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, MA, USA)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	AppliChem GmbH (Darmstadt, D)
Entellan®	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Eosin 1%, wässrig	Morphisto GmbH (Frankfurt am Main, D)
EpiLife®, Cascade Biologics™	Life Technologies Corporation (Grand Island, NY, USA)
Essigsäure, 100%	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Ethanol ≥99.8%, absolut	Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, D)
Fetales Kälberserum (FCS)	Bio & Sell GmbH (Feucht, D)
Ficoll®-Paque Premium	Merck KGaA (Darmstadt, D)
Fluoromount-G™, mit DAPI	Life Technologies Corporation (Grand Island, NY, USA)
Glucose Bio, test kit for Cedex Bio Analyzer	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)
H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Hämatoxylin nach Meyer	Morphisto GmbH (Frankfurt am Main, D)
Human Keratinocyte Growth Supplement 100x (HKGS), Cascade Biologics™	Life Technologies Corporation (Grand Island, NY, USA)
Human Keratinocyte Growth Factor (KGF)	PeproTech GmbH (Hamburg, D)
IL-2, Human Recombinant	PeproTech GmbH (Hamburg, D)
ISE Deproteinizer Bio (System reagent for CEDEX Bio Analyzer)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)
Kollagenase	SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg, D)
Kollagen type I Lösung (10 mg/mL)	TERM, Würzburg (D)
Lactate Bio, test kit for Cedex Bio Analyzer	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)
L-Ascorbic acid 2-phosphate (AA ₂ P)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
LDH Bio, test kit for Cedex Bio Analyzer	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)

Methanol ≥99%	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
MIA ELISA Kit Human	Abcam (Cambridge, UK)
N-[3-[[5-(4-chlorophenyl)-1H-pyrrolo[2,3-b]pyridin-3-yl]carbonyl]-2,4-difluorophenyl]-1-Propanesulfonamid (Vemurafenib, PLX4032)	Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, USA)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Normal donkey serum	Merck KGaA (Darmstadt, D)
PBS-Pulver ohne Calcium und Magnesium	Biochrom GmbH (Berlin, D)
Penicillin/Streptomycin, 100x	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
ROTI®Histofix, 4% Formaldehyd	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
ROTI®Plast (Paraffin)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX™	Life Technologies Limited (Paisley, UK)
SUPERVision 2 2-Schritt HRP-Polymer-Kit mit DAB (Diaminobenzidine staining)	DCS Innovative Diagnostik-Systeme GmbH & Co. KG (Hamburg, D)
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)
Triton™ X-100 solution	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Trypanblau 0,4%	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
TUNEL Assay Kit – HRP-DAB (TUNEL staining)	Abcam (Cambridge, UK)
Tween® 20	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Versene 1:5000 (1x)	Life Technologies Limited (Paisley, UK)
Xylol >98%	Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, D)

2.2. Puffer und Lösungen

Tabelle 2: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen für Zellkultur und Histologie.

Puffer/Lösung	Konzentration	Zusammensetzung
0.2% Triton™ X-100 Lösung	0.2% (v/v)	Triton™ X-100 solution (100%) in PBS ⁻ (1x)
1% Triton™ X-100 Lösung	1% (v/v)	Triton™ X-100 solution (100%) in PBS ⁻ (1x)
10x PBS ⁻	95.5 g/L	PBS Pulver (ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺) in dH ₂ O
10x EDTA Stock-Lösung (pH 8)	3.72 g/L	EDTA Ethylendiamintetraacetat in dH ₂ O
1x PBS ⁻ /EDTA	0.1% (v/v)	EDTA (500 mM) in PBS ⁻ (1x)

1x Trypsin/EDTA	10% (v/v)	0.5 % Trypsin-EDTA (10x) in PBS ⁻ /EDTA
3% H ₂ O ₂ -Lösung	10% (v/v)	H ₂ O ₂ (30%) in dH ₂ O
5% SDS	50 g/L	SDS in PBS ⁺
Antigen retrieval buffer	10% (v/v)	10x EDTA Stock-Lösung (pH 8) in dH ₂ O
Block-Lösung	5% (v/v)	Normal donkey serum in Antikörper-Verdünnungs-Lösung
CaCl ₂ Stock-Lösung (300 mM)	44 g/L	CaCl ₂ in dH ₂ O, steril filtriert
Citratpuffer 10x	42 mg/mL 17,6 mg/mL	Citronensäure-Monohydrat Natriumhydrogencarbonat in dH ₂ O
Cobimetinib Stock-Lösung (1 mM)	531.35 g/L	Cobimetinib in DMSO
Chondroitinsulfat	25 mg 5 mL	25 mg Chondroitin-6-sulfate In PBS ⁺
Dispase (2 U/mL)	1071 g/L	Dispase in PBS ⁻ (1x)
FACS Puffer	1% (v/v) 0.4% (v/v)	FCS EDTA (2 mM) in PBS ⁻ (1x)
Gelneutralisationlösung (GNL)	5.625 g 12.5 mg 10 mL 232.5 mL 7.5 mL	HEPES Chondroitinsulfat PBS ⁻ DMEM (2x) FCS pH 8,5
Kollagenase (500U/mL)	263g/mL	Kollagenase lyophilisiert in DMEM high glucose, steril filtriert
KGF-Lösung	10 µg/mL	KGF in EpiLife
L-Ascorbic acid 2-phosphate Stock-Lösung (250 mM)	73 mg/mL	L-Ascorbic acid 2-phosphate in E1-Medium, steril filtriert
MACS-Puffer	0.5% (v/v) 0.4 % (v/v)	BSA EDTA (2 mM) in PBS ⁻ (1x) pH 7,2 steril filtriert
Methocel-Medium	12 g/L	Methylcellulose in RPMI
MTT Gebrauchslösung (1 mg/mL)	20% (v/v)	MTT stock solution (5 mg/mL) in PBS ⁺
MTT Stock-Lösung (5 mg/mL)	5 mg/mL	MTT Pulver in dH ₂ O, steril filtriert
Tris/EDTA Puffer	100 mM 10 mM	Tris EDTA

		in dH ₂ O pH 9,0
Vemurafenib Stock-Lösung (10 mM)	4.9 mg/mL	Vemurafenib in DMSO
Waschpuffer	10% (v/v) 0.05% (v/v)	PBS ⁻ (10x) Tween [®] 20 in dH ₂ O

2.3. Zellkulturmedien und Supplemente

Tabelle 3: Zusammensetzung verwendeter Medien und Supplemente in der Zellkultur.

Medium	Konzentration	Zusammensetzung
2x DMEM	88 mM 26.6 g/L	Natriumbicarbonat DMEM Pulver in ultrapurem Wasser, steril filtriert
CellGenix [®] -Medium	1% (v/v)	Penicillin/Streptomycin in CellGenix [®] GMP DC Medium
DMEM-Medium	1% (v/v) 10% (v/v)	Penicillin/Streptomycin FCS in DMEM (1x) + GlutaMAX [™] -I Dulbecco's Modified Eagle Medium (4.5 g/L D-Glucose)
DMEM/F12	1% (v/v) 10% (v/v)	Penicillin/Streptomycin FCS in DMEM/F12
E1-Medium (EpiLife [®] 2D Medium)	1% (v/v) 1% (v/v)	Penicillin/Streptomycin HKGS in EpiLife [®] , Cascade Biologics [™]
E2-Medium (EpiLife [®] 3D Submerskultur-Medium)	1% (v/v) 1% (v/v) 1.44 mM	Penicillin/Streptomycin HKGS CaCl ₂ in EpiLife [®] , Cascade Biologics [™]
E3-Medium (EpiLife [®] 3D Airlift-Medium)	1% (v/v) 1% (v/v) 1.44 mM 10 ng/mL 73 µg/mL	Penicillin/Streptomycin HKGS CaCl ₂ KGF AA2P in EpiLife [®] , Cascade Biologics [™]
E10-Medium (EpiLife [®] 3D Vollhaut-Medium)	10% (v/v)	Fibrolife [®] in E3-Medium
Fibrolife [®]	5 ng/mL 5 µg/mL 50 µg/mL 7.5 mM	recombinantes humanes bFGF recombinantes humanes Insulin Ascorbinsäure L-Glutamin

	1 µg/mL 2 % (v/v)	Hydrocortison Hemisuccinat FCS in FibroLife® Basal-Medium
RPMI-Medium	1% (v/v) 10% (v/v)	Penicillin/Streptomycin FCS in RPMI Medium 1640 (1x) + GlutaMAX™-I

2.4. Antikörper

Tabelle 4: Aufzählung der verwendeten Antikörper.

Antikörper/Klon	Spezies	Verdünnung	Hersteller	Artikelnummer
<i>Primäre Antikörper</i>				
αSMA conjugate Alexa-Fluor-488 (1A4)	Maus	1:100	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	F3777
CD-3 (F7.2.38)	Maus	1:25	Agilent Dako, Santa Clara (US)	M7254
Cleaved Caspase-3 [Asp175] (polyclonal)	Kaninchen	1:400	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)	#9664
Collagen IV (COL-94)	Maus	1:500	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	C1926
Cytokeratin 14 (polyclonal)	Maus	1:100	Agilent Dako, Santa Clara (US)	M7002
Cytokeratin 14 (polyclonal)	Kaninchen	1:1000	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)	HPA023040
DLL-1 (polyclonal)	Kaninchen	1:500	Abcam (Cambridge, UK)	ab10554
E-Cadherin (36)	Maus	1:100	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)	610181
FAP (EPR20021)	Kaninchen	1:100	Abcam (Cambridge, UK)	ab207178
Human Melan-A (A103)	Maus	1:50	Dako North America, Inc. (Carpinteria, CA, USA)	M7196
Melanosome (HMB-45)	Maus	1:50	Agilent Dako, Santa Clara (US)	M0634292
MIA (C-10)	Maus	1:100	Santa Cruz Biotechnology, inc. (Dallas, USA)	sc-377375
Jagged-1 (D4Y1R)	Kaninchen	1:200	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, MA, USA)	70109T

KI67 (SP6)	Kaninchen	1:100	Abcam (Cambridge, UK)	ab16667
MITF (C5)	Maus	1:500	Abcam (Cambridge, UK)	ab80651
N-Cadherin (EPR1792Y)	Kaninchen	1:250	Abcam (Cambridge, UK)	ab51034
S100 β (EP1576Y)	Maus	1:500	Abcam (Cambridge, UK)	ab52642
Vimentin (EPR3776)	Kaninchen	1:2000	Abcam (Cambridge, UK)	ab92547

Sekundäre Antikörper

Alexa Fluor [®] 555 Donkey Anti-Mouse IgG	Esel	1:400	Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, MA, USA)	A-31570
Alexa Fluor [®] 555 Donkey Anti-Rabbit IgG	Esel	1:400	Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, MA, USA)	A-31572
Alexa Fluor [®] 647 Donkey Anti-Mouse IgG	Esel	1:400	Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, MA, USA)	A-31571
Alexa Fluor [®] 647 Donkey Anti-Rabbit IgG	Esel	1:400	Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, MA, USA)	A-31573

FACS-Antikörper

CD25-PE, anti-human (BC96)			BioLegend (San Diego, USA)	302606
CD69-APC, anti-human (FN50)			BioLegend (San Diego, USA)	310909
Isotyp-Kontrolle, anti-mouse IgG1; k PE			BioLegend (San Diego, USA)	400111
Isotyp-Kontrolle, anti-mouse IgG1, k APC			BioLegend (San Diego, USA)	400119

2.5. Laborgeräte

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Laborgeräte und deren Hersteller.

Laborgerät	Hersteller
Absaugvorrichtung Integra Biosciences™ Aspiraton device Vacusafe™ + VACUBOY Handoperator	Integra Biosciences GmbH (Biebertal, D)
Abzug Secuflow	WALDNER Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG (Wangen, D)
Analysewaage	Kern, Balingen-Frommern (D)
Autoklav DX-Bench-top	Systec GmbH (Wettenberg, D)
Autoklav Technoklav	Biomedis Laborservice GmbH (Gießen, D)
Autoklav Varioklav	HP Medizintechnik GmbH (Oberschleißheim, D)
BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
CEDEX Bio Analyzer	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)
Dampfgarer	Clatronic International GmbH (Kempen, D)
Digitalkamera	Canon, Krefeld (D)
Einbettautomat Microm STP120	Thermo Fisher Scientific, Dreieich (D)
Eismaschine AF-80	Scotsman Ice Systems (Milano, I)
Flüssigstickstofftank CryoExtra™20	Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, MA, USA)
Fluoreszenz Mikroskop Biorevo BZ-9000	Keyence Deutschland GmbH (Neu-Isenburg, D)
Gefrierbehälter Mr. Frosty	VWR, Darmstadt (D)
Gefrierschrank MediLine (-20 °C)	Liebherr-International Deutschland GmbH (Biberach an der Riß, D)
Gefrierschrank VIP Eco (-80 °C)	PHC Holdings Corporation (Tokio, JP)
HERAtherm™	Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, MA, USA)
Imaging System EVOS™ M5000	Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, MA, USA)
Inkubator BBD 6220	Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, MA, USA)
Impedanzmessgerät: LCR HiTESTER 3522-50	HIOKI E.E. Corporation (Nagano JPN)
Kassettendrucker VSP 6001	Vogel GmbH & Co. KG (Fernwald, D)
Kompressionsreaktor	TERM (Würzburg, D)
Kühlplatte HistoCore Arcadia C	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar, D)
Kühlraum (4°)	Viessmann (Allendorf, D)

MACS [®] MultiStand with MS and LS column adapters	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, D)
Magnetrührer IKA [®] RH basic 2	IKA [®] -Werke GmbH & Co. KG (Staufen, D)
MediTOM (Prototyp, Eigenentwicklung)	Fraunhofer ISC, CeDeD, (Bronnbach, D)
Mikroplatten Reader: Tecan Sunrise	Tecan (Crailsheim, D)
Mikrotom HistoCore Autocut AS	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar, D)
Mikroskop Leica DMI1	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar, D)
Multi-Channel-Pipette Plus	Eppendorf (Hamburg, D)
Neubauer Zählkammer	Hartenstein (Würzburg, D)
Paraffin Einbettmaschine HistoCore Arcadia H	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar, D)
pH Meter FE20	Mettler Toledo GmbH (Gießen, D)
Photometer Infinite [®] M Nano	Tecan Group AG (Männedorf, CH)
Pipetten: 0.5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 100 – 1000 µL	Eppendorf (Hamburg, D)
Pipettierhilfe: Pipet Boy	Brand, Wertheim (D)
Schaukelplattformschüttler KM-2 AKKU	Edmund Bühler GmbH (Bodelshausen, D)
Sicherheitswerkbank Laminar Flow Hood HERASafe KS 15	Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, MA, USA)
Spülmaschine	Miele (Gütersloh, D)
Timer	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Trockenschrank	Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach, D)
Gewebe-Wasserbad Type 1052	Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, D)
Wasserbad	Memmert GmbH + Co. KG (Schwabach, D)
XCelligence [®]	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
Vortex-Genie [®] 2	Scientific Industries, Inc. (Bohemia, NY, USA)
XCelligence [®]	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, D)
Zentrifuge Heraeus Megafuge 40R	Thermo Fisher Scientific GmbH (Waltham, MA, USA)

2.6. Laborausstattung

Tabelle 6: Verwendete Ausstattung und deren Hersteller.

Laborausstattung	Hersteller
Bechergläser	Schott (Mainz, D)
DRS® Dermapen 10mm with 32 needles	DRS Edeuo (Berlin, DE)
Edelstahlgussformen zum Einbetten von Gewebe	Labonord (Mönchenglattbach, D)
Fettstift	Dako Deutschland GmbH (Hamburg, 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	Schott (Mainz, D)
Objektträgerhalter: Glass, Stainless Steel	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)

2.7. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 7: Übersicht über verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Aluminiumfolie	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Biopsie-Schwämmchen	VWR International GmbH (Darmstadt, D)
Cedex Küvetten	Roche Diagnostics (Mannheim, D)
Combitips Plus: 0,5 mL, 1 mL, 2,5 mL, 5 mL, 25mL	Eppendorf (Hamburg, D)

Dreiwegehahn	B. Braun, Melsungen (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)
FACS-Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht, D)
Filterpapier	Labonord (Mönchengladbach, D)
Glasplättchen (Ø12 mm)	Hartenstein (Würzburg, D)
Handschuhe:	
Latex	Cardinal Health (Kleve, D)
Nitrile	Kimberly-Clark (Koblenz, D)
Kryoröhrchen: 1.8 mL	Nunc (Wiesbaden, D)
Luer-Ventil (nadelfrei, abwischbar)	Nordson Medical, Loveland (USA)
MACS [®] column, sizes MS & LS	Miltenyi Biotec GmbH (Bergisch Gladbach, D)
Mikrotomklingen	pfm Medical (Köln, D)
Multiwell-Platten: 6 well, 12 well, 24 well, 96 well	TPP (Trasadingen, D)
Multiwell-Platte 96 well U-Boden	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Objekträger:	
unbeschichtet (26 x76 x1 mm)	Menzel (Braunschweig, D)
Polysine [™] (25 x75 x1 mm)	Langenbrinck (Emmendingen, D)
Parafilm [®]	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, D)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim, D)
Pipettenspitzen: 0,5 – 10 µL, 10 – 100 µL, 100 – 1000 µL	Eppendorf (Hamburg, D)
Platte E-plates View 96 and inserts for XCelligence [®]	ACEA Biosciences Inc. (San Diego, USA)
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)
Steriles Plastik-Reservoir	Kisker Biotech (Steinfurt, D)
Sterilfilter für Spritzen	Sartorius Stedium Biotech (Göttingen, D)
Wägeschale	Hartenstein (Würzburg, D)
Zellkulturflaschen: 25 cm ² , 75 cm ² , 150 cm ²	TPP (Trasadingen, D)
Zellkulturflaschen: 175 cm ²	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Zellkulturinserts Cell culture inserts BIO-CERT [®] , translucent inserts for 24 well plate, pore diameter 0.4 µm	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim, D)

Zellkulturinserts ThinCert™, translucent inserts for 12 well plate, pore diameter 0.4 µm	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Zellkulturinserts Corning Costar Snapwell inserts 0.4 µm for 6 well plates	Corning (New York, USA)
Zellkulturplatte Cell culture plates 12 well Cellstar®	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Zellkulturplatte ThinCert™ deep 12 well plate with lid	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Zellkulturplatte Corning Costar Snapwell plate 6 well	Corning (New York, USA)
Zellkulturschalen	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)
Zentrifugenröhrchen: 15 mL, 50 mL	Greiner Bio-One (Frickenhausen, D)

2.8. Software

Tabelle 8: Name, Version und Entwickler der verwendeten Software.

Software (Name und Version)	Entwickler
BD CellQuest Pro™ Flow Cytometry Acquisition	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
BZ-9000 II Analyzer	Keyence Deutschland GmbH (Neu-Isenburg, D)
BZ-9000 II Viewer	Keyence Deutschland GmbH (Neu-Isenburg, D)
Citavi 6	Swiss Academic Software GmbH (Wädenswil, CH)
FlowJo 10.7.2	BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA)
GraphPad PRISM 6.0.7.0	GraphPad Software (San Diego, CA, USA)
ImageJ-win32	National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA)
Kompressions-Software	TERM (Würzburg, D)
Leica Application Suit LAS EZ	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH (Wetzlar, D)
MediTOM	Fraunhofer, CeDeD (Würzburg, D)
Microsoft Office Excel 2021	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Microsoft PowerPoint 2021	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Microsoft Word 2021	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Tecan-i-control™ 1.7	Tecan (Crailsheim, D)
XCelligence® RTCA Software Pro	ACEA Biosciences Inc. (San Diego, USA)

3. Methoden

3.1. Zellkultur Methoden

Die Verwendung einer laminaren Luftstrom-Sicherheitswerkbank der Klasse II garantierte, dass die Zellkultur unter sterilen Bedingungen durchgeführt wurde. Durch das Tragen von Handschuhen wurde das Risiko von Verunreinigungen minimiert. Alle für die Zellkultur verwendeten Materialien waren steril: wiederverwendbare Materialien wurden autoklaviert, während selbst hergestellte Puffer, Medien oder Lösungen vor der Verwendung steril gefiltert oder autoklaviert wurden. Für die Zellkultur wurden alle Lösungen auf 37 °C vorgewärmt. Zellen wurden täglich mikroskopisch auf Zellwachstum, Dichte und charakteristische Zellmorphologie überwacht. Zellen sowie Gewebe-Äquivalente wurden bei 95 % relativer Luftfeuchtigkeit, 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert. Der Mediumwechsel wurde dreimal wöchentlich durchgeführt und das Zellkulturmedium wurde mit 100 U/mL Penicillin und 0,1 mg/mL Streptomycin (P/S) versetzt. Sofern nicht anders angegeben, wurden Zentrifugationsschritte bei 300x g für 5 Minuten (Min) bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt.

3.1.1. Isolation von primären humanen Hautzellen und Herstellung von Trägerstruktur-Materialien

3.1.1.1. Isolation von Zellen für die Gewebe-Äquivalente

Primäre humane epidermale Keratinozyten (heKs) und humane dermale Fibroblasten (hdFs) wurden aus Vorhaut-Biopsaten von juvenilen Spendern gemäß einem zuvor veröffentlichten Protokoll isoliert [117, 118]. Dies erfolgte nach Zustimmung der Ethikkommission der Universität Würzburg (Zulassungsnummer 182/10 und 280/18) und wurde nach der Erklärung von Helsinki durchgeführt. Proben wurden nur nach der informierten schriftlichen Zustimmung des/der Erziehungsberechtigten entnommen. *Tabelle 9* gibt einen Überblick über die Donoren, die für die Isolation von primären Zellen in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 9: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Donoren für die Isolation humaner epidermaler Keratinozyten (heKs) und humaner dermaler Fibroblasten (hdFs).

Zellart	Donor	Alter des Patienten	Tag der Operation
heK	14.016	unbekannt	10.09.2014
heK	15.017	3 Jahre	05.08.2015
heK, hdF	17.013	adult	08.05.2017
heK, hdF	18.001	1 Jahr, 8 Monate	16.01.2018
heK, hdF	19.013	1 Jahr	30.07.2019
heK, hdF	19.016	11 Jahre	29.08.2019

Vor der Isolierung wurden 5 mL der Biopsietransportlösung (PBS⁺ mit 1 % Gentamycin) in eine T25 Zellkulturflasche überführt und über Nacht (ü.N) in einem Inkubator für Sterilitätstests gelagert. Falls die Sterilitätskontrolle kontaminiert war, wurde die Biopsie am nächsten Tag verworfen. Andernfalls wurde die Biopsie zum Waschen in eine sterile Petrischale mit PBS⁺ überführt. Fett- und Restbindegewebe aus der Unterhaut wurde mit einem sterilen Skalpell entfernt, bevor die Biopsie in 2–3 mm breite Gewebestreifen geschnitten wurde. Die Gewebestreifen wurden mit der Epidermis nach oben in eine Petrischale mit 10 mL Dispase-Lösung (2 U/mL) gelegt und 16 bis 18 Stunden (h) bei 4 °C inkubiert, um die Basalmembran zu verdauen. Nach der Inkubation wurde die Epidermis mit sterilen Pinzetten von der Dermis abgezogen und beide Teile wurden in separate mit PBS⁺ gefüllte Petrischalen gelegt.

Isolation der heKs

Zur Isolierung der heK wurden die epidermalen Gewebestreifen in PBS⁻ gespült, bevor sie in 3x3 mm große einheitliche Quadrate geschnitten wurden. Die Epidermisstücke wurden in ein Zentrifugenröhrchen mit 10 mL 0,05 %iger Trypsin/EDTA-Lösung überführt und 5 Min bei 37 °C in einem Wasserbad inkubiert. Die enzymatische Verdauung von Zellkontakten durch Trypsin/EDTA wurde durch regelmäßiges Schwenken und Vortexen mechanisch unterstützt. Nach der Inkubation wurde die Trypsin/EDTA-Reaktion durch Zugabe von 10 % FCS gestoppt und das Herauslösen der Zellen aus dem Gewebeverband wurde durch wiederholte Resuspension mit einer 10 mL Pipette erzielt. Nachdem die Zellsuspension durch ein Zellsieb mit 100 µm Porendurchmesser in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt wurde, wurden die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und in E1-Medium resuspendiert. Die Anzahl der isolierten Zellen wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zellzählkammer bestimmt (s. 3.1.2.3) bevor heK in T175 Zellkulturflaschen mit einer Konzentration von 3×10^3 Zellen/cm² und einem

Gesamtvolumen von 20 mL E1-Medium für die Zellexpansion ausgesät wurden. Bei Erreichen einer Zellkonfluenz von 70–80 % wurden isolierte heK entweder subkultiviert (s. 3.1.2.2) oder für die Langzeitlagerung kryokonserviert (s. 3.1.2.4).

Isolation der hdFs

Die hdFs wurden aus dem dermalen Teil der Biopsate isoliert. Dazu wurden die Gewebestreifen in kleine Stücke geschnitten, bis sie eine breiige Konsistenz hatten. Die Stücke wurden in einem 50 mL-Röhrchen in Kollagenase (500 U/mL) überführt. Dieses wurde für 45 Min in das 37 °C warme Wasserbad gelegt und alle 10 Min gevortext. Die verdauten Dermisstücke wurden durch Zentrifugation pelletiert, in DMEM-Medium resuspendiert und anschließend in einer T75 Zellkulturflasche ausgesät, welche zuvor mit DMEM-Medium befeuchtet worden war. Am nächsten Tag wurden 6 mL DMEM-Medium vorsichtig in die Flasche dazu gegeben, um ein Aufschwimmen von Gewebestücken zu verhindern. In den darauffolgenden Tagen wuchsen die hdFs aus den Dermisstücken heraus. Bei Erreichen einer Zellkonfluenz von 70–80 % wurden isolierte hdFs entweder subkultiviert (s. 3.1.2.2) oder für die Langzeitlagerung kryokonserviert (s. 3.1.2.4).

3.1.1.2. Isolation von Kollagen Typ I

Kollagen Typ I (Kol I) wurde aus Rattenschwänzen von 8-10 Wochen alten Ratten isoliert. Nach dem Auftauen wurden diese in PBS⁻ gewaschen und zur Sterilisation in 70% Ethanol für 2 Min inkubiert. Nach dem Entfernen der Haut, wurden die Schwänze in Stücke von 2 bis 3 cm Länge gebrochen zur Extraktion der Kollagenfasern. Diese wurden in einem nächsten Schritt von den restlichen Teilen des Schwanzes abgeschnitten. Fettgewebe, Blutgefäße und andere Verunreinigungen wurden folgend aussortiert. Nach wiederholtem Waschen mit PBS⁻ werden die Kollagen-Fasern in kleinere Stücke geschnitten, bei 60 °C getrocknet und das erhaltene Trockengewicht bestimmt. Daraufhin wurden die getrockneten Fasern in eine sterile Spinnflasche zusammen mit 100 mL 0,1 % Essigsäure (pH 4) pro Gramm getrockneter Fasern überführt und 7 Tage (d) bei 4 °C gerührt. Nach erfolgreicher Auflösung des Kollagens, wurde die Lösung in große Zentrifugenflaschen überführt und für 1 h bei 14000× g zentrifugiert. Abschließend wurde die Kollagenlösung auf 50 mL aliquotiert und bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

3.1.1.3. Elektrospinnen von vollsynthetischen hochporösen 3D-Polymerfasergerüsten

Die vollsynthetischen hochporösen Polyamid 6 (PA6)-Fasern wurden am Fraunhofer ISC von Dr. Tobias Weigel mittels Elektrospinnen gemäß einem kürzlich veröffentlichten Protokoll [119] hergestellt und freundlicherweise für diese Studie zur Verfügung gestellt.

3.1.2. Zweidimensionale Zellkultur

3.1.2.1. Kultivierung von humanen Melanom- und Krebs-assoziierten Fibroblasten-Zelllinien

MUG-Mel2 und MUGCCarly1 wurden freundlicherweise von Assoz. Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr. Beate Rinner, Medizinische Universität Graz (Graz, Österreich), zur Verfügung gestellt; A11 wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Nicolas Hayward des Queensland Institut for Medical Research (Brisbane, Australien) zur Verfügung gestellt. Die Melanom-Zelllinien SK-MEL-28 und MeWo wurden von American Type Culture Collection (ATCC) käuflich erworben und in RPMI-Medium kultiviert; ebenso die A11; MUGCCarly1 dagegen in DMEM/F12 ohne Phenolrot. Bei Erreichen einer Zellkonfluenz von 70–80 % wurden die Zellen entweder subkultiviert (s. 3.1.2.2) oder für die Langzeitlagerung kryokonserviert (s. 3.1.2.4). *Tabelle 10* gibt einen Überblick über die verwendeten Zelllinien, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 10: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und ihrer Charakteristika.

Zelllinie	Zellart	Zugrundeliegende Treibermutation	Ursprung
A11	Malignes Melanom	BRAF ^{WT} , NRAS ^{WT}	Human, unbekannt
MeWo	Malignes Melanom	CDKN2A	Human, Lymphknotenmetastase (m, 78 Jahre)
MUG-Mel2	Malignes Melanom	NRAS ^{Q61R}	Human, Kutane Metastase (m, 48 Jahre)
SK-MEL-28	Malignes Melanom	BRAF ^{V600E}	Human, Haut (m, 51 Jahre)
MUGCCarly1	Cancer-associated fibroblasts (CAFs) Krebs-assoziierte Fibroblasten	-	Human, Gallenblase

3.1.2.2. Passagieren von Zellen

Passagieren mit Trypsin (Melanomzellen, MUGCCarly1, hdf)

Zur Subkultivierung erfolgt nach dem Absaugen des Mediums und dem Spülen mit PBS⁻/EDTA-Lösung eine 5-7-minütige Inkubation mit 0.05 % Trypsin/EDTA (T75 4,5 mL, T175 9 mL) im Brutschrank. Nach vollständiger Ablösung der Zellen, welches unter dem Mikroskop beobachtet wurde, wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 10 % FCS gestoppt, die abgelösten Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellkulturflasche abermals mit PBS⁻/EDTA-Lösung gespült. Nach der Zentrifugation für 5 Min bei 300x g wird das Zellpellet in einem entsprechend definierten Volumen entsprechendem Mediums resuspendiert. Anschließend erfolgt eine Zellzählung (s. 3.1.2.3) um eine definierte Aussaat der Zellen vornehmen zu können; die Anzahl der Passagen (P) erhöht sich dabei um eins. HdFs und MUGCCarly1 wurden mit einer Dichte von 6600 Zellen/cm², Melanomzellen mit 3000 Zellen/cm² ausgesät. HdF wurden in P3-P5, MUGCCarly1 in P27-35, SK-MEL28 in P37/38 und MeWo in P66/67 für die Versuche verwendet.

Passagieren mit Accutase[®] (MUG-Mel2, heK)

Zur Subkultivierung der heKs erfolgt nach dem Absaugen des Mediums und dem Spülen mit PBS⁻ eine 12-15-minütige Inkubation mit 7 mL Accutase[®] im Brutschrank; im Falle der MUG-Mel2 3-minütig bei RT. Nach vollständiger Ablösung der Zellen, welches unter dem Mikroskop beobachtet wurde, wurden die abgelösten Zellen in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellkulturflasche abermals mit PBS⁻ gespült. Nach der Zentrifugation für 5 Min bei 300x g wird das Zellpellet in einem entsprechend definierten Volumen entsprechendem Mediums resuspendiert. Anschließend erfolgt eine Zellzählung (s. 3.1.2.3) um eine definierte Aussaat der Zellen vornehmen zu können; die Anzahl der Passagen erhöht sich dabei um eins. HeKs wurden mit einer Dichte von 4000 Zellen/cm², MUG-Mel2 mit einer Zellzahl von 17000 Zellen/cm² kultiviert. HeKs wurden in P3 für Experimente verwendet, MUG-Mel2 in P78-83.

3.1.2.3. Zellzahlbestimmung

Zellzahl und Viabilität wurden durch Trypanblau-Färbung bestimmt. Dieser blaue Farbstoff passiert nur beschädigte Membranen abgestorbener Zellen, lebende Zellen mit einer intakten Membran können ihn nicht absorbieren. Daher ist eine Unterscheidung zwischen lebenden (weißen) und toten (blauen) Zellen möglich.

10 µL Zellsuspension, gemischt mit 10 µL 0,4 % Trypanblau (Verdünnungsfaktor = 2), wurden in den Zwischenraum einer Neubauer-Zellzählkammer überführt. Lebensfähige und tote Zellen

in allen vier Quadranten wurden getrennt gezählt und summiert. Die Anzahl der Zellen wurde mit folgender Gleichung bestimmt:

$$\begin{aligned} \text{Zellzahl/mL} &= c \times d \times v \times f \\ c &= \text{gezählte Zellen/ Anzahl ausgezählter Quadrate} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} d &= \text{Verdünnungsfaktor; 2} \\ v &= \text{Mediumvolumen bei Resuspension} \\ f &= \text{Neubauer – Zellzählkammer – Faktor; } 10^4 \end{aligned}$$

Um die Viabilität in Prozent zu bestimmen, wurde die folgende Gleichung verwendet:

$$\text{Viabilität} = \frac{\text{Lebendzellzahl}}{\text{Gesamtzellzahl}} \times 100$$

3.1.2.4. Kryokonservierung von Zellen

Einfrieren von Zellen

Vor dem Einfrieren der Zellen wurde ein Mr. Frosty™ Gefrierbehälter, der eine Abkühlgeschwindigkeit von 1 °C/Min gewährleistet, auf RT vorgewärmt. Nach Zellablösung (s. 3.1.2.2) und Zellzahlbestimmung (s. 3.1.2.3) wurde die Zelldichte abhängig von den Zellart-spezifischen Kulturbedingungen auf z.B. 1 x 10⁶ Zellen pro mL (hdF) bzw. 3 x 10⁶ Zellen pro mL (heK) in zellspezifischem Zellkulturmedium eingestellt, ergänzt mit 10 % (v/v) DMSO und zusätzlich im Falle der Melanom- und Krebs-assoziierten Fibroblasten-Zelllinien 10 % (v/v) FCS. DMSO wirkt als Kryoprotektivum, das die Bildung von Eiskristallen verhindert, die zu Zellschäden führen würden. 1 mL der Zelllösung wurde in jedes Kryoröhrchen dosiert. Diese wiederum wurden in den Mr. Frosty™ sortiert, der sofort in den -80 °C Gefrierschrank gestellt wurde. Nach 24 h wurden die Kryoröhrchen zur Langzeitlagerung in den Flüssigstickstofftank überführt oder zur Kurzzeitlagerung bei -80 °C gelagert.

Auftauen von Zellen

Die Zellsuspension wurde schnell in ein Zentrifugenröhrchen durch wiederholtes, aber schonendes Resuspendieren überführt, das mit vorgewärmtem Medium befüllt wurde, um zytotoxische Wirkungen von DMSO zu vermeiden und pelletiert, um alle DMSO-haltigen Medien zu entfernen. Die Zellen wurden dann in zelltypspezifischem Medium resuspendiert und in der gewünschten Dichte in neuen Zellkulturflaschen, befüllt mit vorgewärmtem zelltypspezifischem Medium, ausgesät. HeK wurden nach dem Auftauen direkt in Zellkulturflaschen ausgesät ohne zusätzlichen Zentrifugationsschritt. Am nächsten Tag wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, um abgestorbene Zellen zu entfernen.

3.1.3. Kultivierung und Fixierung von Zellen auf Glasplättchen

Die Zellen wurden in einem Volumen von 500 µL auf Glasplättchen ausgesät, die in einer 24 well-Platte platziert wurden, und kultiviert, bis eine Konfluenz von etwa 50 % erreicht war. Nach einem Waschschrift mit PBS⁺, wurde jedes well mit 500 µL eiskalter 1:1 Ethanol/Aceton-Mischung bei -20 °C für 10 Min inkubiert, um die Zellen zu fixieren. Nach dem Absaugen des Ethanol/Aceton-Gemisches wurde die Platte mit geöffnetem Deckel zum Verdampfen restlicher Gemisch-Rückstände unter dem Abzug bei RT abgelegt. Anschließend wurde die getrocknete Platte entweder mit Parafilm[®] versiegelt und bei -20 °C gelagert oder direkt für die Färbung verwendet.

3.1.4. Induktion von Krebs-assoziierten Fibroblasten

3.1.4.1. Herstellung von MUG-Mel2-konditioniertem Medium

Um konditioniertes Medium zu erhalten, wurden 3×10^6 MUG-Mel2 in 20 mL RPMI-Medium jeweils pro T150 Zellkulturflasche ausgesät und für 3 Tage kultiviert. Nach Erreichen einer Konfluenz von 80 – 90 %, wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Nach weiteren 48 h wurden die Überstände gesammelt und durch einen 0,2 µm Filter gefiltert, um verbleibende Zelltrümmer zu entfernen. Anschließend wurde das konditionierte Medium aliquotiert und bis zur Verwendung bei – 20 °C gelagert.

3.1.4.2. Aktivierung von humanen dermalen Fibroblasten

Zur Aktivierung von hdFs wurden 3×10^5 Zellen in einer T75 Zellkulturflasche in DMEM-Medium ausgesät. Nach 3 Tagen Kultur wurden die Fibroblasten entweder mit 10 mL DMEM- Medium mit 10 ng/mL TGF-β [120], 5 mL DMEM-Medium mit 10 ng/mL TGF-β und 5 mL MUG-Mel2- konditioniertem Medium (s. 3.1.4.1) oder nur 10 mL MUG-Mel2-konditioniertem Medium inkubiert. Nach 48 h wurden die verschiedenen Arten von aktivierten Fibroblasten mit Trypsin/EDTA abgelöst (s. 3.1.2.2) und für diverse Experimente verwendet.

3.1.5. Generierung aktivierter CD3⁺ T Zellen [121]

3.1.5.1. Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Die für diese Studie verwendeten T Zellen wurden aus gesundem Spenderblut isoliert. Die Blutproben wurden vom Institut für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Würzburg zur Verfügung gestellt. Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (Peripheral Blood Mononuclear Cells; PBMCs) wurden durch Dichtezentrifugation gewonnen. Hierzu wurden 10 mL peripheres menschliches heparinisiertes Blut mit 40 mL RT PBS⁻/EDTA-Lösung verdünnt; davon wurden 25 mL vorsichtig in ein 50 mL Falcon-Röhrchen auf 20 mL Ficoll[®]-Paque Premium-Trennlösung (Dichte 1,077 g/mL) geschichtet. Zur Gewinnung der PBMCs wurden die Röhrchen 20 Min bei 800x g ohne Bremse bei RT zentrifugiert. Die Lösung trennte sich entsprechend ihrer unterschiedlichen Dichten und bildete vier Phasen; die oberste Phase - die Plasmaschicht - enthält Thrombozyten, Chemokine, Hormone und Elektrolyte. Darunter bilden die PBMCs einen kleinen Ring; die nächste Phase enthielt die Ficoll[®]-Trennlösung. Am Boden des Röhrchens sammeln sich polymorphnukleäre Zellen und Erythrozyten. Die PBMCs wurden mit einer sterilen 10-mL-Plastikpipette vorsichtig in ein neues Röhrchen überführt, dreimal mit 15 mL PBS⁻/EDTA-Lösung gewaschen und jeweils 10 Min bei 200x g zentrifugiert. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 10 mL RPMI-Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

3.1.5.2. Immunmagnetische Aufreinigung von PBMC-T Zell-Untergruppen

Die Isolierung von CD3⁺ T Zellen wird via Miltenyi MicroBeads mittels magnetischer Zellsortierung (magnetic cell sorting; MACS[®]) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt aus frisch isolierten PBMCs. Kurz gesagt, die pelletierten Zellen wurden in 80 µL MACS[®]-Puffer mit 20 µL CD3-Beads pro 10⁷ Zellen resuspendiert. Die Mischung wurde 15 Min auf Eis inkubiert und anschließend durch Zugabe von 1 mL MACS[®]-Puffer pro 10⁷ Zellen gewaschen. Je nach Gesamtzahl der Zellen wurde eine große (LS, für 1 × 10⁷ bis 1 × 10⁸ Zellen) oder mittelgroße (MS, maximale Zellzahl 1 × 10⁷) MACS[®]-Säule gewählt, die an Magneten auf dem MACS[®]-Board befestigt und mit Puffer benetzt wurde. Die Zell-Suspension wurde portionsweise in die Säule gegeben und das Eluat unmarkierter Zellen nach 3-maligem Waschen mit jeweils 1 bzw. 3 mL MACS[®]-Puffer gesammelt und verworfen. Danach wurde die Säule von dem Magneten abgenommen und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen eingesetzt. Nach Zugabe von 1 mL (MS) bzw. 5 mL (LS) MACS[®]-Puffer pro Säule wurde der Kolben sanft durch die Säule gedrückt und die CD3⁺ T Zellen in dem

Röhrchen gesammelt. Die isolierten T Zellen wurden gemäß dem RESTORE-Protokoll [122] in einer Dichte von 1×10^7 Zellen/mL ohne Zugabe zusätzlicher Faktoren für 48 h kultiviert.

3.1.5.3. Aktivierung der T Zellen

Die Aktivierung von CD3⁺ T Zellen erfolgte mittels anti-CD3/CD28 Dynabeads. Nach Zentrifugation der Zellen bei 4 °C bei 300x g für 10 Min wurde die Zellzahl auf eine Konzentration von 1×10^6 /mL eingestellt und 500 µL/well in eine 48 well-Platte pipettiert. Die Dynabeads wurden nach Hersteller-Anweisung vorbereitet und in einem Verhältnis von 1:1 zu den T Zellen hinzugegeben. Zusätzlich wurden 100 ng/mL IL-2 hinzugegeben und für 72 h inkubiert. Eine Überprüfung der Aktivierung erfolgte mittels FACS-Messung auf die Aktivierungsmarker CD25 und CD69 hin.

3.1.6. Bestimmung der Proliferationsraten mittels XCelligence®

Das Echtzeit-Zellanalyse-System XCelligence® (real-time cell analysis, RTCA) wurde verwendet, um den Einfluss verschiedener hdFs (juvenile, adulte, aktivierte hdFs und MUGCCarly1) auf die Proliferationsrate von MUG-Mel2 zu bestimmen. Zunächst wurden 100 µL RPMI-Medium in eine 96 Well-Viewer-E-Platte gegeben und für 30 Min bei RT inkubiert. Dann wurden 1500 MUG-Mel2 in 150 µL RPMI-Medium dazu pipettiert. Anschließend wurden 500 Zellen der verschiedenen Fibroblasten-Arten in 95 µL des entsprechenden Mediums in Inserts ausgesät, die in die well-Platte gehängt wurden. Als Kontrolle wurden nur MUG-Mel2 ohne den Einfluss eines anderen Zelltyps verwendet. Dann wurde die Platte in das XCelligence® eingesetzt, welches im Inkubator verweilt. Am nächsten Tag und an Tag 4 wurden die Medien gewechselt. Über die integrierten Elektroden der well-Platte wurde die Impedanz in jedem well über eine Woche hinweg automatisch zu festgelegten Zeitpunkten gemessen. Die vom Hersteller bereitgestellte XCelligence® RTCA Software Pro drückt die aufgezeichnete Impedanz u.a. als Zellindex über die Zeit aus. Um die Proliferationsrate der Zellen zu bestimmen, wurde die Steigung der gezeichneten Kurven berechnet.

3.1.7. Generierung von dreidimensionalen Gewebe-Äquivalenten

3.1.7.1. Generierung von Tumor-Sphäroiden

Zur Generierung von Tumor-Sphäroiden, wurden die Melanomzellen zunächst abgelöst und deren Zellzahl bestimmt (s. 3.1.2.3). Dann wurden 5×10^5 Melanomzellen in ein Plastik-Reservoir pipettiert, gefolgt von der Zugabe einer Mischung aus 2 mL Methylcellulose und 8 mL RPMI-Medium. Unter Verwendung einer Mehrkanalpipette wurden 100 μ L dieser Zellsuspension (5.000 Zellen pro mL) in jedes well einer 96 well- Rundbodenplatte (nicht haftend) pipettiert (500 Zellen pro well). Während der Inkubation für 7 d bei 37 °C und 5 % CO₂ bildeten die Zellen in jedem well ein Sphäroid, bestehend aus etwa 500 Melanomzellen. Diese Tumor-Sphäroide – mikroskopisch sichtbar – wurden vorsichtig mit einer 1 mL-Pipette mit abgeschnittener Spitze gesammelt, um eine Zerstörung der Sphäroide zu verhindern und für weitere Experimente eingesetzt.

3.1.7.2. Generierung von epidermalen Gewebe-Äquivalenten

Herstellung gesunder epidermaler Hautäquivalente

Rekonstruierte menschliche Epidermis (Reconstructed Human Epidermis, RHE; open source reconstructed epidermis, OS-REp) [118] spiegelt nur die 4 epidermalen Schichten der menschlichen Haut, bestehend aus heKs, wieder. RHE wurden unter Verwendung verschiedener Arten von hängenden Zellkultur-Inserts generiert. Bei Verwendung von Greiner ThinCert™-Inserts in einer 12 well-Platte wurden 5×10^5 hEK in 500 μ L E2-Medium auf der transluzenten PET-Insertmembran mit 0,4 μ m Porengröße ausgesät, während 3×10^5 hEK in 300 μ L E2-Medium auf der PC-Insertmembran der Marke Brand BIO-CERT® mit 0,4 μ m Porengröße in einer 24 well-Platte ausgesät wurden. Nach 2 h bei 37°C, in denen sich die ausgesäten Zellen an der Insertmembran anhaften, wurde ein jedes well mit E2-Medium befüllt. Im Falle der 24 well-Hautäquivalente der Marke BIO-CERT® wurden 1,4 mL E2-Medium, für die 12 well-Modelle von Greiner ThinCert™ 1 mL E2-Medium hinzugegeben. Nach 24 h Submers-Kultur wurden die Modelle an die Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche (Air-Liquid-Interface, ALI) gesetzt. Hierzu wurde das Medium innerhalb und außerhalb des Inserts abgesaugt, Greiner ThinCert™-Modelle wurden in 12 well-ThinCert™ Deepwell-Platten mit 4,2 mL E3-Medium überführt, während Brand BIO-CERT®-Modelle weiterhin in 24 well-Zellkulturplatten mit 1,4 mL E3-Medium hängend kultiviert wurden. Die Hautäquivalente wurden für 21 d kultiviert, in denen dreimal pro Woche ein Medienwechsel durchgeführt wurde.

Herstellung epidermaler Melanom-Modelle unterschiedlicher Tumorstadien (Abbildung 4-1)

a) Frühes Tumor-Stadium

Der Aufbau epidermaler Melanom-Modelle (mOS-REp; melanoma open source reconstructed epidermis) [123] erfolgte analog zur Generierung gesunder Hautäquivalente. Um ein frühes Tumor-Stadium in den organotypischen Modellen zu repräsentieren, wurde zu der hEK-Suspension ein für jede Zelllinie prädefiniertes Verhältnis an Melanomzellen pipettiert und die hEK-Melanomzell-Suspension dann auf den Inserts ausgesät.

b) Spätes Tumorstadium

Analog zur Generierung gesunder Hautäquivalente erfolgte der Aufbau epidermaler Melanom-Modelle des späten Tumorstadiums. Unmittelbar nach Aussaat der hEK-Suspension auf die Inserts wurden Melanom-Sphäroide in gewünschter prädefinierter Anzahl gesammelt (s. 3.1.7.1) und ebenfalls auf den Inserts ausgesät.

3.1.7.3. Generierung von Vollhaut-Äquivalenten auf Kollagen-Hydrogel-Basis

Herstellung gesunder dermal-epidermaler Hautäquivalente

Das zweischichtige Vollhaut-Äquivalent (Full Thickness Skin Equivalent, FTSE) [117] verfügt neben der vierschichtigen Epidermis über eine dermale Komponente, bestehend aus in Kollagen Typ I eingebetteten hdFs und wurde, angelehnt an ein bereits veröffentlichtes Protokoll, generiert.

Um ein massives Schrumpfen als Folge des Matrixumbaus der hdFs des Kollagen-Hydrogels während der Kultur zu vermeiden, wurden diese in einer eigens dafür entwickelten Kompressionsanlage plastik-komprimiert. Corning Costar Snapwell Inserts wurden für die Generierung von dermalen Komponenten auf Kollagen-Hydrogel-Basis verwendet, deren Membran, um eine bessere Nährstoffversorgung zu gewährleisten, mit einem DRS® Dermapen perforiert wurden.

Allgemein wurden Kollagen-Hydrogele in einer Konzentration von 10 mg/mL durch luftblasenfreies Mischen von in 0,1 % Essigsäure gelöstem gekühltem Kollagen (s. 3.1.1.2) mit gekühlter GNL in einem Verhältnis von 2:1 hergestellt. Die GNL ist eine Pufferlösung mit pH 8,5, die 2x DMEM enthält, um die hdFs, welche zuvor in jeweiliger benötigter Konzentration ($4,5 \times 10^4$ pro Modell) in GNL aufgenommen wurden, innerhalb des Hydrogels zu nähren. Durch Mischen der sauren Essig-Kollagen-Lösung mit der basischen GNL wird ein Verschieben hin zu einem neutralen pH-Wertes erzielt, welcher die Polymerisation der Kollagenfasern zu einem Kollagengel ermöglicht. Das Mischen der beiden Komponenten erfolgte entweder händisch

mittels über einen Dreiwegehahn verbundene Spritzen, deren homogene Mischung über ein Luer-Ventil in eine Combitip®-Spritze überführt wurde oder halb-automatisch mittels einer eigens dafür von Lukas Königer entwickelten Pumpe. Jedes Insert wurde schnell und luftblasenfrei mit 700 µL der Kollagen-GNL-Mischung befüllt, der Kompressions-Reaktor mit einem Deckel verschlossen und zur Polymerisation 1 h bei 37°C inkubiert. Die polymerisierten Hydrogele wurden bis zu einer Endhöhe von etwa 1 mm entweder mechanisch durch einen Kompressionsmotor komprimiert oder durch Hinzufügen von Gewichten auf den Kompressions-Reaktor. Nach abgeschlossenem Kompressions-Prozess, wurden die FTSE mittels Druckluft vom Reaktor gelöst und in eine 6 well-Corning® Snapwell-Kulturplatte, befüllt mit 5 mL DMEM-Medium, gehängt. In den 7 d nach der Präparation wurden die dermalen Komponenten submers kultiviert und dreimal pro Woche ein Medienwechsel durchgeführt. Nach 7 d wurden pro Insert 5×10^5 hEK in 250 µL E10-Medium auf der Dermis ausgesät. Nach 2 h bei 37°C, in denen sich die ausgesäten Zellen anhaften, wurde ein jedes well mit 5 mL E10-Medium befüllt. Nach 24 h Submers-Kultur wurden die Modelle auf ALI gesetzt und die Hautäquivalente bei 2,5 mL E10-Medium für 21 d kultiviert, in denen dreimal pro Woche ein Medienwechsel durchgeführt wurde.

Herstellung dermal-epidermaler Melanom-Modelle unterschiedlicher Tumorstadien (Abbildung 4-4)

a) Frühes Tumor-Stadium

Der Aufbau dermal-epidermaler Melanom-Modelle auf Kollagen-Hydrogel-Basis erfolgte analog zur Generierung gesunder dermal-epidermaler Hautäquivalente. Um ein frühes Tumor-Stadium in den organotypischen Modellen zu repräsentieren, wurde zu der hEK-Suspension ein für jede Zelllinie prädefiniertes Verhältnis an Melanomzellen pipettiert und die hEK-Melanomzell-Suspension dann auf den dermalen Komponenten ausgesät.

b) Spätes Tumorstadium

Analog zur Generierung gesunder dermal-epidermaler Hautäquivalente auf Kollagen-Hydrogel-Basis erfolgte der Aufbau dermal-epidermaler Melanom-Modelle des späten Tumorstadiums. Unmittelbar nach Aussaat der hEK-Suspension auf die dermale Komponente wurden Melanom-Sphäroide in gewünschter prädefinierter Anzahl gesammelt (s. 3.1.7.1) und ebenfalls auf die Dermis ausgesät.

3.1.7.4. Generierung von Vollhaut-Äquivalenten auf Basis volsynthetischer PA6-Fasern

Herstellung gesunder dermal-epidermaler Hautäquivalente (Abbildung 4-10) [119]

Elektrogesponnene PA6-Fasern (s. 3.1.1.3) wurden in Quadrate von 3 cm Kantenlänge geschnitten und in eine Petrischale mit dH₂O gegeben. Für jede Zellkrone wurden zwei Fasern übereinandergelegt eingespannt und mehrmals mit dH₂O gewaschen, um restliche NaCl-Partikel des Spinning-Prozesses zu entfernen. Danach wurden die in Zellkronen eingespannten Fasern autoklaviert. Da restliche Lösungsmittelrückstände in den Fasern während der Kultur schädlich für die Zellen sein könnten, wurden die in Zellkronen fixierten Fasern vor der Zellaussaat in 12 well-Zellkulturplatten gesetzt und mindestens 4 Tage in PBS inkubiert. HdF wurden mit einer Zelldichte von $4,5 \times 10^4$ pro Modell auf die Scaffolds ausgesät in 1,5 mL DMEM-Medium supplementiert mit 500 µM Ascorbinsäure-2-Phosphat (ascorbic acid 2-phosphate, AA₂P). Die Kultur wurde für zwei Wochen mit drei Medienwechseln pro Woche durchgeführt. Nach zwei Wochen wurden jeweils zwei dermale Komponenten aufeinandergelegt und auf ein Greiner ThinCert™, aus dem die Insertmembran entfernt wurde, gespannt und in eine Greiner Deepwell-Platte, gefüllt mit 4,2 mL E10-Medium, gesetzt. Danach wurden auf der Dermis hEK mit einer Zelldichte von 6×10^5 pro Modell in E10-Medium ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte der ALI, an den sich eine dreiwöchige Gewebereifung mit Medienwechseln dreimal pro Woche anschloss.

Herstellung dermal-epidermaler Melanom-Modelle unterschiedlicher Tumorstadien (Abbildung 4-10)

c) Frühes Tumor-Stadium

Der Aufbau dermal-epidermaler Melanom-Modelle auf Basis der PA6-Fasern erfolgte analog zur Generierung gesunder dermal-epidermaler Hautäquivalente. Um ein frühes Tumor-Stadium in den organotypischen Modellen zu repräsentieren, wurde zu der hEK-Suspension ein für jede Zelllinie prädefiniertes Verhältnis an Melanomzellen pipettiert und die hEK-Melanomzell-Suspension dann auf den dermalen Komponenten ausgesät.

d) Spätes Tumorstadium

Analog zur Generierung gesunder dermal-epidermaler Hautäquivalente auf Basis der PA6-Fasern erfolgte der Aufbau epidermaler-dermalen Melanom-Modelle des späten Tumorstadiums. Unmittelbar nach Aussaat der hEK-Suspension auf die dermale Komponente wurden Melanom-Sphäroide in gewünschter prädefinierter Anzahl gesammelt (s. 3.1.7.1) und ebenfalls auf die Dermis ausgesät.

3.2. Messung der zellulären Aktivität

3.2.1. MTT Zellviabilitäts-Assay

Die Viabilität von Zellen oder Gewebe-Äquivalenten wurde mittels MTT-Assay bestimmt. Das Prinzip dieses Endpunkt-Assays ist die mitochondriale Reduktion des gelben wasser-löslichen Tetrazoliumfarbstoffs MTT zu blauem unlöslichem Formazan-Salz durch metabolisch aktive Zellen [124, 125]. Zur Bestimmung der Viabilität wurden Zellen in 2D in vorgewärmter MTT-Lösung (1 mg/mL in PBS⁺) für 1 h bei 37 °C inkubiert, während Gewebemodelle in MTT-Lösung für 3 h bei 37 °C inkubiert wurden. Nach der Inkubation wurde die MTT-Lösung verworfen und der violette Formazan-Niederschlag wurde in 2 mL Isopropanol für die quantitative Analyse herausgelöst. Die kolorimetrische Quantifizierung wurde über Absorptionsmessungen bei 570 nm mit dem Spektralphotometer Tecan Infinite 200 durchgeführt. Die Proben wurden, sofern nicht anders angegeben, in biologischen Triplikaten mit jeweils technischen Duplikaten gemessen. Die Extinktionswerte wurden auf eine Blindreferenz (Isopropanol) bezogen und auf die unbehandelten Replikate jeder Gruppe normalisiert.

3.2.2. Bestimmung der Metabolit-Konzentration

Photometrische Messungen von Metaboliten in den Zellkulturüberständen können Aufschluss geben über Zellaktivität, zelluläre Integrität und Lebensfähigkeit der Zellen und Gewebe-Äquivalente. Glukose- und Laktatkonzentrationen sowie Laktatdehydrogenase (LDH)-Freisetzung in das Zellkulturmedium wurde mit dem Cedex Bio Analyzer gemessen. Die Durchführung erfolgte in biologischen Duplikaten oder Triplikaten nach Herstellerangabe. Der Glukoseverbrauch (in mM) wurde berechnet, indem die gemessene Glukosekonzentration in den Zellkulturüberständen vom Wert des jeweiligen Referenzmediums abgezogen wurde. Da Laktat ein Produkt des Glukosestoffwechsels ist, wurde die Laktatproduktion (in mM) ebenfalls in Bezug auf den Wert des jeweiligen Referenzmediums berechnet. LDH, ein intrazelluläres Enzym, katalysiert die Umwandlung von Pyruvat zu Laktat, unter anaeroben Bedingungen. Da die Konzentration von LDH (in U/L) im Zellkulturüberstand normalerweise unterhalb des Testbereichs von 20 U/L liegt und dieses nur im Falle einer Ruptur der Zellmembran freigesetzt wird, ist ein LDH-Spiegel oberhalb von 20 U/L ein Maß für den Verlust der Zellvitalität.

3.2.3. Zwei-Photonen Fluoreszenz-Lifetime-Imaging-Mikroskopie

Die Zwei-Photonen Fluoreszenz-Lifetime-Imaging-Mikroskopie (2-P FLIM) ist eine nicht-invasive metabolische Bildgebungstechnik, die den Zell- und Tumor-Metabolismus in Echtzeit durch Detektion endogener Fluorophore untersucht und wurde auf einem kundenspezifischen Multiphotonensystem durchgeführt [126–128]; sowohl die Messungen als auch die Auswertung und Berechnung der gewonnenen Daten erfolgte durch Michael G. Monaghan und Nuno G. B. Neto vom Department of Mechanical, Manufacturing and Biomedical Engineering und Centre for Biomedical Engineering des Trinity College Dublin, sowie dem Advanced Materials and Bioengineering Research Centre (AMBER) des Royal College of Surgeons in Ireland and Trinity College und dem CÚRAM, Centre for Research in Medical Devices der National University of Ireland [123]. Kurz gesagt wurde die Zwei-Photonen-Anregung der Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid(phosphat) (NAD(P)H) und Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) Fluoreszenz mit 760 nm bzw. 800 nm durchgeführt. Es wurden mindestens 3 Bilder für jedes Modell aufgenommen. Danach wurden Regionen von Interesse (ROI) ausgewählt und der NAD(P)H-Fluoreszenzzerfall bzw. die FAD⁺-Fluoreszenzintensität analysiert. Mit folgender Gleichung ist es möglich, das optische Redoxverhältnis (optical redox ratio, ORR) zu bestimmen:

$$ORR = \frac{NAD(P)H}{NAD(P)H + FAD^+}$$

3.3. MIA ELISA-Assay

Um die Menge an humanem Melanoma Inhibiting Activity (MIA), einem prominenten Marker des malignen Melanoms, im Medium zu messen, wurden Überstände gesammelt und bis zur Messung bei -80°C eingefroren. Das Prinzip des enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) ist die Streptavidin-Biotin-Interaktion. Das an eine mit Capture-Antikörpern beschichtete Platte gebundene Antigen wird durch einen biotinylierten Detektionsantikörper nachgewiesen. Nach Zugabe der Streptavidin-gekoppelten Meerrettichperoxidase (horse radish peroxidase, HRP) und des Chromogens Tetramethylbenzidin (TMB) ändert sich die Farbe der Lösung entsprechend der Menge an MIA.

Der ELISA wurde unter Verwendung eines Kits von abcam gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Als Standardkurve wurden Standardproben (0, 15,6, 31,2, 62,5, 125, 250, 500, 1000 pg/mL MIA) in einer seriellen Verdünnung hergestellt. Es wurden 100 µL der (un)verdünnten Probe und des Standards zu der vorbereiteten 96 well-Platte hinzugefügt und bei 37 °C für 90 Min inkubiert. Dann wurden 100 µL des 1X biotinylierten anti-Human MIA

Antikörpers in jedes well gegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 100 µL der 1X Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex-Lösung in jedes well pipettiert und für 30 Min bei 37 °C inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen wurden alle weiteren Inkubationsschritte im Dunkeln durchgeführt. 90 µL TMB color developing agent wurden in jedes well gegeben. Nach 20-25 Min Inkubation bei 37 °C wurden 100 µL TMB Stopplösung pro well hinzugegeben und die optische Dichte bei 450 nm bestimmt. Jede Probe wurde in Duplikaten gemessen.

3.4. Durchflusszytometrische Analyse

Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen wurde mit dem Durchflusszytometer BD Accuri™ C6 Plus durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen in FACS-Puffer (fluorescence activated cell sorting, FACS) resuspendiert und bei 350x g für 3 Min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Zellen durch Zugabe von 50 µL FACS-Puffer plus 1 µL des jeweiligen FACS-Antikörpers angefärbt (*Tabelle 4*). Die Antikörperinkubation erfolgte für 30 Min auf Eis, bevor die Zellen dreimal mit FACS-Puffer gewaschen wurden, um ungebundene Antikörperkonjugate zu entfernen. Abschließend wurden die Zellen in 500 µL FACS-Puffer resuspendiert und bis zur durchflusszytometrischen Analyse auf Eis gelagert. Die Auswertung der FACS-Daten erfolgte mit der Software FlowJo 10.7.2.

3.5. Nicht-invasives Monitoring maligner Melanome

3.5.1. MediTOM

Gemeinsam mit dem Zentrum für Geräte- und Anlagenentwicklung (Center of Device Development, CeDeD) wurde das optische Messsystem „MediTOM“, welches die Beobachtung von pigmentierten Tumorzellclustern mittels Durchlicht im Schattenwurfverfahren ermöglicht, entwickelt. Es erlaubt in-vitro Modelle des malignen Melanoms automatisiert zu analysieren und die Veränderungen an den Zellen digitalisiert zu erfassen. Das MediTOM wurde dazu verwendet Tumorprogression und -regression zerstörungsfrei und voll-automatisch zu detektieren. Aufgenommene Bilder wurden mittels ImageJ analysiert.

3.5.2. Optische Kohärenz-Tomographie

In Kooperation mit dem Fraunhofer IKTS wurde die Optische Kohärenz-Tomographie (optical coherence tomography, OCT) in das bestehende Methoden-Spektrum implementiert. Dieses Analyse-Verfahren ermöglicht eine tomografische Aufnahme/Querschnitt des gesamten Modells. Zudem erlaubt es das OCT die Pro- und Regression nicht-pigmentierter Melanome in den organotypischen Melanom-Modellen zu beobachten. Die tomografischen Aufnahmen wurden durch Dr. Jörg Opitz und Luise Schreiber durchgeführt.

3.6. Methoden zur histologischen Analyse der Gewebe-Äquivalente

3.6.1. Paraffineinbettung, Schnittpräparation, Entparaffinierung und Rehydrierung von Paraffinschnitten

Für die Mikroskopie werden dünne, durchscheinende Schnitte benötigt. Hierfür wurden durch Einbetten der Proben in Paraffin schnittfähige Strukturen erhalten [129, 130].

Gewebe-Äquivalente wurden mit 4 % PFA bei RT für 2 h fixiert, zwischen zwei Biopsieschwämmchen in eine Kunststoffkassette positioniert, die bis zum Beginn des Einbettungsprozesses in dH₂O aufbewahrt wurden. Die Proben wurden automatisch durch das automatisierte Paraffin-Infiltrationsprotokoll (*Tabelle 11*) ü.N. verarbeitet.

Tabelle 11: Paraffin-Infiltrationsprotokoll der Einbettstation.

Prozess	Zeit	Lösung
Abwaschen des Fixiermittels	1 h	dH ₂ O
Dehydrierung der Probe	1 h	50 % (v/v) Ethanol
	1 h	70 % (v/v) Ethanol
	1 h	80 % (v/v) Ethanol
	1 h	96 % (v/v) Ethanol
	1 h	2-Propanol I
	1 h	2-Propanol II
Entfernung des Alkohols	1h	1:1 2-Propanol:Xylol
	1 h	Xylol I
	1 h	Xylol II
Infiltration von Paraffin in die Probe	1,5 h	Paraffin I
	1,5 h	Paraffin II

Anschließend wurden die Gewebe-Äquivalente halbiert und mit der Schnittseite nach unten in einer Edelstahlgussform in Paraffin eingebettet. Anschließend wurden mit einem Mikrotom 4 bzw. 10 µm dicke Schnitte angefertigt, welche zum Glätten in ein 50 °C warmes Wasserbad und schließlich auf Objektträger überführt wurden, die bei 37 °C ü.N. getrocknet wurden.

Unmittelbar vor der Färbung mussten die in Paraffin eingebetteten Schnitte entparaffiniert und rehydriert werden. Daher wurde nach einer einstündigen Inkubation bei 60 °C zum Schmelzen des Paraffins der Entparaffinierungs- und Rehydratisierungsprozess wie in *Tabelle 12* gezeigt durchgeführt.

Tabelle 12: Absteigende Alkoholreihe zur Entparaffinierung und Rehydrierung.

Prozess	Zeit	Lösung
Entparaffinierung	10 Min	Xylol I
	10 Min	Xylol II
Rehydrierung	1 Min	96 % (v/v) Ethanol I
	1 Min	96 % (v/v) Ethanol II
	1 Min	70 % (v/v) Ethanol
	1 Min	50 % (v/v) Ethanol
	Schwenken, bis keine Turbulenzen mehr erkennbar sind	dH ₂ O

3.6.2. Dehydrierung von Paraffinschnitten und Einbetten von Proben

Nach jedem Färbeprozess wurden die in Paraffin eingebetteten Proben unter Verwendung einer aufsteigenden Alkoholreihe (*Tabelle 13*) dehydriert, in Entellan® und mit einem Glasdeckgläschen eingedeckelt.

Tabelle 13: Aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydrierung.

Prozess	Zeit	Lösung
Dehydrierung	1 Min	70 % (v/v) Ethanol
	2 Min	96 % (v/v) Ethanol
	5 Min	2-Propanol I
	5 Min	2-Propanol II
	5 Min	Xylol I
	5 Min	Xylol II

3.6.3. Hämatoxylin- und Eosin-Färbung

Für einen allgemeinen Überblick über die Zell- und Gewebemorphologie wurde eine Hämatoxylin- und Eosin (HE)-Färbung durchgeführt (*Tabelle 14*). Durch Bindung basophiler Strukturen wie DNA färbt der violette Farbstoff Hämatoxylin Zellkerne blau. Im Vergleich dazu färbt der rosafarbene Farbstoff Eosin acidophile, also zytoplasmatische Strukturen, rot [130].

Tabelle 14: HE-Färbeprozess.

Prozess	Zeit	Lösung
Färbung der Zellkerne	6 Min bis keine Farbe mehr ausgewaschen wird	Hämatoxylin dH ₂ O
Bläuen	5 Min	Leitungswasser (fließend)
Färbung des Cytoplasmas und der Extrazellulärmatrix	6 Min bis keine Farbe mehr ausgewaschen wird	Eosin dH ₂ O

3.6.4. Immunhistochemie und Immunfluoreszenz

Das Prinzip von Immunhistochemie (IHC) und Immunfluoreszenz (IF) ist der Nachweis spezifischer Antigene mit Primärantikörpern, deren fragmentkristallisierbare (Fc-) Region von Sekundärantikörpern einer anderen Spezies gebunden werden kann. Bei IHC sind diese Sekundärantikörper mit der HRP verbunden, die die Oxidation des Substrats DAB (3,3'-Diaminobenzidin) und die Bildung eines braun gefärbten Oxidationsprodukts vermittelt. Im Vergleich dazu sind bei IF Sekundärantikörper an einen Fluoreszenzfarbstoff gebunden, der fluoreszenzmikroskopisch mit einer dem Fluoreszenzfarbstoff entsprechenden Anregungswellenlänge nachgewiesen werden kann [130].

3.6.4.1. Immunhistochemie

In *Tabelle 15* ist der Prozess einer IHC dargestellt.

Tabelle 15: Prozess der IHC.

Prozess	Zeit	Lösung
Antigen retrieval:		
Enzymatisch (RT)	12 Min	abhängig vom verwendeten Antikörper (<i>Tabelle 4</i>)
Hitze-induziert (90-100 °C)	15 Min	
Waschen	5 Min	Waschpuffer
Blocken endogener Peroxidasen	10 Min	3 % (v/v) H ₂ O ₂
Waschen	5 Min	Waschpuffer
Blocken	30 Min	5 % (v/v) BSA
Markierung eines spezifischen Antigens	2 h RT oder 4 °C ü.N.	Primärantikörper (<i>Tabelle 4</i>)

im Dunklen	Waschen	5 Min (3x)	Waschpuffer
		10 Min	DCS Polymer Enhancer
	Waschen	5 Min (3x)	Waschpuffer
		20 Min	DCS HRP Polymer Reagenz
	Waschen	5 Min (3x)	Waschpuffer
		30 Sek - 7 Min	DAB
	Waschen	5 Min	Waschpuffer
	Färbung der Zellkerne	6 Min	Hämatoxylin
	Bläuen	5 Min	Leitungswasser (fließend)

Auf Glasplättchen ausgesäte Zellen wurden einmal mit PBS⁻ für 5 Min gewaschen, gefolgt von einem Waschschrift mit Waschpuffer für 5 Min und dann direkt mit den primären Antikörpern inkubiert. Danach wurde wie in *Tabelle 15* beschrieben vorgegangen.

3.6.4.2. Immunfluoreszenz

In *Tabelle 16* ist die Prozedur der IF dargestellt.

Tabelle 16: Prozedur der IF.

	Prozess	Zeit	Lösung
im Dunklen	Antigen retrieval:		
	Enzymatisch (RT)	12 Min	abhängig vom verwendeten Antikörper (<i>Tabelle 4</i>)
	Heat-induced (90-100 °C)	15 Min	
	Waschen	5 Min	Waschpuffer
	Blocken	60 Min	5 % (v/v) BSA
	Blocken	20 Min	5 % (v/v) Serum
		ü.N. (4 °C)	Primärantikörper (<i>Tabelle 4</i>)
	Waschen	5 Min (3x)	Waschpuffer
		60 Min	Sekundärantikörper (<i>Tabelle 4</i>)
	Waschen	5 min	Waschpuffer

Anschließend wurden die Proben direkt mit Fluoromount-GTM, das 4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI) enthält, zur Gegenfärbung der Zellkerne fixiert und mit Glasdeckgläschen eingedeckelt.

Auf Glasplättchen ausgesäte Zellen wurden mit PBS⁻ für 5 Min gewaschen, mit 0,02 % Triton X-Permeabilisierungslösung inkubiert, gefolgt von einem Waschschrift mit Waschpuffer für 5 Min und dann direkt mit den primären Antikörpern inkubiert. Anschließend wurde wie in *Tabelle 16* beschrieben vorgegangen.

3.6.5. TUNEL-Färbung

Für den In-situ-Apoptose-Nachweis in Gewebe-Äquivalenten wurde die Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL)-Färbung an histologischen Querschnitten verwendet. Das Prinzip dieser Färbung basiert darauf, dass mit dem Enzym terminale Desoxynukleotidtransferase (TdT) DNA-Brüche nachgewiesen werden können, die während der DNA-Fragmentierung in der Endphase der Apoptose auftreten. TdT bindet Biotin-markierte Desoxynukleotide an den 3'-Hydroxyl-Terminus von DNS-Brüchen. In einer Folgereaktion ermöglicht es die Bindung von Biotin an HRP-gekoppeltes Streptavidin. Die DNA-Fragmentierung kann durch Zugabe von DAB als chromogenes HRP-Substrat durch enzymatische Bildung eines braunen unlöslichen Niederschlags an der HRP-Bindungsstelle lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden [131]. Die TUNEL-Färbung wurde mit dem TUNEL Assay Kit – HRP-DAB gemäß dem Protokoll des Herstellers an histologischen Querschnitten von 10 µm Dicke auf polylysinbeschichteten Objektträgern durchgeführt; das Vorgehen ist in *Tabelle 17* dargestellt.

Tabelle 17: Prozess der TUNEL-Färbung.

Prozess	Zeit	Lösung
Permeabilisierung der Probe	20 Min	Proteinase K
Waschen	5 Min	Waschpuffer
Blocken endogener Peroxidasen	5 Min	3 % (v/v) H ₂ O ₂
Waschen	5 Min	Waschpuffer
Äquilibrierung	30 Min	Äquilibrierungspuffer
Markierungsreaktion	90 Min	TdT-Markierungsreaktionsmischung
Waschen	5 Min	Waschpuffer
Beendigung der Markierungsreaktion	5 Min	Stoppuffer (vorgewärmt auf 37 °C)
Waschen	5 Min	Waschpuffer
Blocken	10 Min	Blockpuffer
Detektion	30 Min	1x Konjugatlösung
Waschen	5 Min	Waschpuffer

DAB-Inkubation	15 Min	verdünnte DAB-Lösung
Waschen		dH ₂ O
Gegenfärbung	1-3 Min	Methylgrün-Gegenfärbungslösung
	2-4x	Ethanol (2x)
	Eintauchen	Xylol (1x)

3.7. Anwendung organotypischer Modelle des malignen Melanoms als präklinische Testsysteme

3.7.1. Zielgerichtete Behandlung des malignen Melanoms

3.7.1.1. Zielgerichtete Behandlung von Melanomzellen

Zur zielgerichteten medikamentösen Melanom-Behandlung in 2D wurden SK-MEL-28 ($1,5 \times 10^4$ Zellen in 500 μ L RPMI-Medium), MeWo ($1,5 \times 10^4$ Zellen in 500 μ L RPMI-Medium) und hEK (2×10^4 Zellen in 500 μ L E1-Medium) in eine 24 well-Zellkulturplatte am Tag vor der Arzneimittelapplikation ausgesät. Die Arzneimittelapplikation wurde systemisch am Tag nach der Zellaussaat durchgeführt. Vemurafenib, Cobimetinib oder eine Kombination aus beiden wurde dafür im jeweiligen Zellkulturmedium in definierten Konzentrationen gelöst und während des Medienwechsels auf die Zellen appliziert. Die Zellen wurden in dem mit Arzneimittel ergänzten Medium für 24 h, 48 h und 72 h unter Standardkulturbedingungen inkubiert; die Arzneimittelapplikation wurde nach 48 h Inkubation wiederholt.

3.7.1.2. Zielgerichtete Therapie von 3D Modellen des malignen Melanoms

Die zielgerichtete medikamentöse Melanom-Behandlung in 3D wurde an d21 nach ALI mit Modellen der Marke Brand BIO-CERT® systemisch durchgeführt. Vemurafenib, Cobimetinib oder eine Kombination aus beiden wurden in definierten Konzentrationen in E3-Medium gelöst und während des Medienwechsels systemisch zu den Modellen gegeben. Die Zellen wurden in dem mit Arzneimittel supplimentierten Medium für 72 h unter Standardkulturbedingungen inkubiert; die Arzneimittelapplikation wurde nach 48 h wiederholt.

3.7.2. Anti-Tumor-Therapie mit Peptid RDP22

Das Peptid R-DIM-P-LF11-322 (RDP22) wurde freundlicherweise von Assoz. Prof. Priv.-Doz. Mag. Dr. Beate Rinner und Assoz. Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn. Dagmar Zweytick, Medizinische Universität Graz (Graz, Österreich), zur Verfügung gestellt. Es wurde in 0,1 % Essigsäure in einer Konzentration von 3 mg/mL gelöst und bis zum Gebrauch bei 4 °C gelagert.

Die Behandlung von Melanom-Modellen mit dem anti-Tumor Peptid RDP22 [132] erfolgte an Greiner ThinCert™-Modellen an d1 und d2 nach ALI. Es wurden jeweils 50 ug RDP22 topisch aufgetragen.

4. Ergebnisse

Um humane organotypische 3D Modelle des malignen Melanoms zu etablieren und ihre Anwendbarkeit als präklinische Testsysteme für die Bewertung der Wirksamkeit von anti-Tumor Therapeutika zu bewerten, wurde diese Studie in vier Themenbereiche unterteilt. Der erste Teil fokussiert sich auf die Etablierung unterschiedlich komplexer Melanom-Modelle, die verschiedene Melanom-Subtypen, mögliche Zielstrukturen potentieller Wirkstoffe und verschiedene Stadien des Tumors reflektieren. Bei der Charakterisierung der etablierten Modelle lag der Fokus auf histologischen und immunhistochemischen Analysen bezüglich der Expression tumor-relevanter Marker und der Interaktion mit der Mikroumgebung. Um eine Korrelation zur in vivo Situation bewerten zu können, wurden die etablierten in vitro Modelle hinsichtlich der Expression klinisch relevanter melanom-assoziiertes Marker immunhistochemisch im Vergleich zu Patientengewebe analysiert.

Der zweite Abschnitt beinhaltet die Implementierung eines zerstörungsfreien Monitorings maligner Melanome im in vitro Modell. Hierfür wurden drei technische Analyse-Verfahren zur Detektion der Tumor-Formierung, des Therapie-Verlaufes sowie der Evaluierung des Tumor-Metabolismus etabliert.

Im dritten Themenbereich erfolgt die Evaluierung der Eignung als präklinisches Testsystem zur Wirksamkeits-Testung von anti-Tumor Therapeutika. Dies erfolgte anhand der Gabe von etablierter anti-Tumor Therapeutika, der sich in der Klinik im Einsatz befindlichen BRAF-/MEK-Inhibitoren Vemurafenib und Cobimetinib, sowie der Validierung in der präklinischen Therapieentwicklung mittels einem neuen Anti-Tumor Therapie-Ansatz mit Peptid RDP22.

Der letzte Abschnitt thematisiert die Steigerung der Komplexität des organotypischen Modells des malignen Melanoms durch Integration und Untersuchung des Einflusses von Komponenten der Tumormikroumgebung.

4.1. Entwicklung humaner organotypischer 3D Modelle des malignen Melanoms

Zur Entwicklung auf den Menschen übertragbarer Tumormodelle, die ein Testen von Therapien präklinisch nahe an der in vivo Situation erlauben, wurden epidermale (4.1.1; hinsichtlich der Nomenklatur wurde „open source reconstructed epidermis“ für gesunde und „melanoma open source reconstructed epidermis“ für epidermale Melanom-Modelle festgelegt, wobei u.a. die verwendete Melanom-Zelllinie hochgestellt wurde), sowie auf unterschiedlichen Matrices dermal-epidermale (s. 4.1.2 und 4.1.5; bezüglich der Nomenklatur wurde sich für „full thickness skin equivalent“ für gesunde und „melanoma full thickness skin equivalent“ für dermal-epidermale Melanom-Modelle entschieden, wobei u.a. die verwendete

Melanom-Zelllinie hochgestellt wurde) humane organotypische 3D Modelle des malignen Melanoms etabliert, die unterschiedliche Melanom-Subtypen und Zielstrukturen potentieller Wirksubstanzen (s. 4.1.3) widerspiegeln sowie unterschiedliche Tumorstadien reflektieren. Diese wurden anschließend anhand der Expression tumor-relevanter Marker charakterisiert (*Abbildung 4-3* und *Abbildung 4-5*), bezüglich der Interaktion mit der Mikroumgebung analysiert (s. 4.1.4), sowie hinsichtlich einer Korrelation mit der in vivo Situation bewertet.

4.1.1. Etablierung und Charakterisierung epidermaler Melanom-Modelle

Zur Herstellung epidermaler Melanom-Modelle (mOS-REp; melanoma open source reconstructed epidermis) verschiedener Stadien der Tumor-Entwicklung wurden Melanom-Sphäroide (s. 3.1.7.1) für das späte Tumorstadium bzw. Melanomzellen in Einzelsuspension für das frühe Tumorstadium zusammen mit Keratinozyten in einem vordefinierten Verhältnis auf Polycarbonat-Membran-Inserts ausgesät (*Abbildung 4-1 A*). Das optimale Verhältnis von Melanomzellen und Keratinozyten wurde für jede Zelllinie individuell, durch Auswertung verschiedener Aussaatverhältnisse ermittelt, die von 1:25 über 1:50 bis 1:100 reichten (es wird lediglich das optimale Verhältnis gezeigt). Dies ermöglichte die Bildung von Tumornestern, die physiologischerweise von der Basalschicht einer gut geschichteten Epidermis ausgehen. Suboptimale Verhältnisse würden dazu führen, dass Melanomzellen in den Modellen nicht detektiert werden könnten oder im Gegensatz dazu das Modell von Melanomen überwuchert wird. Die ausgesäten Zellen wurden 24 h lang submers inkubiert, bevor die Modelle an die Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche gesetzt und bis d21 unter Standardkulturbedingungen kultiviert wurden, um die Reifung der Epidermis und die Melanombildung zu ermöglichen. Makroskopisch erscheinen nach 21 Tagen Kulturzeit gebildete Mikrotumore der Zelllinie MUG-Mel2 im Modell als dunkle Flecken (*Abbildung 4-1 B*). mOS-REP weisen eine raue und unebene Modelloberfläche mit sichtbaren pigmentierten Melanomclustern auf, die über das gesamte Modell verteilt sind. Im späten Tumorstadium sind deutlich größere Tumornester sichtbar. Melanom-Sphäroide der Zelllinie MUG-Mel2 weisen im Phasenkontrastmikroskop das Erscheinungsbild eines kugelförmigen Zellaggregats auf (*Abbildung 4-1 C I*), welches im Inneren kompakter und dichter erschien. Querschnitte wurden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, um einen morphologischen Überblick über das Sphäroid zu erhalten. Dieses schien im äußeren Bereich von lockerer Kompaktheit und geringerer Rundheit zu sein (*Abbildung 4-1 C II*). Zusätzlich wurde eine IF für den Melanommarker HMB-45 und den Proliferationsmarker KI67 durchgeführt (*Abbildung 4-1 C III*). Es konnten zahlreiche HMB-45- und KI67-positive Zellen im gesamten Sphäroid detektiert werden. Um einen morphologischen Überblick über die epidermalen Melanom-Modelle unterschiedlicher Tumorstadien im Vergleich zu gesunden

epidermalen Hautmodellen (OS-REp; open source reconstructed epidermis) zu erhalten, wurden Querschnitte mit HE gefärbt (Abbildung 4-1 D).

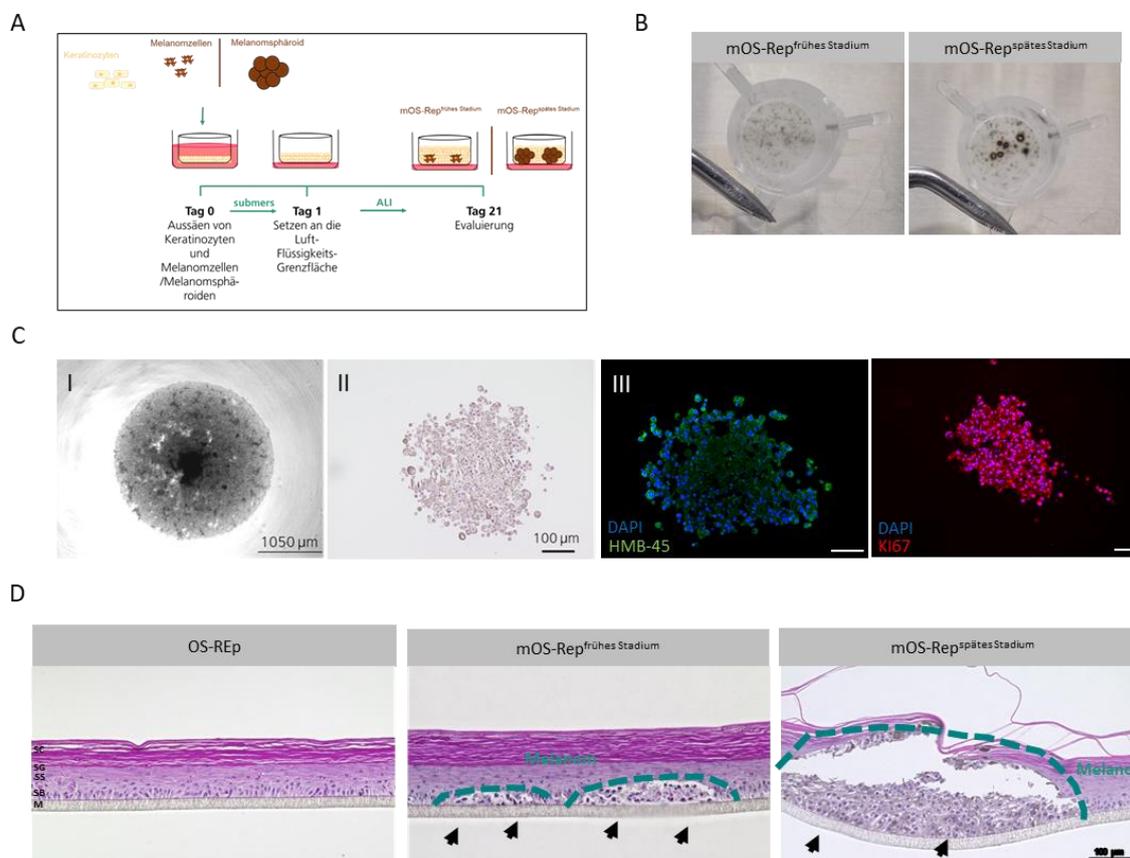


Abbildung 4-1: **Herstellung epidermaler Melanom-Modelle unterschiedlicher Tumorstadien.** (A) Schematische Darstellung der Modellgenerierung von mOS-REp (melanoma open source reconstructed epidermis) des frühen und späten Stadiums. Für die in vitro RHE-Modelle wurden in definierten Mischverhältnissen auf Polycarbonat-Membran-Inserts an Tag 0 humane epidermale Keratinozyten (hEK) und Melanomzellen in Einzelsuspension (frühes Stadium) bzw. hEK und Melanom-Sphäroide (spätes Stadium) ausgesät. Am Tag 1 wurden die Modelle an die Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche (Air-Liquid-Interface, ALI) gesetzt und bis Tag 21 kultiviert. (B) Makroskopische Bilder von mOS-REp des frühen (links) und des späten Stadiums (rechts). Gebildete Mikrotumore der Zelllinie MUG-Mel2 erscheinen im Modell als dunkle Flecken. (C) Melanom-Sphäroid der Zelllinie MUG-Mel2. (I) Phasenkontrastmikroskopie. Der Maßstabsbalken entspricht 1050 μm . (II) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm . (III) Immunfluoreszenzfärbung für den Melanommarker HMB-45 (grün) und den Proliferationsmarker Ki67 (rot). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm . (D) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von epidermalen gesunden Hautäquivalenten (OS-REp) und Melanom-Hautmodellen beider Tumorstadien. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

Die erfolgreiche Entwicklung humaner epidermaler Melanom-Modelle war histologisch durch die Bildung einer mehrschichtigen gut stratifizierten und differenzierten Epidermis, bestehend aus den vier charakteristischen Epidermisschichten der menschlichen Haut Stratum Basale, Stratum Spinosum, Stratum Granulosum und Stratum Corneum, sowie die Ausbildung von Melanomnestern innerhalb des dreidimensionalen Modells gekennzeichnet. Histologische Hämatoxylin und Eosin-gefärbte Querschnitte des OS-REp bzw. der mOS-REp beider

Tumorstadien zu ausgewählten Zeitpunkten (d3, d6, d15, d17, d20) verdeutlichen den Prozess der Stratifizierung und Melanom-Progression innerhalb der 21-tägigen Kulturdauer (*Abbildung 4-2*). Die einschichtigen basalen hEK wiesen eine hochgradig geordnete, palisadenartige Struktur auf, während die differenzierten Zellen des suprabasalen Stratum Spinosum ihre Morphologie allmählich veränderten, indem sie sich abflachten und vergrößerten. Zellen des Stratum Granulosum konnten innerhalb des epidermalen Gewebes aufgrund der kumulativen Aggregation von Lipidgranula im Zytoplasma dieser Zellen identifiziert werden. Außerdem wiesen beide Modelltypen ein ausgeprägtes keratinisiertes Stratum Corneum auf, das aus abgeflachten, abgestorbenen Epithelzellen bestand, die an das Stratum Granulosum angrenzten. Alle in dieser Studie verwendeten Melanomzelllinien bildeten disaggregierte, zerklüftete und lockere Tumorcluster, die sich in Größe und Form unterschieden und stochastisch über das gesamte Modell verteilt, sowie deutlich vom umgebenden gesunden Gewebe abgegrenzt waren. Diese Melanomzellcluster befanden sich hauptsächlich im Stratum basale. Je nach Größe und Ausdehnung dehnten sich die Cluster jedoch auch in die suprabasalen Epidermisschichten aus. Frühes und spätes Tumorstadium unterschieden sich deutlich histologisch durch Größe, Form und Ausdehnung der gebildeten Melanomcluster (*Abbildung 4-1 D*) [123].

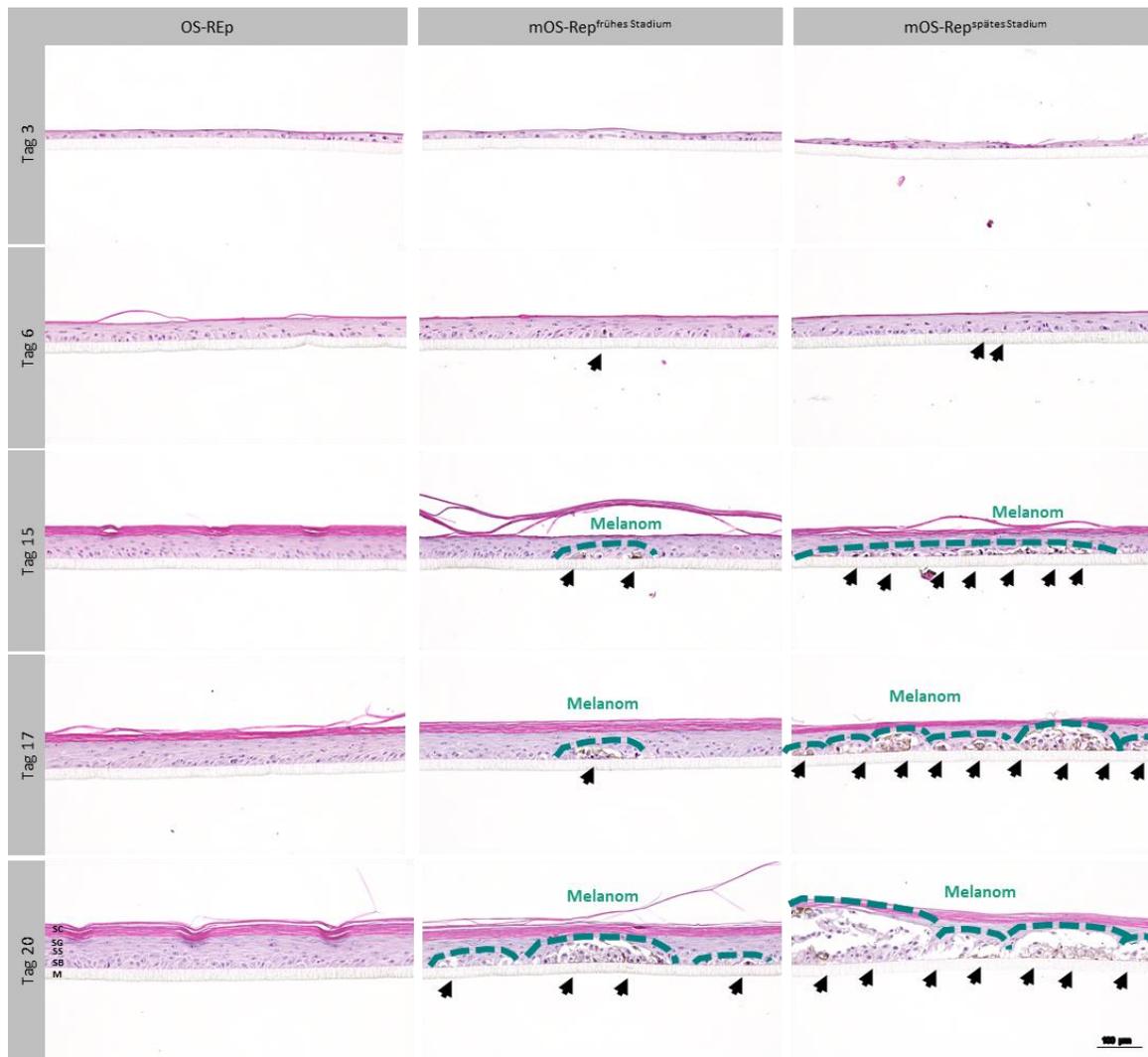


Abbildung 4-2: **Stratifizierung und Melanom-Progression in epidermalen in vitro Haut- und Melanom-Äquivalenten.** Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von OS-REp (linke Spalte) und mOS-REp des frühen (mittlere Spalte) bzw. späten Tumor-Stadiums (rechte Spalte) zu ausgewählten Zeitpunkten (d3, d6, d15, d17, d20) der 21-tägigen Kulturdauer. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

Um die etablierten epidermalen humanen dreidimensionalen organotypischen in vitro Modelle des malignen Melanoms verschiedener Tumorstadien anhand der Expression tumor-relevanter Marker zu charakterisieren und eine Korrelation zu in vivo zu evaluieren, erfolgte eine immunhistochemische Analyse bezüglich klinisch relevanter melanom-assoziierten Marker. Neben dem Melanommarker HMB-45 wurde im diagnostischen Labor der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität Würzburg von Claudia Siedel auf die klinisch relevanten und in der Diagnostik eingesetzten melanom-assoziierten Marker Melan-A, S100 β , MITF, SOX10 und PRAME, sowie den Proliferationsmarker KI67 gefärbt (Abbildung 4-3). Beide mOS-REp waren positiv für die melanom-assoziierten Marker HMB-45, Melan-A, S100 β , MITF und SOX10, sowie leicht positiv für PRAME und ermöglichten so eine klare Abgrenzung der Tumornester vom

umgebenden gesunden Gewebe, während OS-REp eindeutig negativ waren. Die Ki67-Färbung von mOS-REp zeigte eine starke proliferative Aktivität in den Melanomzellclustern, aber auch gelegentlich in suprabasalen Bereichen, während das Auftreten von Ki67-positiven Zellen in OS-REp auf die basalen Regionen beschränkt war.

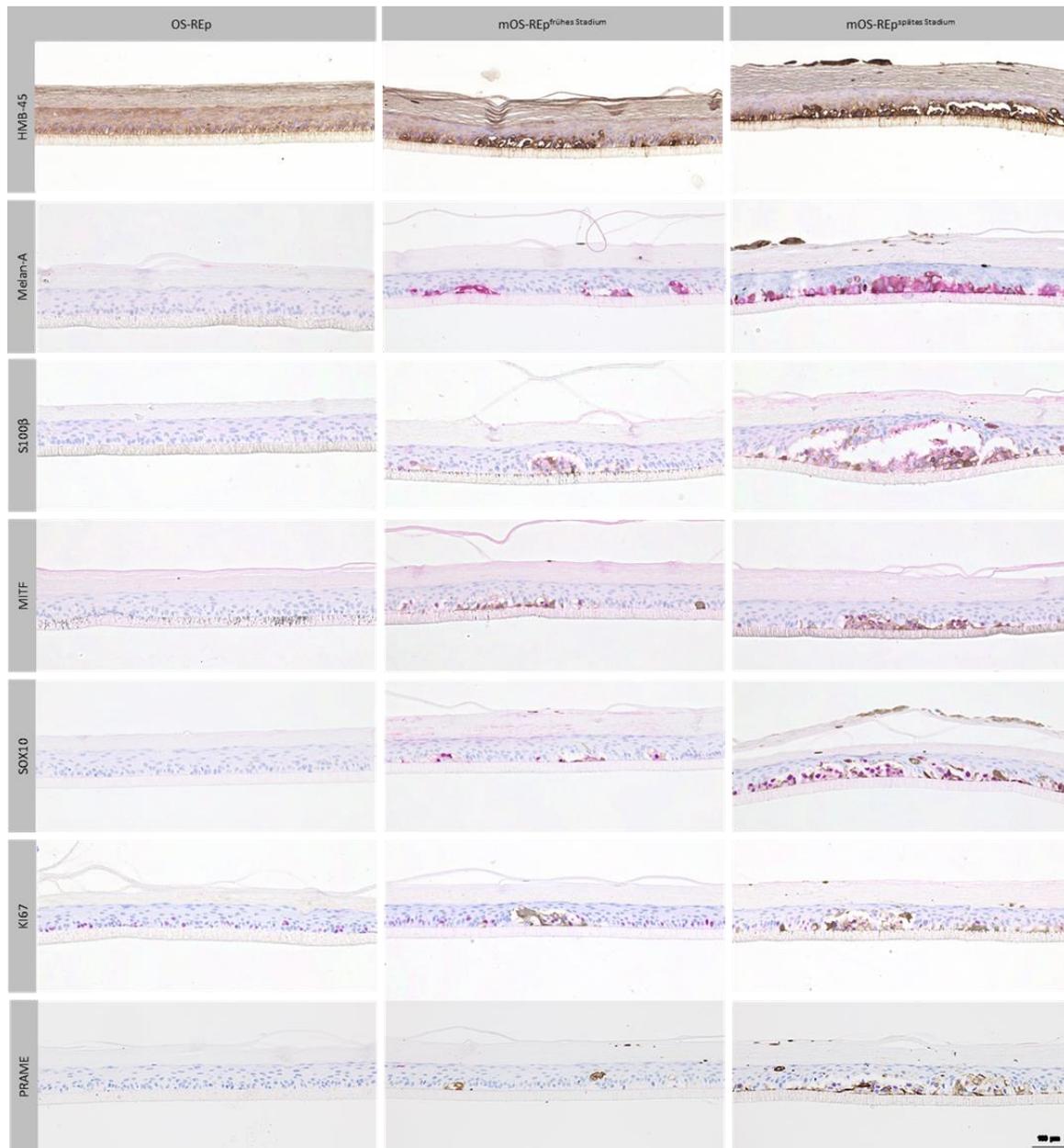


Abbildung 4-3: **Charakterisierung epidermaler Melanom-Modelle unterschiedlicher Tumorstadien.** Immunhistochemische Färbung von Querschnitten von epidermalen gesunden Hautäquivalenten (OS-REp) und Melanom-Hautmodellen beider Tumorstadien an d21. DAB-Färbung (braun) für den Melanommarker HMB-45. Magenta-Färbungen (pink) für die klinisch relevanten melanom-assoziierten Marker Melan-A, S100 β , MITF, SOX10 und PRAME, sowie den Proliferationsmarker Ki67. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

4.1.2. Etablierung und Charakterisierung dermal-epidermaler Melanom-Modelle auf Kollagen-Hydrogel-Basis

Zur Generierung dermal-epidermaler Melanom-Modelle (mFTSE; melanoma full thickness skin equivalent) verschiedener Stadien der Tumor-Entwicklung auf Kollagen-Hydrogel-Basis wurde zunächst durch plastische Kompression in Kollagen Typ I eingebetteter hDFs eine dermale Komponente hergestellt. Auf diese wurden nach einer Woche submers-Kultur Melanom-Sphäroide (s. 3.1.7.1) für das späte Tumorstadium bzw. Melanomzellen in Einzelsuspension für das frühe Tumorstadium zusammen mit Keratinozyten in einem vordefinierten Verhältnis ausgesät (*Abbildung 4-4 A*). Analog zur Etablierung epidermaler Melanom-Modelle wurde auch für die dermal-epidermalen Modelle das optimale Verhältnis von Melanomzellen und Keratinozyten für jede Zelllinie individuell, durch Auswertung verschiedener Aussaatverhältnisse, ermittelt, die von 1:25 über 1:50 bis 1:100 reichten (es werden lediglich die Daten der optimalen Verhältnisse gezeigt), um die physiologische Bildung von Tumornestern an der dermoepidermalen Junktionszone zu ermöglichen. Suboptimale Verhältnisse würden auch hier dazu führen, dass das Modell von Melanomen überwuchert wird oder im Gegensatz dazu Melanomzellen in den Modellen nicht detektiert werden könnten. Die ausgesäten Zellen wurden 24 h lang submers inkubiert, bevor die Modelle ALI gesetzt und bis d21 unter Standardkulturbedingungen kultiviert wurden, um die Melanombildung und Reifung der Epidermis zu ermöglichen. mFTSE weisen eine raue und unebene Modelloberfläche mit sichtbaren pigmentierten Melanomclustern auf, die über das gesamte Modell verteilt sind, wobei im späten Tumorstadium deutlich größere Tumornester sichtbar sind. Allgemein erscheinen gebildete Mikrotumore der Zelllinie MUG-Mel2 nach 21 Tagen Kulturzeit makroskopisch im Modell als dunkle Flecken (*Abbildung 4-4 B*). Querschnitte dermal-epidermaler Melanom-Modelle unterschiedlicher Tumorstadien wurden im Vergleich zu gesunden Vollhautmodellen (FTSE; full thickness skin equivalent) Hämatoxylin und Eosin gefärbt, um einen morphologischen Überblick zu erhalten. Die Entwicklung humaner dermal-epidermaler Melanom-Modelle war histologisch durch die Ausbildung einer dermalen Komponente, in der die Fibroblasten homogen im Hydrogel verteilt vorlagen, die Bildung einer mehrschichtigen gut stratifizierten und differenzierten Epidermis, bestehend aus den vier charakteristischen Epidermisschichten Stratum Basale, Stratum Spinosum, Stratum Granulosum und Stratum Corneum, sowie die Ausbildung von Melanomclustern an der dermoepidermalen Junktionszone gekennzeichnet. Alle in dieser Studie verwendeten Melanomzelllinien bildeten disaggregierte, zerklüftete und lockere Tumorcluster, die sich in Größe und Form unterschieden und stochastisch über das gesamte Modell verteilt, sowie deutlich vom umgebenden gesunden Gewebe abgrenzbar waren. Frühes und spätes Tumorstadium unterschieden sich histologisch deutlich durch Größe, Form und Ausdehnung der gebildeten Melanomcluster (*Abbildung 4-4 C*).

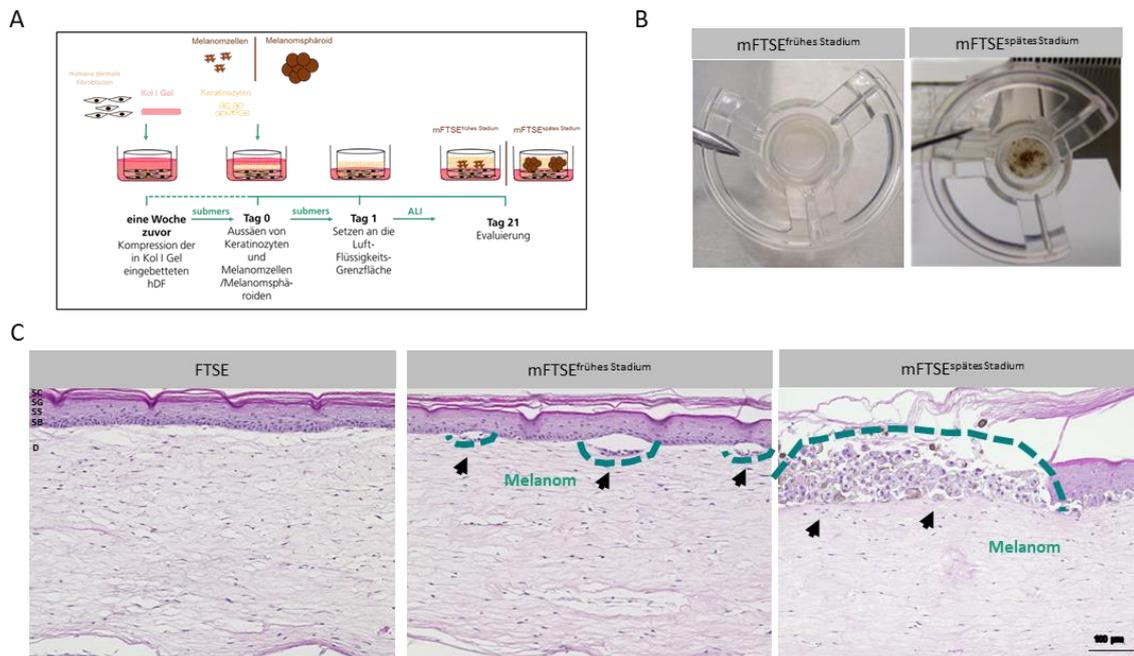


Abbildung 4-4: Herstellung und Charakterisierung dermal-epidermalen Melanom-Äquivalenten auf Kollagen-Hydrogel-Basis unterschiedlicher Tumorstadien. (A) Schematische Darstellung der Modell-Generierung von mFTSE (melanoma full thickness skin equivalent) des frühen und späten Stadiums. Die *in vitro* Vollhaut-Modelle verfügen über eine dermale Komponente, welche aus in Kollagen I-Gel eingebetteten humanen dermalen Fibroblasten besteht; auf die dermale Komponente wurden hEK und Melanomzellen in Einzelsuspension in definierten Mischverhältnissen (frühes Stadium) bzw. hEK und Melanom-Sphäroide (spätes Stadium) ausgesät, an Tag 1 die Modelle an die Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche (Air-Liquid-Interface, ALI) gesetzt und für 21 Tage kultiviert. (B) Makroskopische Bilder von mFTSE des frühen (links) und des späten Stadiums (rechts). Gebildete Mikrotumore der Zelllinie MUG-Mel2 erscheinen im Modell als dunkle Flecken. (C) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von dermal-epidermalen gesunden Hautäquivalenten (FTSE) und Melanom-Vollhautmodellen beider Tumorstadien. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, D = Dermis. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

Um die etablierten dermal-epidermalen humanen dreidimensionalen organotypischen *in vitro* Modelle des malignen Melanoms unterschiedlicherer Tumorstadien hinsichtlich einer Korrelation zu *in vivo* zu evaluieren und anhand der Expression tumor-relevanter Marker zu charakterisieren, erfolgte eine immunhistochemische Analyse bezüglich klinisch relevanter Melanom-assoziierten Marker im Vergleich zu *in situ* Melanomen, deren gefärbte Querschnitte durch Prof. Dr. Bastian Schilling der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität Würzburg zur Verfügung gestellt wurden. Im diagnostischen Labor derselben Klinik erfolgte die Färbung von Querschnitten beider Modelltypen durch Claudia Siedel auf die klinisch relevanten und in der Diagnostik eingesetzten melanom-assoziierten Marker Melan-A, S100 β , MITF, SOX10 und PRAME, sowie den Proliferationsmarker Ki67 (Abbildung 4-5). Beide mFTSE waren positiv für die melanom-assoziierten Marker HMB-45, Melan-A, S100 β , MITF und SOX10, sowie leicht positiv für PRAME und ermöglichten so eine klare Abgrenzung der Tumornester vom umgebenden gesunden Gewebe an der dermoepidermalen Junctionsgrenze. Die Ki67-Färbung von mFTSE zeigte eine starke

proliferative Aktivität in den Melanomzellclustern, aber auch gelegentlich in suprabasalen Bereichen. Morphologische Charakteristika, wie eine homogene dermalen Komponente, eine mehrschichtige stratifizierte Epidermis, sowie Melanomcluster an der dermoepidermalen Junktionszone und das Expressionsprofil der verwendeten Marker waren ähnlich derer in situ.

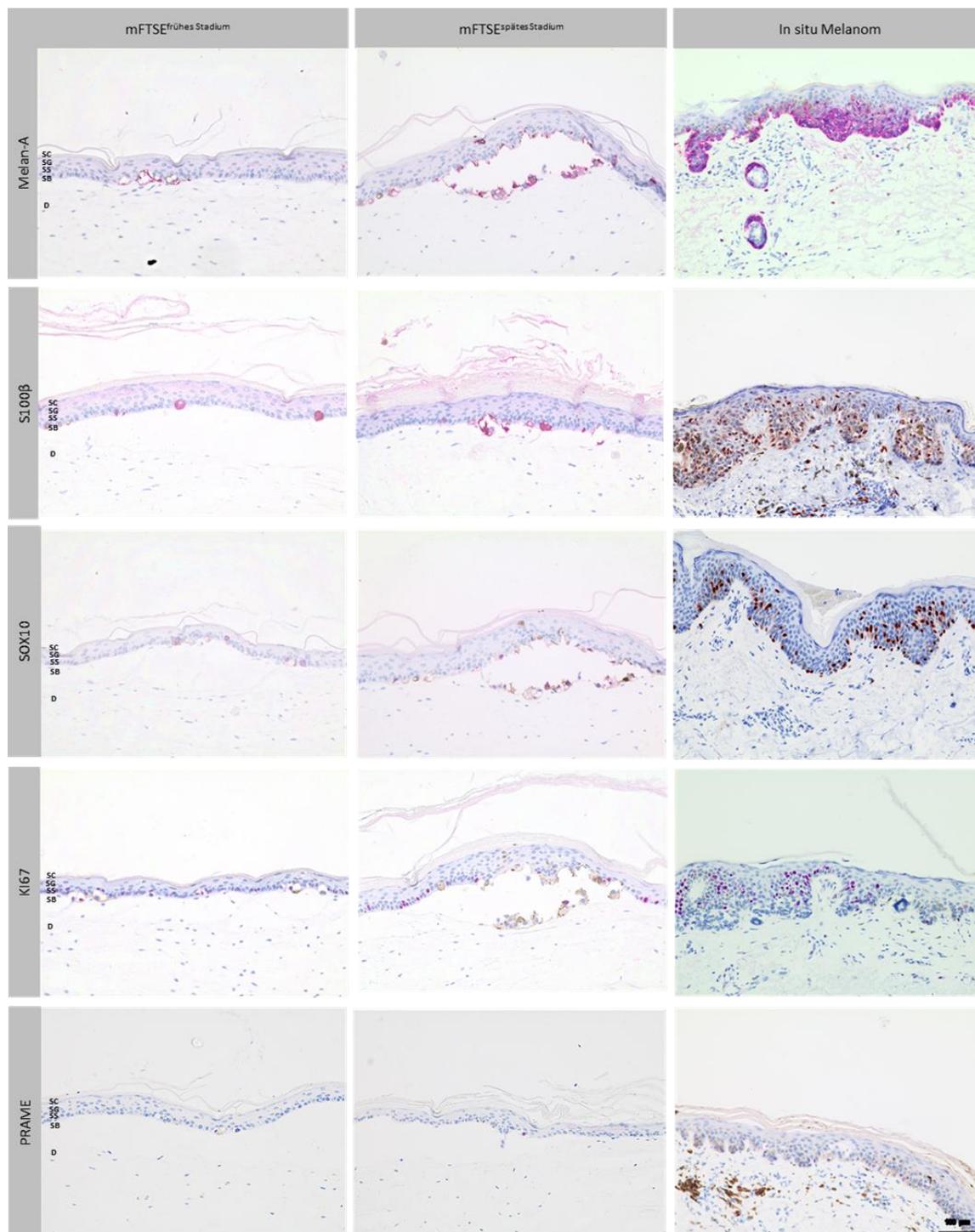


Abbildung 4-5: **Charakterisierung dermal-epidermalen Melanom-Modelle unterschiedlicher Tumorstadien.** Immunhistochemische Färbung von Querschnitten von dermal-epidermalen Melanom-Hautmodellen beider Tumorstadien an d21 sowie in situ Melanomen. DAB- (braun) und Magenta-Färbungen (pink) für die klinisch relevanten Melanom-assoziierten Marker Melan-A, S100 β , SOX10 und PRAME, sowie den Proliferationsmarker KI67. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, D = Dermis. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

4.1.3. Widerspiegeln unterschiedlicher Melanom-Subtypen im in vitro Modell

Um verschiedene Melanom-Subtypen im Modell widerspiegeln zu können, wurden unterschiedlichste humane Melanomzelllinien (SK-Mel-28, MeWo, MUG-Mel2) ins humane dreidimensionale organotypische epidermale und dermal-epidermale in vitro Modell des malignen Melanoms integriert (*Abbildung 4-6*). Diese unterscheiden sich, wie im Phasenkontrastmikroskop zu erkennen ist, nicht nur in ihrer Morphologie und Größe (*Abbildung 4-6 I*), sondern weisen auch ein unterschiedliches Mutationsprofil auf (s. Tabelle 10). SK-MEL-28 weisen eine BRAF^{V600E}-Treibermutation auf, MeWo liegt eine CDKN2A- und MUG-Mel2 eine NRAS^{Q61R}-Mutation zugrunde. Durch die verschiedenen Treibermutationen, die zur Krankheitsentstehung beitragen, stellen sie unterschiedliche Ansprüche an potentielle therapeutische Angriffspunkte. Die erfolgreiche Entwicklung humaner in vitro Melanom-Modelle war histologisch durch die Bildung einer mehrschichtigen gut stratifizierten und differenzierten Epidermis, sowie die physiologische Ausbildung von Melanomclustern innerhalb des dreidimensionalen Modells gekennzeichnet; entweder im Stratum Basale oder an der dermoepidermalen Junctionszone. Im Falle der mFTSE zudem durch die Ausbildung einer dermalen Komponente, in der die Fibroblasten homogen im Hydrogel verteilt vorlagen. Alle in dieser Studie verwendeten Melanomzelllinien bildeten deutlich vom umgebenden gesunden Gewebe abgrenzbare, disaggregierte, zerklüftete und lockere Tumorcluster, die sich in Größe und Form unterschieden und stochastisch über das gesamte Modell verteilt waren (*Abbildung 4-6 II*).

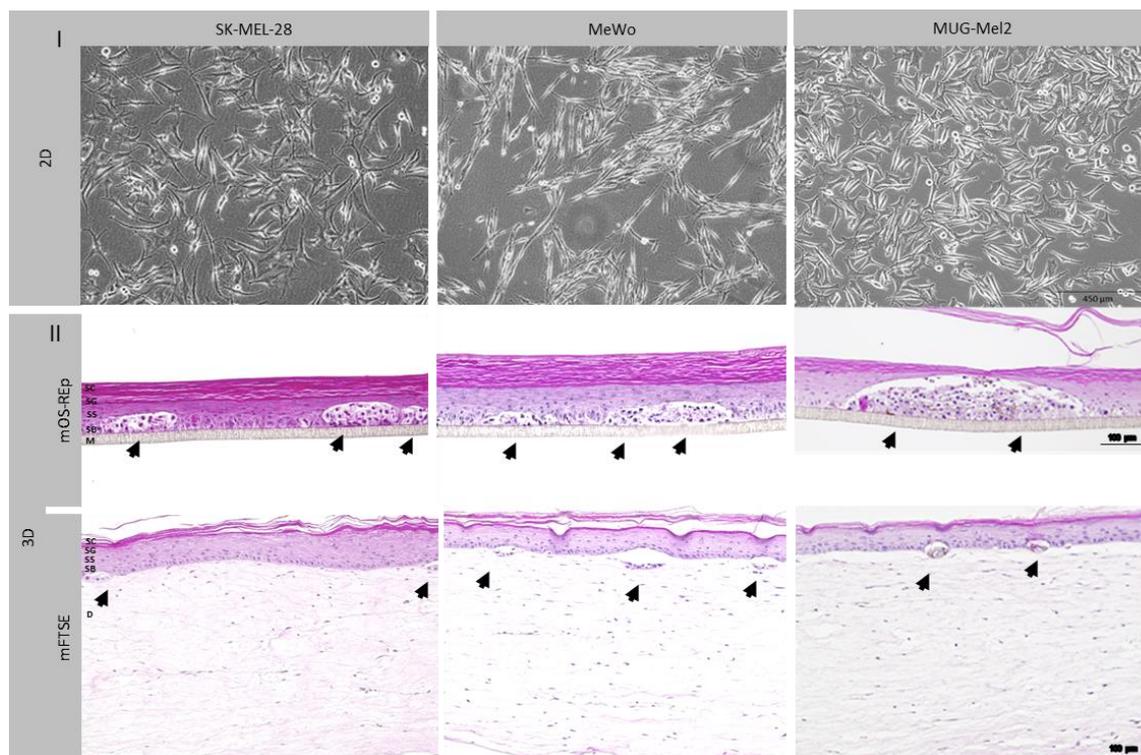


Abbildung 4-6: **Integration unterschiedlichster humaner Melanomzelllinien in epidermale und dermal-epidermale Melanomäquivalente.** Durch verschiedene zugrunde liegende Treibermutationen, die zur Krankheitsentstehung beitragen, stellen sie unterschiedliche Ansprüche an potentielle therapeutische Angriffspunkte und ermöglichen das Widerspiegeln vieler Melanom-Subtypen im Modell. (I) Phasenkontrastmikroskopie von SK-MEL-28, MeWo und MUG-Mel2. Der Maßstabsbalken entspricht 450 µm. (II) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von mOS-REp (obere Reihe) bzw. mFTSE (untere Reihe). SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran, D = Dermis. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

4.1.4. Interaktion des Melanoms mit der Mikroumgebung und Charakterisierung der unterschiedlichen Tumorstadien

Für das Wachstum, das Überleben, die lokale Invasion und die metastatische Ausbreitung von Tumorzellen ist die dynamische Interaktion zwischen TME und Tumorzellen entscheidend. Um die Interaktion des Melanoms mit der Mikroumgebung im in vitro Modell zu analysieren und die unterschiedlichen etablierten Tumorstadien genauer zu charakterisieren, erfolgte in der von mir konzipierten und betreuten medizinischen Doktorarbeit von Alina Riedel eine histologische Charakterisierung organotypischer in-vitro-Modelle des malignen Melanoms.

Da die Initiation der Invasion durch Interaktion von hEK und Melanomzellen über den Notch-Signalweg erfolgt, wurde eine IF für den Keratinozytenmarker Cytokeratin 14 (CK14), den Basalmembranmarker KollagenIV (CollIV), die Notch-Liganden DLL1 und Jagged1, sowie den Notch-Rezeptor Notch 1, jeweils in Kombination mit dem Melanommarker HMB-45 durchgeführt (Abbildung 4-7). Eine CK-14-Färbung konnte in allen Melanom-Modellen in den basalen hEK detektiert werden. Ein starkes positives HMB-45-Signal in allen

Melanom-Gewebe-Äquivalenten ermöglichte eine klare Abgrenzung der Tumornester vom umgebenden gesunden Gewebe. Ein starkes ColIV-Signal, insbesondere in den mFTSE, verdeutlichte die physiologische Ausbildung der Melanomcluster im Stratum Basale bzw. an der dermoepidermalen Junctionszone. Die Notch-Liganden konnten insbesondere in den Modellen der späteren Tumorstadien im Bereich der differenzierten und terminal differenzierten hEK detektiert werden. In keinem der Melanom-Modelle konnte eine kolokalisierte Färbung des Notch-Rezeptors mit HMB-45 detektiert werden.

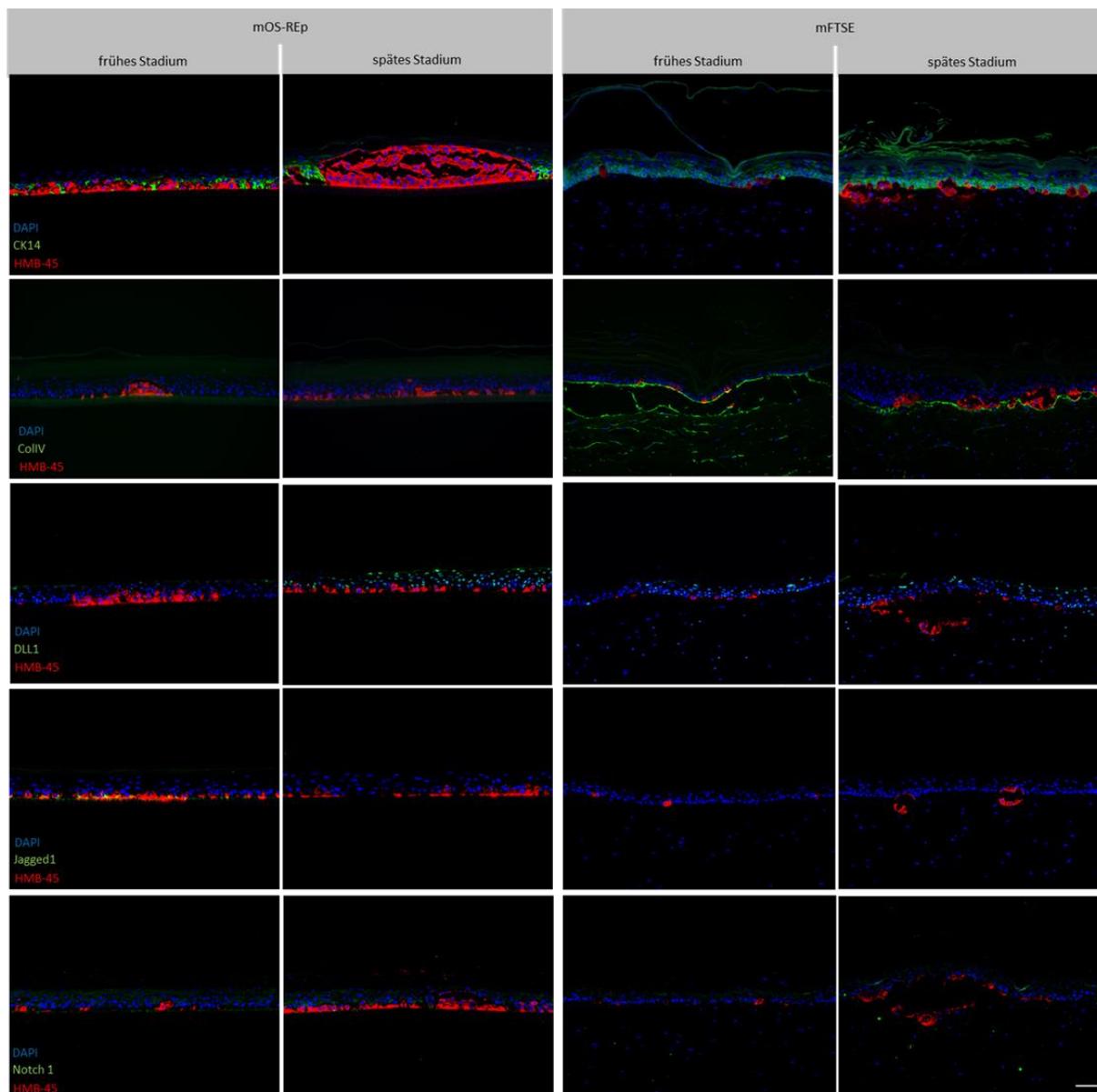


Abbildung 4-7: **Interaktion des Melanoms mit der Mikroumgebung im in vitro Modell.** Immunfluoreszenzfärbung von Querschnitten von epidermalen (linke Spalten) und dermal-epidermalen Melanom-Hautmodellen (rechte Spalten) beider Tumorstadien an d21 für den Keratinozytenmarker Cytokeratin 14 (CK14, grün), den Basalmembranmarker KollagenIV (ColIV, grün), die Notch-Liganden DLL1 (grün) und Jagged1 (grün), sowie den Notch-Rezeptor Notch 1 (grün), jeweils in Kombination mit dem Melanommarker HMB-45 (rot). Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm .

Da das extrazellulär exprimierte Protein MIA als klinischer Marker zur Verlaufskontrolle bei Patient:innen mit malignem Melanom verwendet wird und mit der Malignität, der Stärke des invasiven Phänotyps und der Metastasierung korreliert, wurde das Expressionsprofil von MIA im *in vitro* Modell analysiert. Eine immunhistochemische Färbung von Querschnitten von epidermalen und dermal-epidermalen Melanom-Hautmodellen beider Tumorstadien zeigte eine Braun-Färbung in den Melanom-Clustern (*Abbildung 4-8 I*). Um eine spezifischere Aussage treffen zu können, wurde analog zur routinemäßigen Bestimmung des MIA-Serumspiegels in der Klinik ein ELISA durchgeführt. Was die Menge an MIA betrifft, so wurde bei den beiden Tumorstadien ein konträres Expressionsprofil in Bezug auf die verschiedenen Kulturbedingungen beobachtet. Während mOS-REp^{frühes Stadium} eine nahezu 2.2-fache Steigerung von MIA (d7=5,7 pg/mL, d8=12,4 pg/mL) zeigte, wurde bei mOS-REp^{spätes Stadium} ein Abfall um 7,6 pg/mL von 11,7 pg/mL an d7 auf 4,1 pg/mL an d14 offenbar (*Abbildung 4-8 II*).

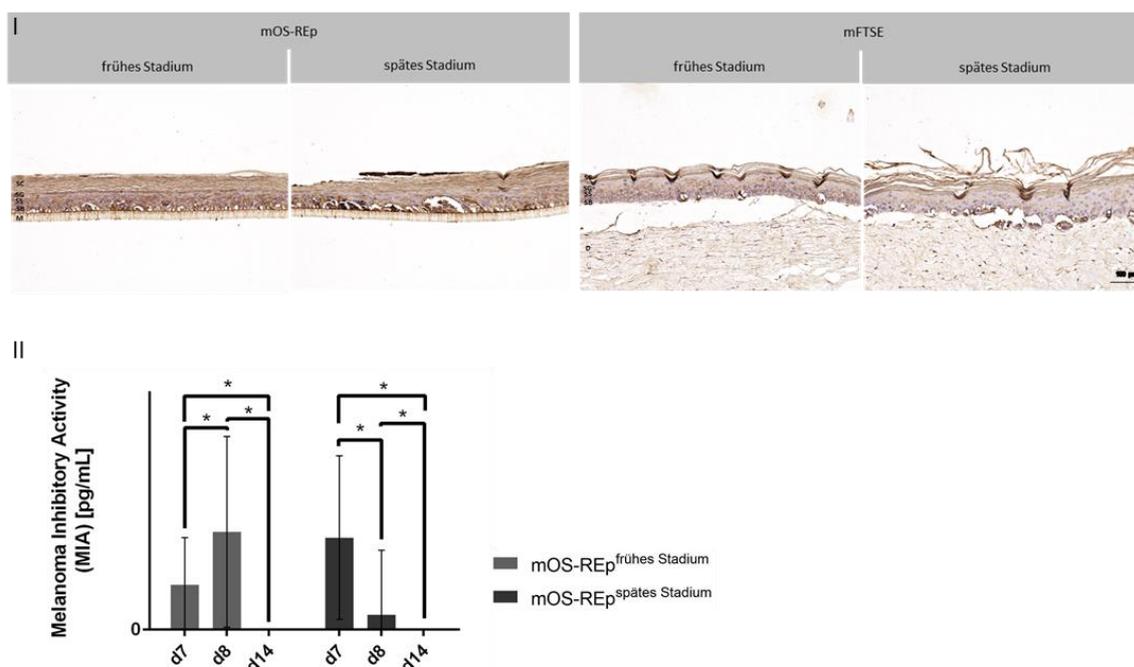


Abbildung 4-8: Expressionsprofil von Melanoma Inhibitory Activity (MIA) im in vitro Melanom-Modell. (I) Immunhistochemische Färbung (DAB, braun) von Querschnitten von epidermalen (linke Spalten) und dermal-epidermalen Melanom-Hautmodellen (rechte Spalten) beider Tumorstadien an d21 für MIA. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran, D=Dermis. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. (II) Bestimmung der MIA-Konzentration mittels ELISA. Diese wurde im Überstand biologischer Duplikate zu definierten Zeitpunkten (d7, d8, d14 nach ALI) während der gesamten Kulturdauer bestimmt (n=1). Für II wurde der Student's t-Test angewendet, der signifikante Unterschiede zeigte, $p < 0,001$ ().*

Da EMT, gekennzeichnet durch eine Hochregulierung von N-Cadherin, gefolgt von der Herunterregulierung von E-Cadherin, bei der Tumorentstehung durch Förderung der Metastasierung und Chemoresistenz eine zentrale Rolle spielt, wurde eine IF von

Querschnitten epidermaler und dermal-epidermaler in vitro Melanom-Hautmodelle für die Cadherin-Marker E-Cadherin und N-Cadherin in Kombination mit dem Melanommarker HMB-45 durchgeführt. In allen Melanom-Gewebe-Äquivalenten ermöglichte ein starkes positives HMB-45-Signal eine klare Abgrenzung der Tumornester vom umgebenden gesunden Gewebe. E-Cadherin-positive Zellen konnten in mOS-Rep und mFTSE beider Stadien außerhalb des Tumorclusters im gesunden Gewebe detektiert werden; im Melanomnest waren keine E-Cadherin-positiven Zellen sichtbar. Im Gegensatz dazu konnten N-Cadherin-positive Zellen in mOS-Rep und mFTSE beider Stadien im Tumorcluster detektiert werden; im gesunden Gewebe waren wenig N-Cadherin-positive Zellen sichtbar. Dies war im mOS-Rep deutlicher ausgeprägt als im mFTSE. Sowohl für N-, als auch E-Cadherin war die Intensität der Färbung im späten Stadium höher (Abbildung 4- 9).

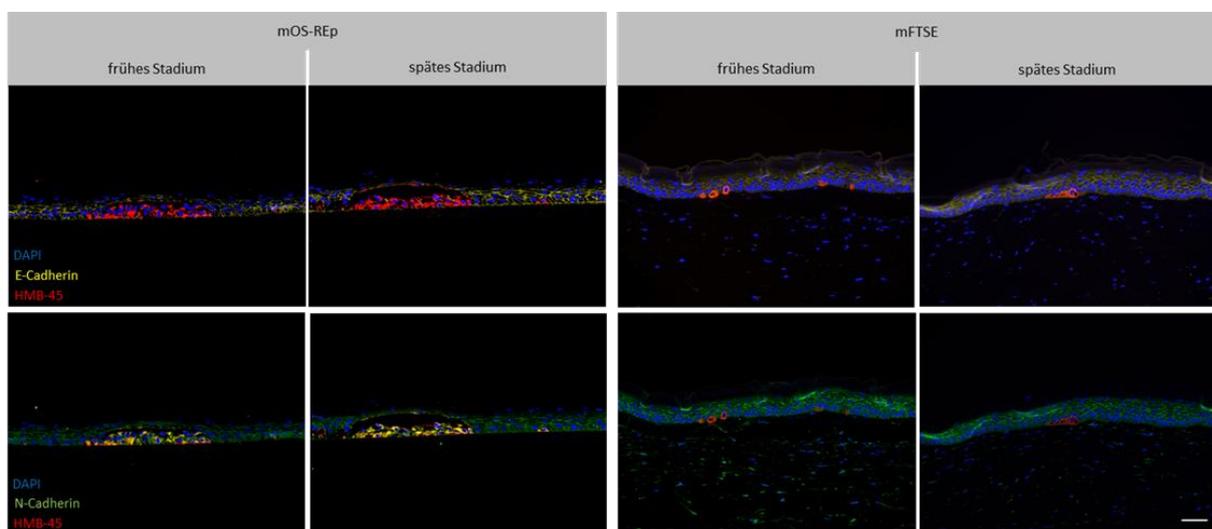


Abbildung 4- 9: **Cadherin-Expression im in vitro Melanom-Modell.** Immunfluoreszenzfärbung von Querschnitten von epidermalen (linke Spalten) und epidermal-dermalen Melanom-Hautmodellen (rechte Spalten) beider Tumorstadien an d21 für die Cadherin-Marker E-Cadherin (gelb) und N-Cadherin (grün) in Kombination mit dem Melanommarker HMB-45 (rot). Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm .

4.1.5. Etablierung und Charakterisierung dermal-epidermaler Melanom-Modelle auf Basis vollsynthetischer PA6-Fasern

Ohne die Verwendung von tierischen Matrixbestandteilen wurde zur Generierung dermal-epidermaler Melanom-Modelle (mFTSE^{PA6}; melanoma full thickness skin equivalent on PA6 basis) unterschiedlicher Stadien der Tumor-Entwicklung auf Basis vollsynthetischer PA6-Fasern zunächst durch in elektrogenespinnene Fasern eingebettete hdFs eine dermale Komponente hergestellt. Auf diese wurden nach zwei Wochen submers-Kultur Keratinozyten alleine oder zusammen mit Melanomzellen in Einzelsuspension in einem vordefinierten Verhältnis ausgesät (Abbildung 4-10 A). Die Etablierung erfolgte analog zu der dermal-

epidermalen Modelle auf Kollagen-Hydrogel-Basis (s. 4.1.2). Bei FTSE^{PA6} (full thickness skin equivalent on PA6 basis) wurde eine homogene, unpigmentierte, glatte Modelloberfläche beobachtet. In mFTSE^{PA6} erscheinen nach 21 Tagen Kulturzeit gebildete Mikrotumore der Zelllinie MUG-Mel2 makroskopisch als dunkle Flecken im Modell. Zudem weisen sie sichtbare pigmentierte Melanomcluster auf, die über das gesamte Modell verteilt sind, und eine raue und unebene Modelloberfläche (*Abbildung 4-10 B*). Für einen morphologischen Überblick wurden Querschnitte von FTSE^{PA6}, mFTSE^{PA6}, sowie in situ malignen Melanomen Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die erfolgreiche Entwicklung humaner dermal-epidermalen Melanom-Modelle war histologisch durch die Ausbildung von Melanomclustern an der dermoepidermalen Junctionszone, die Ausbildung einer dermalen Komponente, in der die Fibroblasten homogen im Hydrogel verteilt vorlagen, sowie die Bildung einer mehrschichtigen gut stratifizierten und differenzierten Epidermis, bestehend aus den vier charakteristischen Epidermisschichten Stratum Basale, Stratum Spinosum, Stratum Granulosum und Stratum Corneum gekennzeichnet. Alle in dieser Studie verwendeten Melanomzelllinien bildeten sich in Größe und Form unterscheidende Tumorcluster, die sich disaggregiert, zerklüftet und locker stochastisch über das gesamte Modell verteilten, sowie deutlich vom umgebenden gesunden Gewebe abgegrenzt waren (*Abbildung 4-10 C*). Zusätzlich wurde eine IF von mFTSE^{PA6} für den Keratinozytenmarker CK14 in Kombination mit dem Melanommarker HMB-45, den ECM-Marker Collagen I (Coll) und den Fibroblastenmarker Vimentin durchgeführt. Korrelierend zu den Beobachtungen in den mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Querschnitten konnten HMB-45-positive Zellen in Melanomclustern an der dermoepidermalen Junctionszone nachgewiesen werden. Das CK-14-Signal unterstrich die differenzierungsspezifische Verteilung dieses Proteins in den entsprechenden Strata. Ein starkes Vimentin-Signal bewies die homogene Verteilung der hF's in der dermalen Komponente des Modells. Zudem ließ die Färbung gegen Coll den Rückschluss zu, dass ein dichtes Netz aus neu synthetisierter ECM auf dem gesamten 3D-Fasergerüst gebildet worden war (*Abbildung 4-10 D*). Das FTSE^{PA6} wurde als Teil dieses Papers "Fully Synthetic 3D Fibrous Scaffolds for Stromal Tissues - Replacement of Animal-Derived Scaffold Materials Demonstrated by Multilayered Skin" kürzlich veröffentlicht [119].

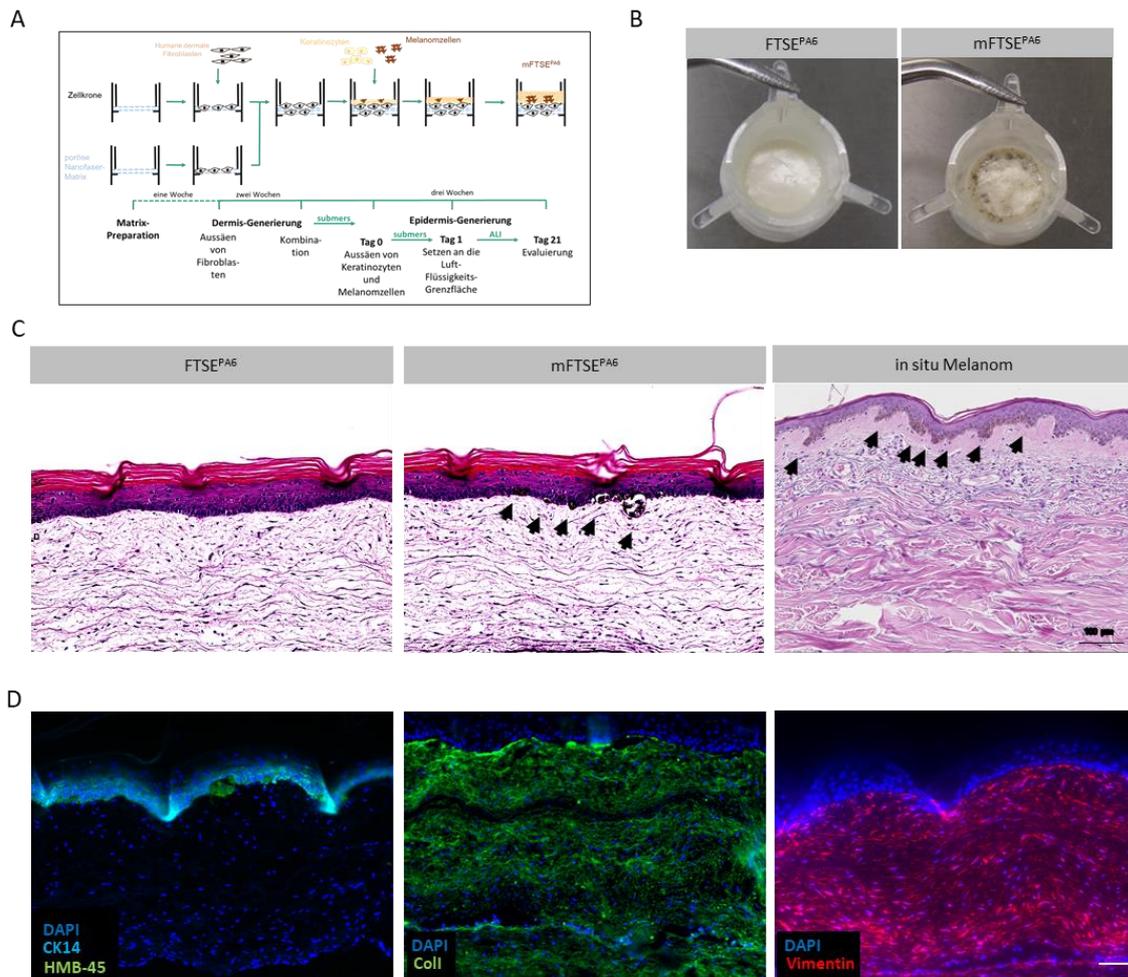


Abbildung 4-10: **Herstellung und Charakterisierung dermal-epidermaler Melanom-Äquivalente auf Basis vollsynthetischer PA6-Fasern.** (A) Schematische Darstellung der Modell-Generierung von (m)FTSE^{PA6} ((melanoma) full thickness skin equivalent on PA6 basis). Die *in vitro* Vollhaut-Modelle verfügen über eine dermale Komponente, welche aus in elektrogenesponnene Fasern eingebetteten humanen dermalen Fibroblasten besteht; auf die dermale Komponente wurden hEK bzw. hEK und Melanomzellen in definierten Mischverhältnissen ausgesät, an Tag 1 die Modelle an die Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche (Air-Liquid-Interface, ALI) gesetzt und für 21 Tage kultiviert. (B) Makroskopische Bilder von FTSE^{PA6} (links) und mFTSE^{PA6} (rechts). Gebildete Mikrotumore der Zelllinie MUG-Mel2 erscheinen im Modell als dunkle Flecken. (C) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von epidermal-dermalen gesunden Hautäquivalenten und Melanom-Vollhautmodellen auf Basis der elektrogenesponnenen PA6-Fasern, sowie eines *in situ* Melanoms. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, D = Dermis. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. (E) Immunfluoreszenzfärbung von mFTSE^{PA6} für den Keratinozytenmarker Cytokeratin 14 (CK14, türkis) in Kombination mit dem Melanommarker HMB-45 (grün), den Extrazellulär-Matrix (ECM)-Marker Collagen I (Coll, grün) und den Fibroblastenmarker Vimentin (rot). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

4.2. Implementierung nicht-invasiver Monitoring-Methoden

Zur nicht-invasiven Detektion der Tumor-Formierung, des Therapie-Verlaufes sowie der Evaluierung des Tumor-Metabolismus, wurden drei neue technische Analyse-Verfahren implementiert: MediTOM (s. 4.2.1), Optische Kohärenz-Tomographie (s. 4.2.2), sowie Zwei-Photonen Fluoreszenz-Lifetime-Imaging-Mikroskopie (s. 4.2.3).

4.2.1. Detektion der Tumorpro- und –regression mittels MediTOM

Zur zerstörungsfreien Detektion der Tumorpro- und –regression im epidermalen in vitro Melanom-Modell, wurde das optische Messsystem „MediTOM“ verwendet. Dieses erlaubt die Analyse pigmentierter in-vitro Modelle des malignen Melanoms automatisiert mittels Durchlicht im Schattenwurfverfahren, sowie die digitalisierte Erfassung von Veränderungen an den Zellen (*Abbildung 4-11 A*). In der histologischen Hämatoxylin und Eosin-Übersichtsfärbung eines epidermalen in vitro Melanom-Modells ist im Querschnitt ein deutlich vom umgebenden gesunden Gewebe abgegrenztes Melanomzellcluster im Stratum Basale einer mehrschichtigen gut stratifizierten und differenzierten Epidermis sichtbar. Im dargestellten MediTOM-Bild erfolgte die Detektion des pigmentierten Melanoms mittels Schattenwurfverfahrens und erlaubte das Monitoring aller Melanomcluster im gesamten Modell (*Abbildung 4-11 B*). Zudem ermöglichte das MediTOM eine Differenzierung zwischen gesundem und krankem Stadium, sowie eine Detektion der Tumorprogression über die komplette Kulturdauer hinweg (*Abbildung 4-11 C I und II*).

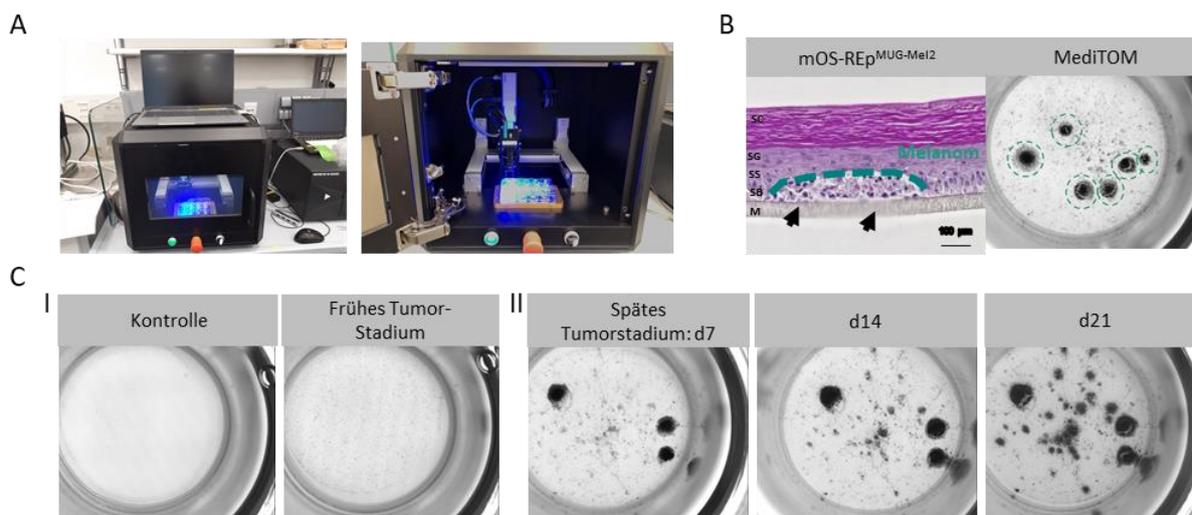


Abbildung 4-11: **Zerstörungsfreie und voll-automatische Detektion der Tumorpro- und -regression im epidermalen in vitro Melanom-Modell.** (A) Das optische Messsystem „MediTOM“ erlaubt die Analyse der in-vitro Modelle des malignen Melanoms automatisiert mittels Durchlicht im Schattenwurfverfahren und die digitalisierte Erfassung von Veränderungen an den Zellen. (B) Histologische Hämatoxylin- und Eosin-Übersichtsfärbung eines epidermalen in vitro Melanom-Modells und Detektion des Melanoms mittels Schattenwurfverfahrens. Melanome sind grün umrandet und sowohl in der histologischen Färbung (links) als auch in dem MediTOM -Bild (rechts) sichtbar. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. (C) Nicht-invasive Detektion des Tumor-Fortschreitens im in vitro Melanom-Modell mittels Schattenwurfverfahrens. Das Medi-TOM erlaubt eine Differenzierung zwischen gesundem (links) und krankem Stadium (rechts) (I+II) sowie eine Detektion der Tumorprogression über die komplette Kulturdauer hinweg (II). Während 21 Tagen Kulturdauer wurden zu definierten Zeitpunkten (d7, d14, d21) Durchlicht-Aufnahmen von Melanom-Modellen des späten Tumorstadiums aufgenommen.

Um der Frage auf den Grund zu gehen, ob aus jeder in das in vitro Modell eingebrachten Melanomzelle ein Mikrotumor entsteht bzw. was die Minimalzahl einzubringender Melanomzellen ist, erfolgte die Detektion der Melanomprogression in epidermalen Melanom-Modellen unterschiedlicher Aussaatverhältnisse zu definierten Zeitpunkten (d3, d7, d9, d11, d15, d18 und d21) während der 21-tägigen Kulturdauer. Aussaatverhältnisse von Melanomzelle:hEK variierten dabei von den standardmäßigen 1:100, über 1:1000, 1:10000 bis hin zu 1:50000. Bei einem Verhältnis von 1:50000 konnten keine und bei 1:10000 ab d18 vereinzelte Tumornester detektiert werden. Bei 500 (1:1000) ausgesäten Melanomzellen war ab d11 das Detektieren von einzelnen Mikrotumoren möglich. Bei den standardmäßig verwendeten 5000 (1:100) ausgesäten Melanomzellen war ab d7 eine stochastisch verteilte Ausbildung von Melanomnestern über das gesamte Modell zu beobachten. Insgesamt führten suboptimale Verhältnisse zu einem unphysiologischen Wachstum der Tumore, einem Überwuchern der Modelle durch das Melanom bzw. einer erschwerten Detektion von Mikrotumoren im Modell (Abbildung 4-12).

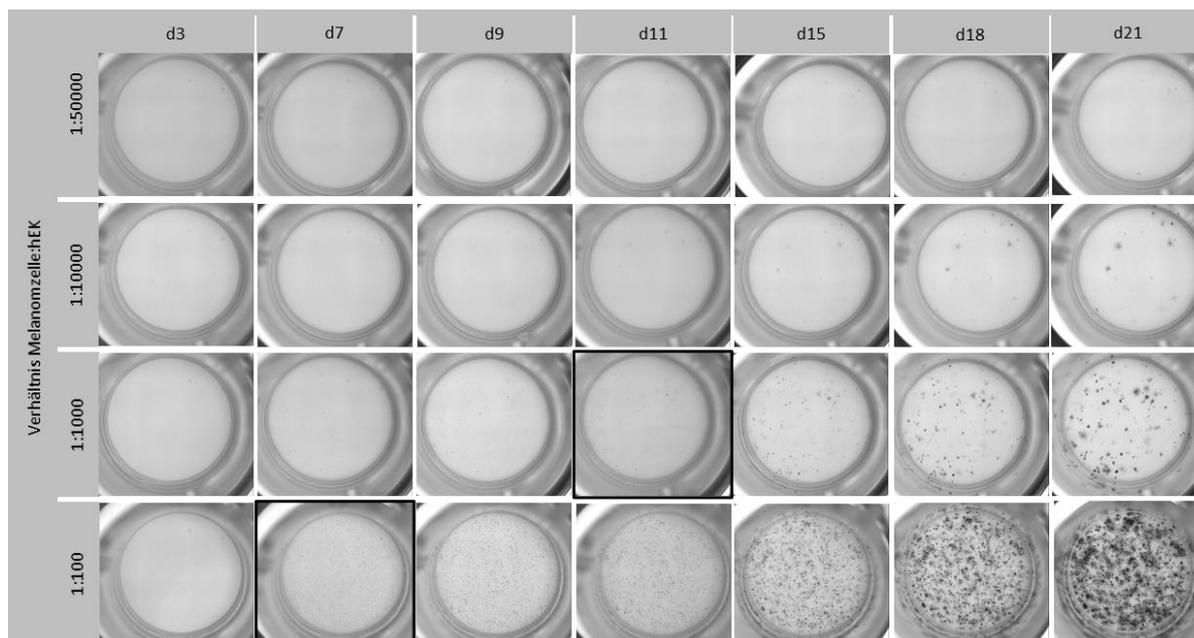


Abbildung 4-12: **Nicht-invasive voll-automatische Detektion der Melanomprogression in epidermalen Melanom-Modellen unterschiedlicher Aussaatverhältnisse.** Während 21 Tagen Kulturdauer wurden zu definierten Zeitpunkten (d3, d7, d9, d11, d15, d18 und d21) Bilder mit dem intern entwickelten MediTOM-Gerät aufgenommen.

4.2.2. Detektion nicht-pigmentierter Melanome mittels Optischer Kohärenz-Tomographie

Um auch die Pro- und Regression nicht-pigmentierter Melanome in den organotypischen Melanom-Modellen zerstörungsfrei beobachten zu können, wurde die Optische Kohärenz-Tomographie (optical coherence tomography, OCT) in das bestehende Methoden-Spektrum implementiert. Dieses Analyse-Verfahren ermöglicht eine tomografische Aufnahme bzw. Querschnitt des gesamten epidermalen und dermal-epidermalen in vitro Melanom-Modells. In der histologischen Hämatoxylin und Eosin-Übersichtsfärbung eines OS-REp ist im Querschnitt eine mehrschichtige, gut stratifizierte und differenzierte Epidermis bestehend aus den vier charakteristischen Epidermisschichten Stratum Basale, Stratum Spinosum, Stratum Granulosum und Stratum Corneum sichtbar. Im dargestellten OCT-Bild erfolgte die tomografische Aufnahme des gesamten epidermalen Modells und ermöglichte die zerstörungsfreie Darstellung der vier Strata (Abbildung 4-13 A I). Im Gegensatz dazu ist in der histologischen Hämatoxylin und Eosin-Übersichtsfärbung eines mOS-REp^{SK-MEL-28} im Querschnitt ein deutlich vom umgebenden gesunden Gewebe abgegrenztes Melanomzellcluster im Stratum Basale einer mehrschichtigen gut stratifizierten und differenzierten Epidermis sichtbar. Ebensolches ist auch im zerstörungsfrei aufgenommenen OCT-Bild erkennbar (Abbildung 4-13 A II). In der histologischen Hämatoxylin und Eosin-

Übersichtsfärbung eines FTSE ist im Querschnitt histologisch die Ausbildung einer dermalen Komponente, in der die Fibroblasten homogen im Hydrogel verteilt vorliegen und die Bildung einer mehrschichtigen gut stratifizierten und differenzierten Epidermis, bestehend aus den vier charakteristischen Epidermisschichten Stratum Basale, Stratum Spinosum, Stratum Granulosum und Stratum Corneum dargestellt. Im gezeigten OCT-Bild erfolgte die tomografische Aufnahme des gesamten Vollhautmodells und ermöglichte die Darstellung der epidermalen und dermalen Komponente zerstörungsfrei (*Abbildung 4-13 B I*). Im Querschnitt einer histologischen Hämatoxylin und Eosin-Übersichtsfärbung eines mFTSE^{SK-MEL-28} ist histologisch die Ausbildung von Melanomclustern an der dermoepidermalen Junctionszone, die Ausbildung einer dermalen Komponente, in der die Fibroblasten homogen im Hydrogel verteilt vorlagen, sowie die Bildung einer mehrschichtigen gut stratifizierten und differenzierten Epidermis, bestehend aus den vier charakteristischen Epidermisschichten Stratum Basale, Stratum Spinosum, Stratum Granulosum und Stratum Corneum dargestellt. Im gezeigten OCT-Bild erfolgte die tomografische Aufnahme des gesamten dermal-epidermalen Haut-Modells und ermöglichte die Darstellung der epidermalen und dermalen Komponente, sowie die dermoepidermale Lokalisation der Melanomcluster zerstörungsfrei (*Abbildung 4-13 B II*).

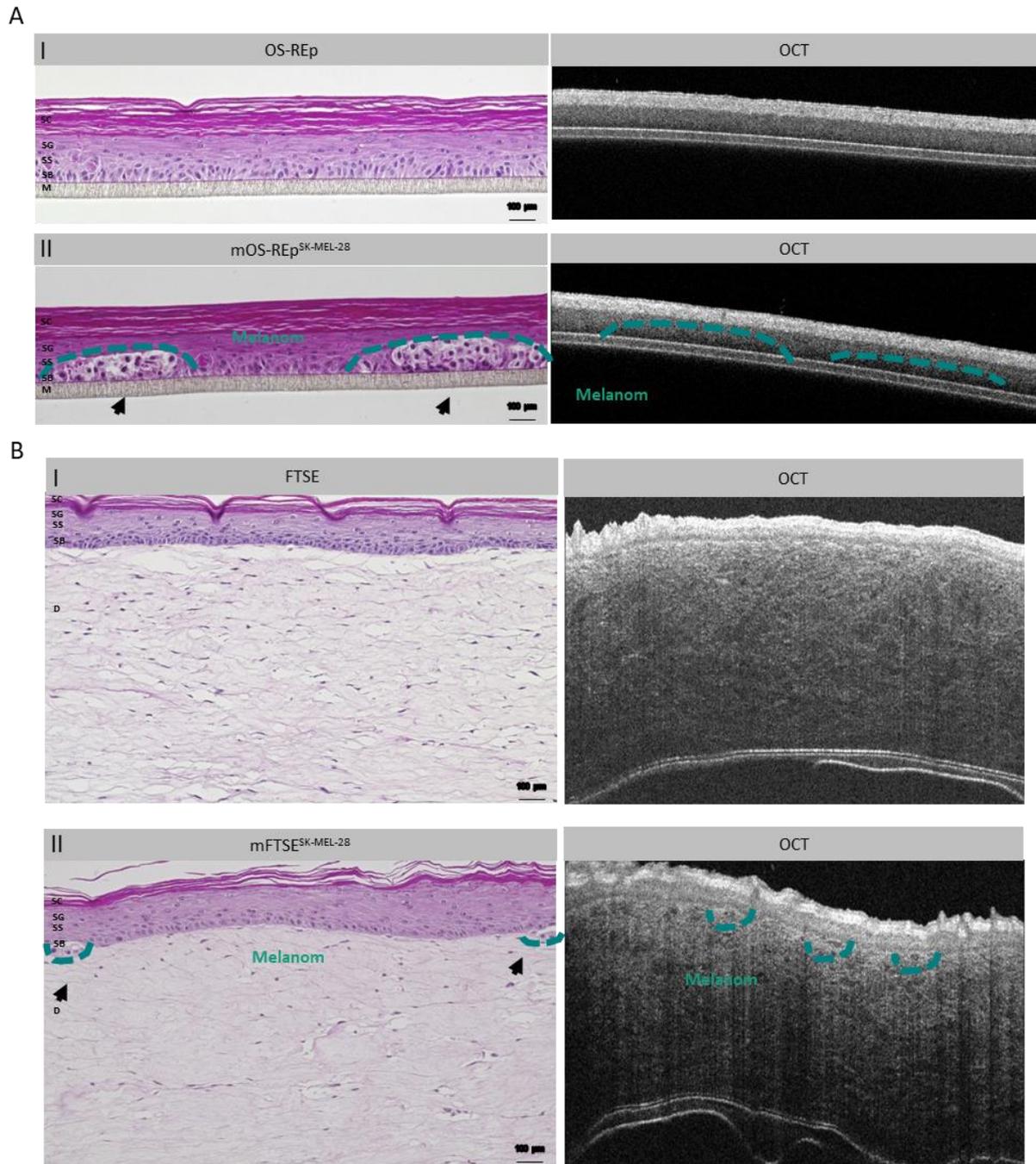


Abbildung 4-13: **Zerstörungsfreie Detektion des Tumorwachstums nicht-pigmentierter Melanome im epidermalen und dermal-epidermalen in vitro Melanom-Modell mittels Optischer Kohärenz-Tomographie.** (A) Histologische Hämatoxylin- und Eosin-Übersichtsfärbung eines epidermalen Haut-Modells (I) und in vitro Melanom-Modells (II) und tomografische Aufnahme/Querschnitt des gesamten epidermalen Modells. Melanome sind grün umrandet und sowohl in der histologischen Färbung (links) als auch in dem OCT -Bild (rechts) sichtbar. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm . (B) Histologische Hämatoxylin- und Eosin-Übersichtsfärbung eines dermal-epidermalen Haut-Modells (I) und in vitro Melanom-Modells (II) und tomografische Aufnahme/Querschnitt des gesamten Modells. Melanome sind grün umrandet und sowohl in der histologischen Färbung (links) als auch in dem OCT -Bild (rechts) sichtbar. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, D = Dermis. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm .

4.2.3. Ortsaufgelöste Messung des Zell- und Tumor-Metabolismus mittels Zwei-Photonen Fluoreszenz-Lifetime-Imaging-Mikroskopie

Zwei-Photonen Fluoreszenz-Lifetime-Imaging-Mikroskopie (2-P-FLIM) ist ein nicht-invasives Verfahren zur Bildgebung des Stoffwechsels, das den zellulären Stoffwechsel in Echtzeit untersucht [128, 126], bei dem sowohl die Messungen als auch die Auswertung und Berechnung der gewonnenen Daten durch Michael G. Monaghan und Nuno G. B. Neto erfolgte und welche gemeinsam veröffentlicht wurden [123]. 2-P-FLIM misst den Fluoreszenzabfall und die Intensität von zwei Stoffwechsel-Cofaktoren: NAD(P)H und FAD⁺. In unseren Ergebnissen haben wir die durchschnittliche Fluoreszenzlebensdauer (τ_{avg}) von NAD(P)H und das optische Redoxverhältnis (ORR) berechnet [133, 134]. Es zeigte sich, dass diese Werte direkt mit der zellulären Stoffwechselaktivität korrelieren, wobei eine Abnahme von τ_{avg} mit einer Zunahme der Glykolyse und eine Verringerung von ORR mit einer höheren Stoffwechselaktivität verbunden ist [135–137]. Hierzu wurden sowohl NAD(P)H- als auch FAD⁺-Bilder im selben Sichtfeld aufgenommen und zwei Regionen von Interesse (ROI) gewählt, die zwischen Keratinozyten und Melanomzellen getrennt waren (*Abbildung 4-14 A, B*). Für τ_{avg} wurde ein statistisch signifikanter Unterschied in mOS-REp^{SK-MEL-28} und mOS-REp^{A11} festgestellt, wenn beide Zelltypen verglichen wurden (*Abbildung 4-14 C*). Für die mOS-REp^{SK-MEL-28} weisen die Keratinozyten einen Wert von $1,522 \pm 0,025$ ns auf, während die Melanomzellen eine Verringerung ihres τ_{avg} auf $1,436 \pm 0,019$ ns aufweisen. Für das mOS-REp^{A11} beträgt das τ_{avg} der Keratinozyten $1,572 \pm 0,046$ und das der Melanomzellen $1,462 \pm 0,025$ ns. Bei der Berechnung der ORR wurde ein ähnlicher Trend festgestellt (*Abbildung 4-14 D*). Die Keratinozyten des mOS-REp^{SK-MEL-28}-Modells weisen einen Wert von $0,694 \pm 0,007$ auf, und ein statistisch signifikanter Unterschied wurde beim Vergleich mit den Melanomzellen ($0,69 \pm 0,009$) entdeckt. Beim mOS-REp^{A11}-Modell wurde ein statistisch signifikanter Unterschied beim Vergleich zwischen den Keratinozyten mit $0,698 \pm 0,004$ und den Melanomzellen mit $0,693 \pm 0,004$ bestätigt.

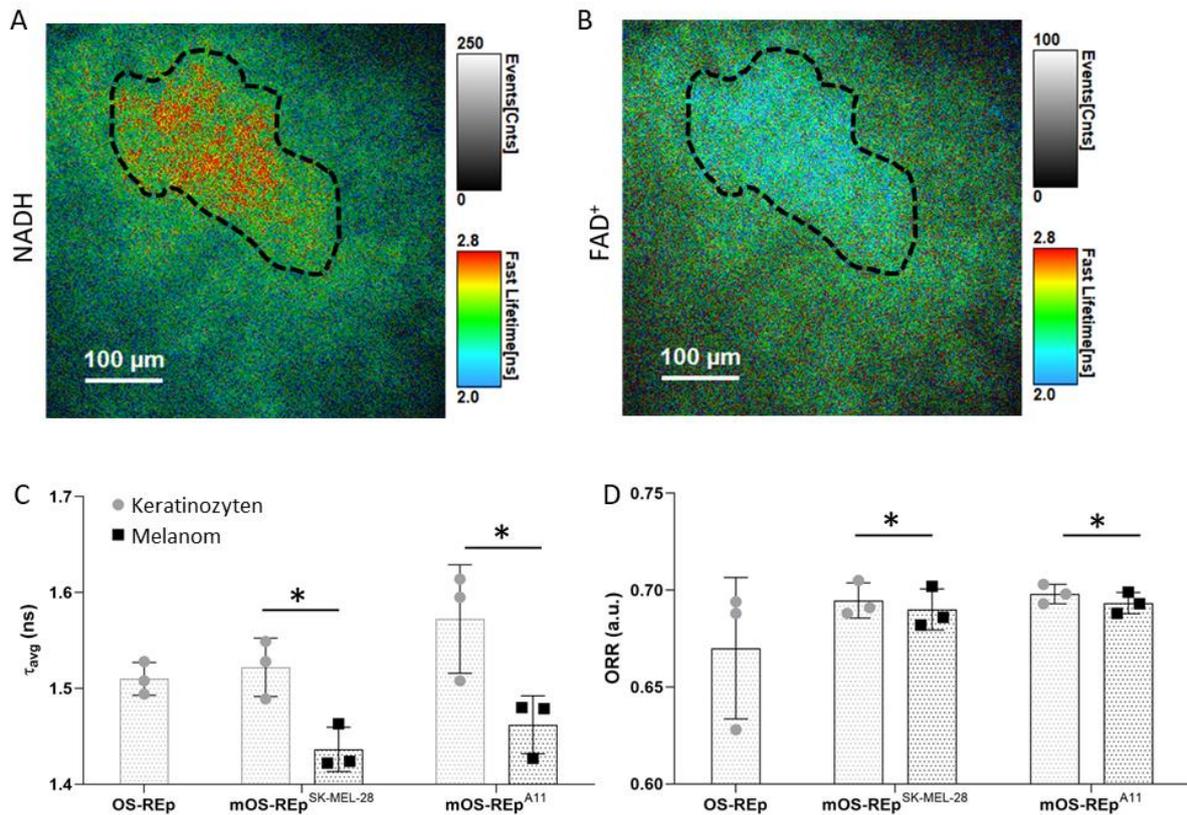


Abbildung 4-14: **Zwei-Photonen Fluoreszenz-Lifetime-Imaging-Mikroskopie (2-P FLIM) der NAD(P)H und FAD⁺ Analyse.** (A, B) Repräsentative NAD(P)H und FAD⁺ Bilder von mOS-Rep^{A11}. (C, D) Berechnete durchschnittliche Fluoreszenz-Lebensdauer (average fluorescence lifetime; τ_{avg}) von NAD(P)H und optisches Redoxverhältnis (ORR) für OS-Rep, mOS-Rep^{SK-MEL-28} und mOS-Rep^{A11}. Abgeändert und integriert nach schriftlicher Zustimmung des Journals [123].

4.3. Anwendung organotypischer Modelle des malignen Melanoms als präklinische Testsysteme zur Wirksamkeits-Testung von anti-Tumor Therapeutika

Um die Anwendbarkeit der etablierten Modelle des malignen Melanoms als präklinische Testsysteme für die Bewertung der Wirksamkeit von anti-Tumor Therapeutika zu bewerten, wurden diese zunächst über etablierte anti-Tumor Therapeutika (BRAF-/MEK-Inhibitoren) evaluiert (s. 4.3.1) und in der präklinischen Therapieentwicklung (Peptid RDP22) validiert (s. 4.3.2).

4.3.1. Zielgerichtete medikamentöse Behandlung des malignen Melanoms

Um mOS-Rep als präklinisches Testsystem für zielgerichtete medikamentöse Melanomtherapien zu etablieren, wurde in der von mir konzipierten und betreuten Masterarbeit von Franziska Benz ein hoch standardisiertes Behandlungsprotokoll und eine Auswahl

potenzieller Analysemethoden für die Bewertung der therapeutischen Effekte entwickelt und zunächst in 2D evaluiert (s. 4.3.1.1), bevor beides in 3D übertragen und untersucht wurde (s. 4.3.1.2). Die Therapeutika Vemurafenib, ein selektiver BRAF^{V600E}-Inhibitor und Cobimetinib, ein häufig verwendeter MEK-Inhibitor, wurden ausgewählt, da sie für die Behandlung des malignen Melanoms zugelassen sind und in der Klinik häufig eingesetzt werden.

4.3.1.1. Zielgerichtete medikamentöse Behandlung von Melanomzellen

Zur Entwicklung eines Behandlungsprotokolls wurden hEK, SK-MEL-28 und MeWo in Zellkulturplatten mit einer vorgegebenen Zelldichte ausgesät und 24 h lang unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Nach Anheften der Zellen, erfolgte eine systemische Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen von Vemurafenib, Cobimetinib und einer Kombination aus beiden, indem frisches Zellkulturmedium mit den jeweiligen Wirkstoffkonzentrationen appliziert wurde. Die Inkubationszeit betrug 24, 48 und 72 h mit einer wiederholten Verabreichung des Medikaments nach 48 Stunden. Zur Bewertung der Behandlungseffekte wurde eine MTT-basierte Bestimmung der Viabilität, eine Analyse des Glukoseverbrauchs und eine morphologische Inspektion der Zellen durch Phasenkontrastmikroskopie durchgeführt (*Abbildung 4-15 A*).

Die Wirkstoffkonzentrationen der Vemurafenib-Monotherapie von 1 μ M, 3 μ M und 5 μ M wurden für Behandlungszeiträume von 24, 48 und 72 h untersucht. Da für alle untersuchten Vemurafenib-Konzentrationen die ausgeprägteste therapeutische Wirkung nach 72 h Inkubation mit dem Wirkstoff beobachtet werden konnte, wurde nur diese Behandlungsdauer für die weitere Analyse ausgewählt und im Folgenden ausführlich dargestellt. Die Phasenkontrastmikroskopie von mit Vemurafenib behandeltem hEK und SK-MEL-28 zeigte eine signifikante Abnahme der Zelldichte mit zunehmender Wirkstoffkonzentration, während die der MeWo durch die Behandlung nicht beeinflusst zu werden schien. Darüber hinaus wurden signifikante Veränderungen in Form und Größe von mit Vemurafenib behandelten hEK- und SK-MEL-28-Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen beobachtet. MeWo-Zellen blieben jedoch von der Vemurafenib-Behandlung morphologisch unbeeinflusst (*Abbildung 4-15 B I*). Die Bestimmung der Viabilität von mit Vemurafenib behandelten Zellen ergab eine deutlich verringerte Viabilität von hEK und SK-MEL-28, während die von MeWo durch die Behandlung mit dem Medikament nicht beeinträchtigt wurde. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle reduzierte die Behandlung von hEK mit 1 μ M Vemurafenib die Lebensfähigkeit der Zellen auf 33 %. Die Viabilität von hEK wurde weiter auf 19 % bzw. 6 % verringert, wenn die Vemurafenib-Konzentration auf 3 μ M oder 5 μ M erhöht wurde. Ähnliches konnte bei mit Vemurafenib behandeltem SK-MEL-28 beobachtet werden. Hier führte die

Anwendung von 1 μM Vemurafenib zu einer Verringerung der Zell-Viabilität auf 29 %, während Konzentrationen von 3 μM und 5 μM einen weiteren Rückgang auf 22 % bzw. 19 % bewirkten. Im Gegensatz dazu wiesen MeWo, die mit 1 μM , 3 μM oder 5 μM Vemurafenib behandelt wurden, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen Viabilitätswerte von mehr als 100 % auf (*Abbildung 4-15 B II*). Außerdem wurde bei der Analyse des Glukosestoffwechsels eine deutliche Verringerung des Glukoseverbrauchs in hEK und SK-MEL-28 nach der Behandlung mit Vemurafenib festgestellt. Im Einzelnen sank der Glukoseverbrauch von hEK, das mit 1 μM Vemurafenib behandelt wurde, im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen um mehr als 70 %. Die Anwendung von Vemurafenib in höheren Konzentrationen reduzierte den Glukoseverbrauch weiter auf 15 % (3 μM) bzw. 9 % (5 μM) im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei SK-MEL-28 konnte bei der Behandlung mit 1 μM Vemurafenib eine Verringerung des Glukosestoffwechsels um 65 % beobachtet werden. Konzentrationen von 3 μM und 5 μM verringerten den Glukoseverbrauch von SK-MEL-28 um 75 % bzw. 88 %. Auch bei MeWo, das mit 1 μM , 3 μM und 5 μM Vemurafenib behandelt wurde, konnte eine Verringerung des Glukoseverbrauchs beobachtet werden, allerdings waren diese metabolischen Veränderungen äußerst gering (*Abbildung 4-15 B III*).

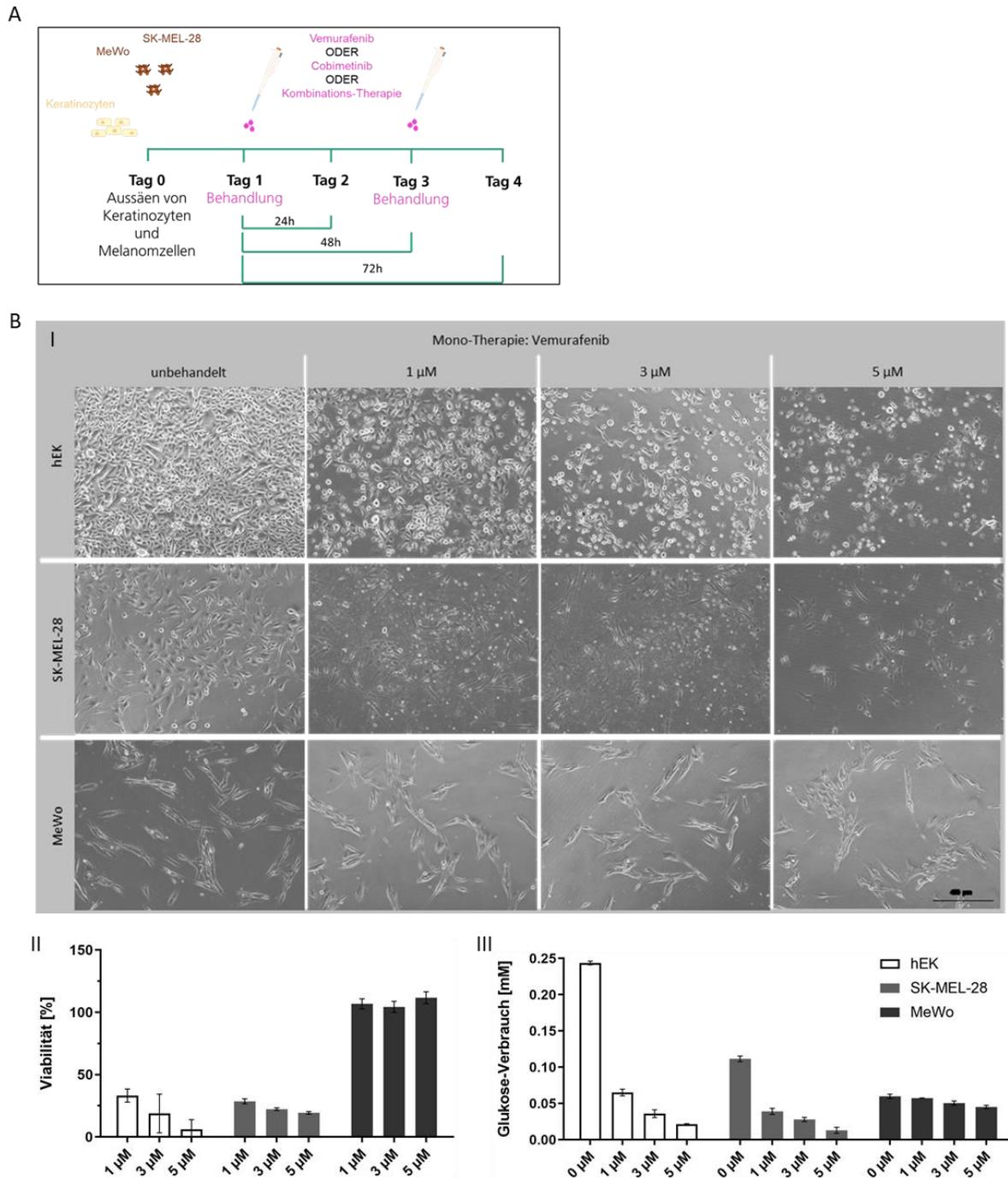


Abbildung 4-15: **Zielgerichtete medikamentöse Melanom-Behandlung in 2D.** (A) Experimenteller Aufbau der zielgerichteten Melanomtherapie in 2D. HEK, SK-MEL-28 und MeWo wurden in Zellkulturplatten ausgesät (Tag 0) und für 24 h unter Standardkulturbedingungen inkubiert, bevor Vemurafenib, Cobimetinib oder eine Kombination aus beiden in unterschiedlichen Konzentrationen systemisch appliziert wurden (Tag 1). Nach Inkubationszeiten von 24 h (Tag 2), 48 h (Tag 3) oder 72 h (Tag 4) mit wiederholter Arzneimittelapplikation nach 48 h (Tag 3) wurden die Behandlungseffekte analysiert. (B) Zielgerichtete Mono-Therapie mit Vemurafenib für 72 h. (I) Phasenkontrastmikroskopie von hEK, SK-MEL-28 und MeWo, die 72 Stunden lang mit Vemurafenib (unbehandelt, 1 μM , 3 μM und 5 μM) behandelt wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 450 μm . (II) Viabilität der behandelten Zellen nach 72 h Arzneimittelinkubation. Die Viabilität wurde aus biologischen Triplikaten mit jeweils technischen Duplikaten bestimmt und auf unbehandelte Kontrollen ($n=1$) normiert. (III) Glukoseverbrauch behandelter Zellen nach 72 h Arzneimittelinkubation. Der Glukoseverbrauch wurde aus biologischen Triplikaten ($n = 1$) bestimmt.

Zudem wurde eine Monotherapie mit Cobimetinib mit Wirkstoffkonzentrationen von 50 nM, 100 nM und 500 nM über 24, 48 und 72 h durchgeführt (*Abbildung 4-15 A*). Da die ausgeprägteste therapeutische Wirkung aller untersuchten Cobimetinib-Konzentrationen nach 72 h der Behandlung beobachtet wurde, werden im Folgenden lediglich diese Daten präsentiert und diskutiert. Die hEK- und SK-MEL-28-Zellen, die mit Cobimetinib behandelt wurden, zeigten laut Phasenkontrastmikroskopie eine signifikante Verringerung der Zellzahl mit zunehmender Wirkstoffkonzentration. Die Anzahl der MeWo-Zellen wurde jedoch offenbar nicht durch die Anwendung von Cobimetinib beeinflusst. Darüber hinaus wurden bei hEK und SK-MEL-28, die mit Cobimetinib behandelt wurden, aber nicht bei MeWo, eine Zunahme der Zellgröße und Veränderungen der Zellmorphologie festgestellt (*Abbildung 4-15 C I*). Bezüglich der Viabilität der mit Cobimetinib behandelten Zellen konnte gezeigt werden, dass die Anwendung von 50 nM Cobimetinib weder die Lebensfähigkeit von hEK noch von MeWo beeinträchtigte. Die Viabilität von SK-MEL-28, die mit der gleichen Wirkstoffkonzentration behandelt wurde, war jedoch um 83 % verringert. Außerdem führte die Behandlung von SK-MEL-28 mit 100 nM und 500 nM Cobimetinib zu einer Verringerung der Lebensfähigkeit der Zellen um 85 % bzw. 88 %. Obwohl gezeigt werden konnte, dass eine Konzentration von 50 nM Cobimetinib die Lebensfähigkeit von hEK nicht negativ beeinflusste, führte die Anwendung von 100 nM und 500 nM Cobimetinib zu einer Verringerung der Viabilitätswerte um 25 %. Im Gegensatz dazu zeigten MeWo, die mit 100 nM Cobimetinib behandelt wurden, eine Viabilität von mehr als 80 %, während die Anwendung von 500 nM zu einem Rückgang der Lebensfähigkeit um mehr als 50 % führte (*Abbildung 4-15 C II*). Im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen zeigte die Stoffwechselanalyse von hEK mit einer Cobimetinib-Konzentration von 50 nM einen signifikanten Rückgang des Glukoseverbrauchs um etwa 83 %. Darüber hinaus stoppten höhere Konzentrationen von Cobimetinib den Glukoseverbrauch dieser Zelltypen vollständig. Nach der Behandlung mit Cobimetinib wurde bei SK-MEL-28 und MeWo unabhängig von der verwendeten Wirkstoffkonzentration kein Glukoseverbrauch festgestellt (*Abbildung 4-15 C III*).

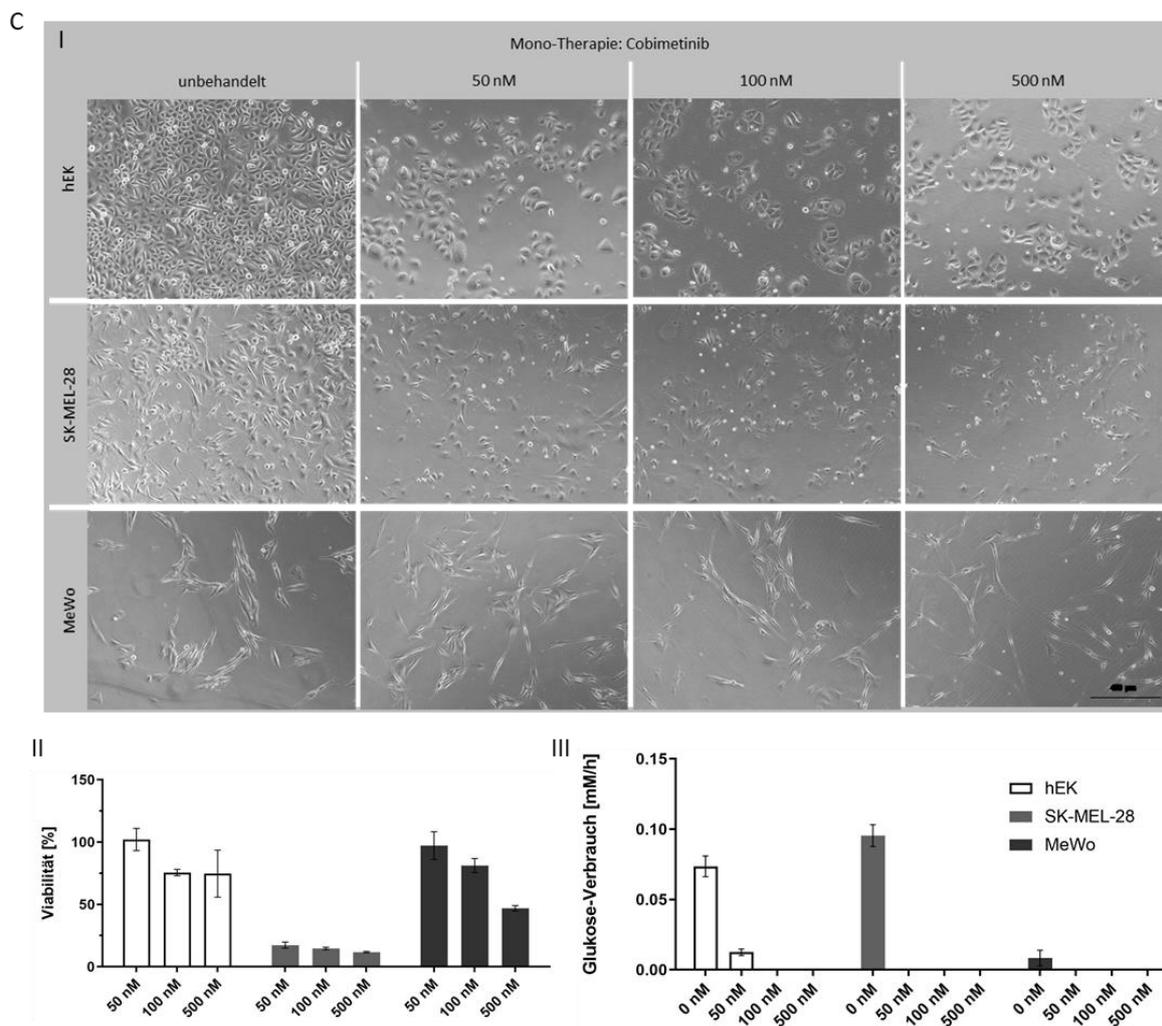


Abbildung 4-15: **Zielgerichtete medikamentöse Melanom-Behandlung in 2D.** (C) Zielgerichtete Mono-Therapie mit Cobimetinib für 72 h. (I) Phasenkontrastmikroskopie von hEK, SK-MEL-28 und MeWo, die 72 Stunden lang mit Cobimetinib (unbehandelt, 50 nM, 100 nM, and 500 nM) behandelt wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 450 μm . (II) Viabilität der behandelten Zellen nach 72 h Arzneimittelinkubation. Die Viabilität wurde aus biologischen Triplikaten mit jeweils technischen Duplikaten bestimmt und auf unbehandelte Kontrollen ($n=1$) normiert. (III) Glukoseverbrauch behandelter Zellen nach 72 h Arzneimittelinkubation. Der Glukoseverbrauch wurde aus biologischen Triplikaten ($n = 1$) bestimmt.

Im Anschluss an die Monotherapie mit Vemurafenib und Cobimetinib wurde eine Kombinationstherapie mit beiden Wirkstoffen durchgeführt und bewertet. Die jeweiligen Kombinationen der in dieser Studie untersuchten Wirkstoffkonzentrationen wurden auf der Grundlage der für die Einzelanwendung von Vemurafenib und Cobimetinib beschriebenen Beobachtungen festgelegt. Da die Behandlung mit 1 μM Vemurafenib eine signifikante hemmende Wirkung auf SK-MEL-28 zeigte, während sie unter allen getesteten Konzentrationen den geringsten negativen Einfluss auf hEK hatte, wurde die Konzentration von 1 μM Vemurafenib (V) gewählt, um in Kombination mit 50 nM, 100 nM und 500 nM Cobimetinib (C) untersucht zu werden. Zusätzlich wurde die Behandlungsdauer auf 72 h festgelegt, wobei die Medikamentenapplikation nach 48 h wiederholt wurde (Abbildung 4-15 A). Die morphologische Bewertung der Zellen mittels Phasenkontrastmikroskopie zeigte eine

signifikante Abnahme der Zelldichte von hEK und SK-MEL-28 bei allen untersuchten Wirkstoffkonzentrationen. Außerdem wurden bei diesen Zelltypen deutliche Veränderungen der Zellmorphologie beobachtet. Nur die MeWo blieben von der Kombinationsbehandlung in Bezug auf Zelldichte und -morphologie unbeeinflusst (*Abbildung 4-15 D I*). Obwohl bei MeWo keine morphologischen Veränderungen beobachtet wurden, wurde die Viabilität dieses Zelltyps durch die Kombinationsbehandlung negativ beeinflusst. Im Einzelnen sank die Lebensfähigkeit von MeWo bei der Anwendung von 1 μM V + 50 nM C auf 86 %, während 1 μM V + 100 nM C die Werte weiter auf 78 % senkte. Die stärkste Verringerung der Viabilität von MeWo wurde jedoch bei der Anwendung von 1 μM V + 500 nM C beobachtet, wobei die Lebensfähigkeit auf 57 % fiel. Während die Kombinationstherapie von hEK unabhängig von den verwendeten Medikamentenkonzentrationen zu Viabilitätswerten von konstant unter 40 % führte, zeigte SK-MEL-28 in allen Versuchsgruppen Werte von weniger als 12 % (*Abbildung 4-15 D II*). Die Analyse des Glukoseverbrauchs ergab eine deutliche Verringerung der Glukoseaufnahme in allen Zelltypen. Dabei nahm der Glukoseverbrauch von MeWo mit zunehmender Wirkstoffkonzentration progressiv ab, bis bei der höchsten Konzentration (1 μM V + 500 nM C) überhaupt keine Glukoseaufnahme mehr festgestellt wurde. Bei hEK und SK-MEL-28 wurde bei allen untersuchten Konzentrationskombinationen keine Stoffwechselaktivität beobachtet (*Abbildung 4-15 D III*).

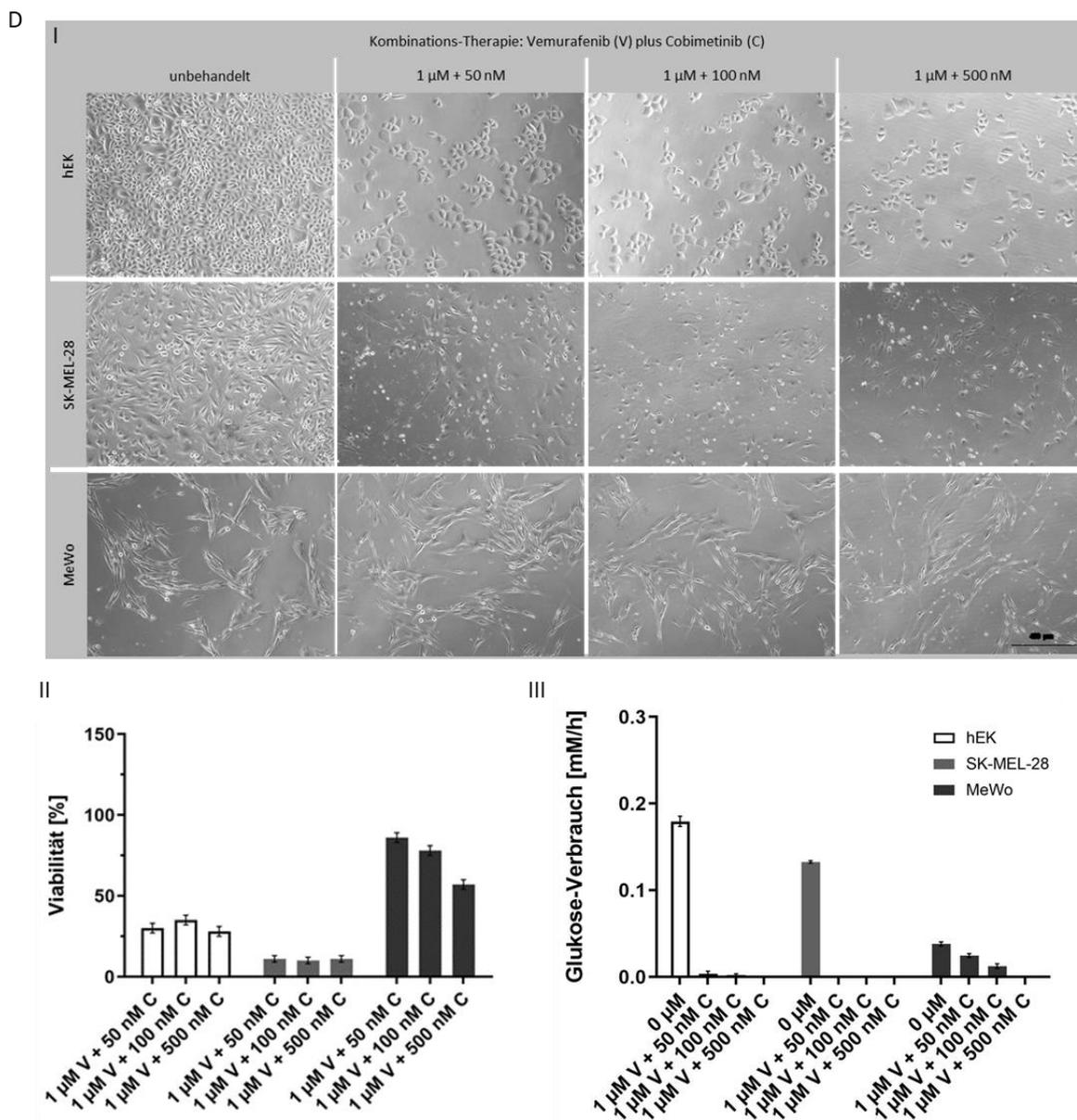


Abbildung 4-15: **Zielgerichtete medikamentöse Melanom-Behandlung in 2D.** (D) Zielgerichtete Kombinations-Therapie mit Vemurafenib plus Cobimetinib für 72 h. (I) Phasenkontrastmikroskopie von hEK, SK-MEL-28 und MeWo, die 72 Stunden lang mit einer Kombination aus Vemurafenib und Cobimetinib (unbehandelt, 1 μ M emurafenib. + 50 nM Cobimetinib, 1 μ M Vemurafenib + 100 nM Cobimetinib, and 1 μ M Vemurafenib + 500 nM Cobimetinib) behandelt wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 450 μ m. (II) Viabilität der behandelten Zellen nach 72 h Arzneimittelinkubation. Die Viabilität wurde aus biologischen Triplikaten mit jeweils technischen Duplikaten bestimmt und auf unbehandelte Kontrollen (n=1) normiert. (III) Glukoseverbrauch behandelter Zellen nach 72 h Arzneimittelinkubation. Der Glukoseverbrauch wurde aus biologischen Triplikaten (n = 1) bestimmt.

4.3.1.2. Zielgerichtete medikamentöse Behandlung von 3D Modellen des malignen Melanoms

Die wirksamsten Parameter wurden nach der Evaluierung verschiedener Arzneimittelkonzentrationen und Behandlungsdauern in 2D auf die 3D-Kultur übertragen. Konkret wurden für die zielgerichtete medikamentöse Behandlung in OS-REp und mOS-REp eine Behandlungsdauer von 72 h und die folgenden Wirkstoffkonzentrationen und -kombinationen festgelegt: 1 μM und 3 μM Vemurafenib, 100 nM Cobimetinib und 1 μM Vemurafenib in Kombination mit 100 nM Cobimetinib (1 μM V + 100 nM C). Obwohl die Kombination von 3 μM Vemurafenib und 100 nM Cobimetinib (3 μM V + 100 nM C) bisher nicht in 2D untersucht wurde, wurde diese Kombination auch in die 3D-Studie aufgenommen. Die Applikation des Medikaments erfolgte systemisch an d21 nach ALI durch Zugabe der jeweiligen Wirkstoffkonzentrationen und -kombinationen zum Zellkulturmedium appliziert. Nach 48 Stunden Inkubation wurde die Medikamentenapplikation wiederholt, bevor der Therapieeffekt nach einer Gesamtbehandlungsdauer von 72 Stunden evaluiert wurde (*Abbildung 4-16 A*). Die Auswirkung der zielgerichteten medikamentösen Behandlung auf die Viabilität des Modells durch eine MTT-basierte Viabilitätsbestimmung bewertet. Dabei wurde für alle drei Modelltypen ein ähnliches Ergebnis in Bezug auf die verschiedenen in dieser Studie getesteten Arzneimittelkonzentrationen beobachtet. Genauer gesagt wiesen OS-REp, mOS-REp^{SK-MEL-28} und mOS-REp^{MeWo}, die mit 1 μM oder 3 μM Vemurafenib behandelt wurden, die geringste Viabilität unter allen medikamentös behandelten Modellen auf, mit Werten zwischen 89,3 % und 92,3 %. Im Gegensatz dazu wurde nach Applikation von 100 nM Cobimetinib, ein leichter Anstieg der Viabilität festgestellt. Für diese Bedingung wurden Viabilitätswerte zwischen 92,3 % und 97,4 % beobachtet. Mit Werten von über 100 % zeigten OS-REp, mOS-REp^{SK-MEL-28} und mOS-REp^{MeWo}, die entweder mit 1 μM V + 100 nM C oder 3 μM V + 100 nM C behandelt wurden, die höchste Viabilität unter allen untersuchten therapeutischen Bedingungen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombinationstherapie aus Vemurafenib und Cobimetinib eine hohe Viabilität der Modelle aufrechterhält, während die Anwendung eines einzelnen Medikaments die Lebensfähigkeit des Gewebes unabhängig vom untersuchten Modelltyp negativ beeinflusst (*Abbildung 4-16 B*). Was den Glukosestoffwechsel betrifft, so wurde bei allen Modelltypen ein ähnliches Verbrauchsprofil in Bezug auf die verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen beobachtet. Während keiner der Modelltypen bei der Verabreichung von 1 μM Vemurafenib eine signifikante Verringerung des Glukoseverbrauchs zeigte, wurde bei OS-REp, mOS-REp^{SK-MEL-28} und mOS-REp^{MeWo}, die mit 3 μM Vemurafenib behandelt wurden, ein leichter Rückgang des Glukoseverbrauchs im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle beobachtet. Gleichzeitig führte die Behandlung

mit 100 nM Cobimetinib bei allen Modelltypen zu einem signifikanten Rückgang des Glukoseverbrauchs. Die Kombinationstherapie mit 1 μM V + 100 nM C zeigte jedoch einen deutlich erhöhten Glukoseverbrauch im Vergleich zur alleinigen Anwendung von 100 nM Cobimetinib. Nichtsdestotrotz zeigte die Kombinationstherapie von 3 μM V + 100 nM C den geringsten Glukoseverbrauch unter allen untersuchten Behandlungsbedingungen. Hier wurde eine Verringerung des Glukoseverbrauchs um fast die Hälfte der unbehandelten Kontrolle beobachtet (*Abbildung 4-16 C*). Der TUNEL-Assay wurde als weitere Analysemethode zum Nachweis therapeutischer Wirkungen in 3D-Modellen des malignen Melanoms durchgeführt. Das Prinzip dieser Färbung basiert darauf, dass mit dem Enzym TdT DNS-Brüche nachgewiesen werden können, die während der DNA-Fragmentierung in der Endphase der Apoptose auftreten [131]. Um Positivkontrollen für dieses Färbeverfahren zu erzeugen, wurden OS-REp 24 Stunden lang entweder mit 1 % Triton X-100 oder DMSO topisch behandelt, während unbehandelte native Haut als Negativkontrolle diente. Die TUNEL-Färbung wurde für alle getesteten Arzneimittelkonzentrationen und -kombinationen an OS-REp, mOS-REp^{SK-MEL-28} und mOS-REp^{MeWo} durchgeführt (Daten nicht gezeigt). *Abbildung 4-16 D* zeigt repräsentative Mikroskopbilder von mOS-REp^{SK-MEL-28} und den entsprechenden Positiv- und Negativkontrollen. Positive TUNEL-Färbung, erkennbar an der dunkelbraunen Färbung, wurde im gesamten Querschnitt der mit Triton X-100 oder DMSO behandelten Kontrollmodelle beobachtet. Positive Zellen wurden auch im Stratum granulosum und im Melanomzellcluster von mOS-REp^{SK-MEL-28} beobachtet, das mit 100 nM Cobimetinib für 72 h behandelt wurde. Die Gesamtzahl der in diesem Modell als apoptotisch identifizierten Zellen war jedoch im Vergleich zu den Positivkontrollen sehr gering. Zudem erwies sich die TUNEL-Färbung der nativen humanen Haut als negativ.

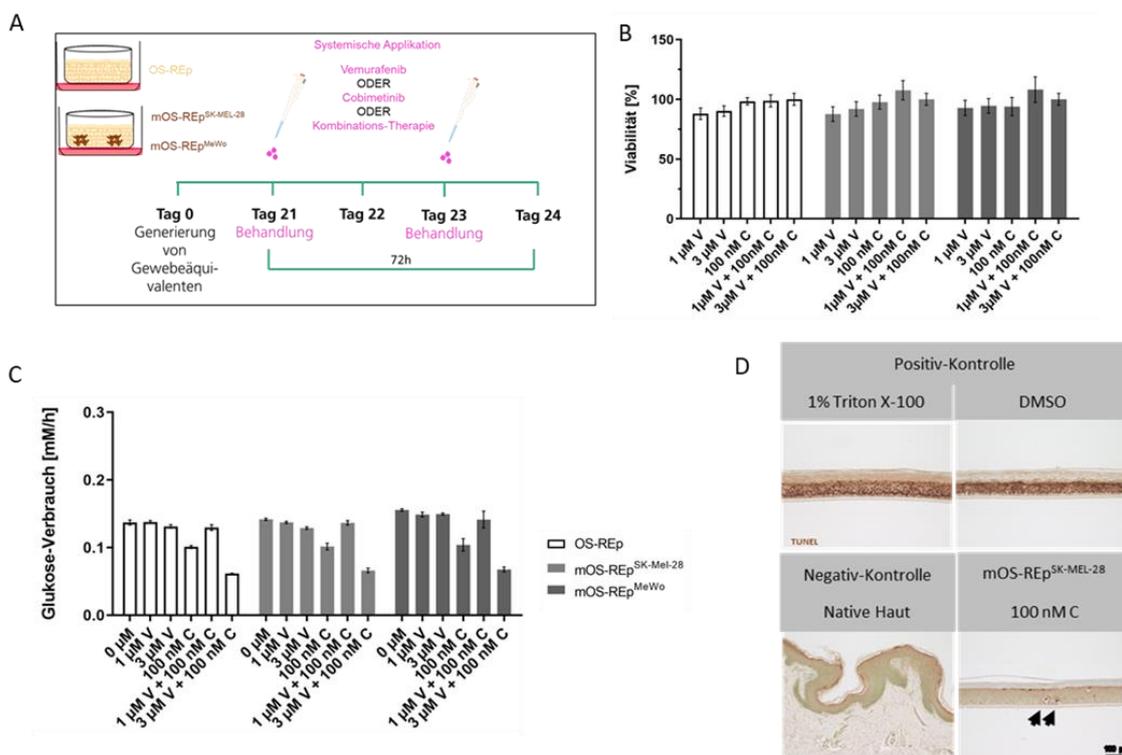
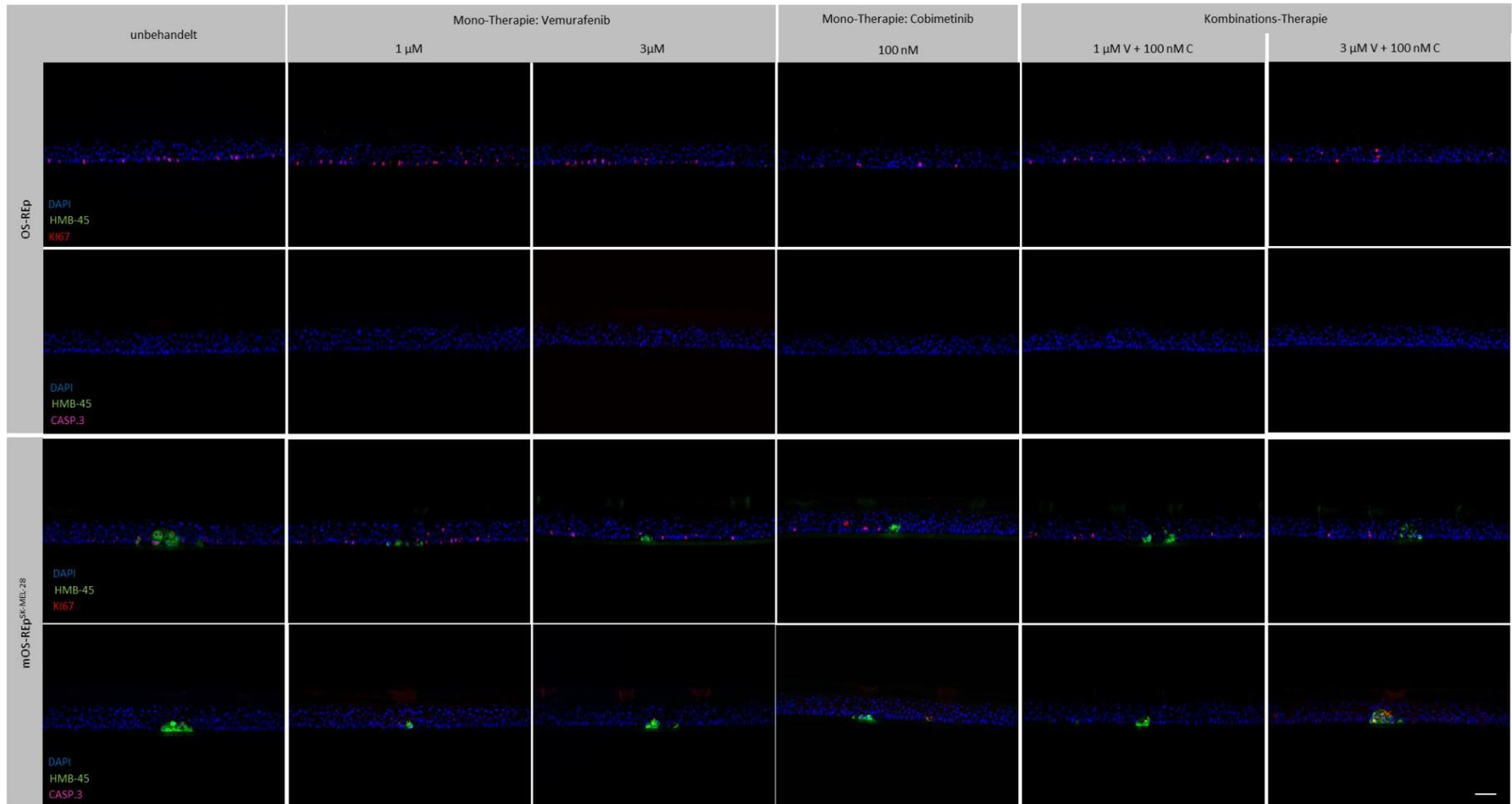


Abbildung 4-16: **Zielgerichtete medikamentöse Melanom-Behandlung in 3D.** (A) Experimenteller Aufbau der zielgerichteten Melanomtherapie in 3D. Die Behandlung von 21 d alten epidermalen Gewebe-Äquivalenten (gesunde OS-REp; organotypische Modelle des Malignen Melanoms mit den Zelllinien SK-MEL-28 und MeWo) wurde am Tag 21 nach ALI durchgeführt. Dazu wurde Vemurafenib, Cobimetinib oder eine Kombination aus beiden systemisch in unterschiedlichen Konzentrationen durch Zugabe der Wirkstoffe zum Zellkulturmedium appliziert (Tag 21). Nach einer Inkubation von 72 h (Tag 24) mit wiederholter Arzneimittelapplikation nach 48 h (Tag 23) wurden die Therapieeffekte analysiert. (B) Viabilität 72 Stunden nach Verabreichung des Medikaments. Die Viabilität wurde aus biologischen Triplikaten mit jeweils technischen Duplikaten bestimmt und auf unbehandelte Kontrollen (n=3) normalisiert. (C) Glukoseverbrauch nach 72 Stunden Arzneimittelgabe. Der Glukoseverbrauch wurde aus biologischen Triplikaten (n = 3) bestimmt. (D) TUNEL-Färbung von OS-REp behandelt mit 1 % Triton X-100 bzw. DMSO für jeweils 24 h (Positivkontrolle), mOS-REp^{SK-MEL-28} behandelt mit 100 nM Cobimetinib für 72 h, und unbehandelter nativer menschlicher Haut (Negativkontrolle). Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Zusätzlich wurde eine IF für den Proliferationsmarker KI67 und den Apoptose-Indikator gespaltene Caspase-3 in Kombination mit dem Melanom-assoziierten Marker HMB-45 durchgeführt. Bei KI67 handelt es sich um ein intranukleäres Protein, das in allen aktiven Phasen des Zellzyklus (G1, S, G2 und Mitose) im Zellkern vorkommt, aber in arretierten, ruhenden Zellen (G0) nicht vorhanden ist [138]. Somit sollte die IF für diesen Zellzyklusmarker Aufschluss über die Auswirkungen einer gezielten Melanomtherapie auf die Proliferationsfähigkeit von Melanomzellen innerhalb von mOS-REp geben. Was OS-REp betrifft, so wurden in der Basalschicht der behandelten und unbehandelten Modelle mehrere KI67-positive Zellen beobachtet, wobei kein signifikanter Unterschied in ihrer Häufigkeit und Verteilung zwischen den verschiedenen Arzneimittelkonzentrationen festgestellt werden konnte. In allen mOS-REp^{SK-MEL-28}-Modellen konnten HMB-45-positive

Melanomzellcluster beobachtet werden. Allerdings zeigten nur unbehandelte mOS-REp^{SK-MEL-28} gut definierte und durchweg HMB-45-positive Melanom-Aggregate mit klarer Abgrenzung zum umgebenden Gewebe. Das HMB45-Signal in medikamentös behandeltem mOS-REp^{SK-MEL-28} erschien dagegen als unregelmäßige, punktuelle Flecken, die über undefinierte Bereiche der basalen epidermalen Schichten verstreut waren, was auf ein allmähliches Auflösen der Melanom-Aggregate in behandelten mOS-REp^{SK-MEL-28} schließen ließ. Was die KI67-Expression betrifft, so wurden bei diesen Modellen keine signifikanten Unterschiede in der Häufigkeit der KI67-positiven Zellen zwischen den verschiedenen Behandlungsbedingungen festgestellt. Dennoch wurden in den suprabasalen epidermalen Schichten von mOS-REp^{SK-MEL-28} im Vergleich zu OS-REp mehr KI67-positive Zellen festgestellt. Im Gegensatz zu mOS-REp^{SK-MEL-28} konnten in allen mOS-REp^{MeWo}-Bedingungen durch IF von HMB-45 klar abgegrenzte Melanomnester identifiziert werden, während die KI67-Färbung eine häufige Kolo-kalisierung von KI67-positiven und HMB-45-exprimierenden Zellen ergab. Um apoptotische Zellen in den OS-REp und mOS-REp zu erkennen, wurde eine IF mit dem Antikörper gegen gespaltene Caspase-3 durchgeführt. Caspase-3 ist eine Cystein-abhängige Aspartat-gerichtete Protease, die eine Schlüsselrolle bei der Apoptose spielt, da sie für die proteolytische Verarbeitung wesentlicher Schlüsselfaktoren verantwortlich ist, die den Prozess des programmierten Zelltods regulieren. Die Aktivierung von Caspase-3 erfordert die proteolytische Spaltung des inaktiven Proenzym in zwei operative Untereinheiten [139], von denen eine mit diesem Antikörper nachgewiesen werden kann. Die IF für HMB-45 in Kombination mit gespaltener Caspase-3 wurde durchgeführt, um Zellen, insbesondere Melanomzellen, zu erkennen, die infolge einer zielgerichteten Therapie Apoptose erleiden. Sowohl bei OS-REp als auch bei mOS-REp^{MeWo} wurden unter keiner der Behandlungsbedingungen Caspase-3-positive Zellen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnte bei den behandelten mOS-REp^{SK-MEL-28}-Modellen ein positives Signal für gespaltene Caspase-3 beobachtet werden, während die unbehandelten Modelle Caspase-3-negativ waren. Obwohl die Caspase-3-Färbung in behandelten mOS-REp^{SK-MEL-28} mit der HMB-45-Expression kolo-kalisiert werden konnte, war die Anzahl der Caspase-3-positiven Zellen innerhalb des Melanomclusters unter allen Behandlungsbedingungen äußerst gering. Das stärkste Caspase-3-Signal konnte bei mOS-REp^{SK-MEL-28} beobachtet werden, das mit 3 µM V + 100 nM C behandelt wurde (Abbildung 4-16 E).

E



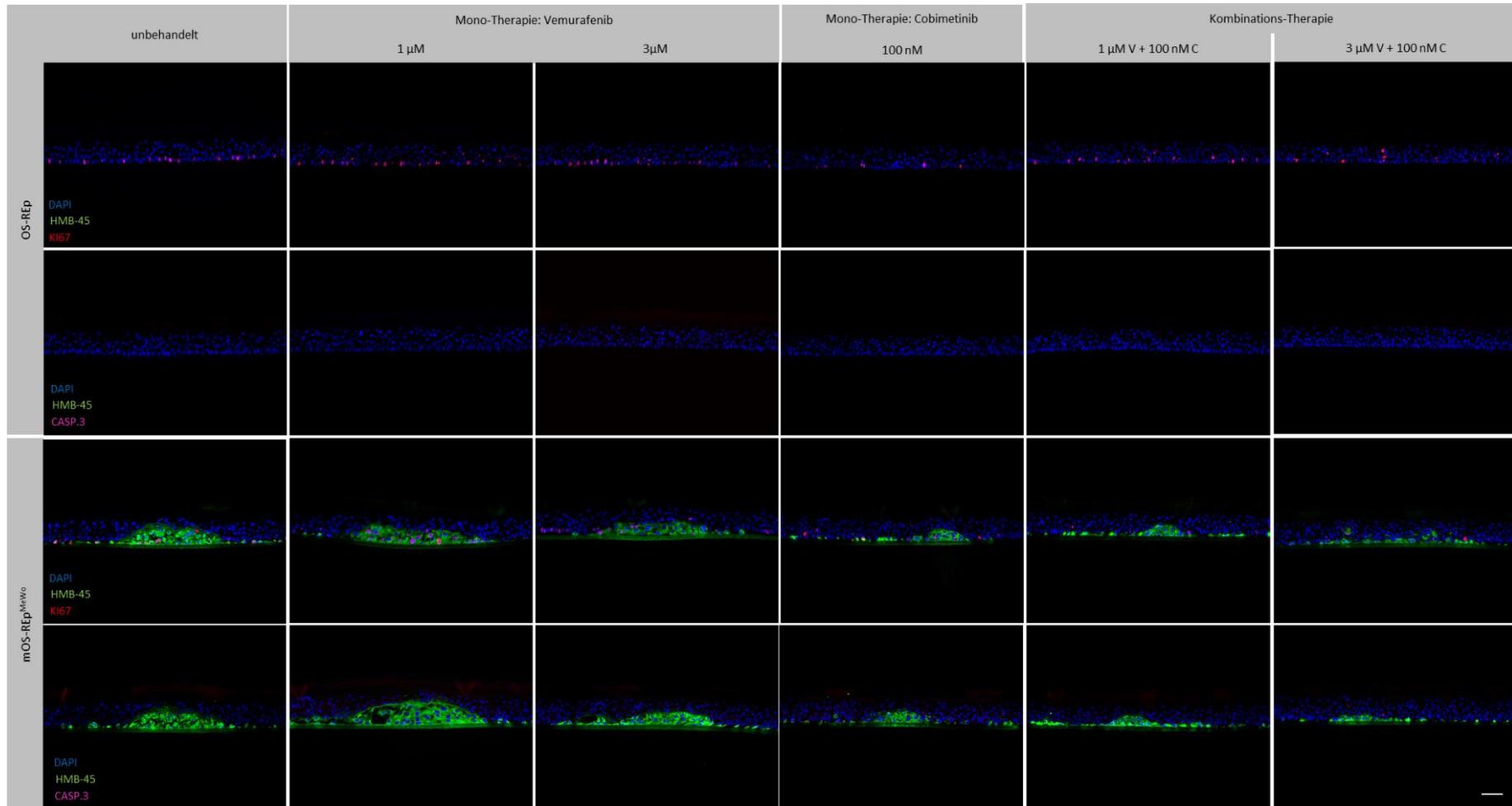


Abbildung 4-16: **Zielgerichtete medikamentöse Melanom-Behandlung in 3D.** (E) Immunfluoreszenzfärbung von (m)OS-REp für den Proliferationsmarker Ki67 (rot) und den Apoptosemarker gesplattene Caspase-3 (CASP.3, pink) in Kombination mit dem Melanommarker HMB-45 (grün). Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

4.3.2. Anti-Tumor Therapie mit Peptid RDP22

Bei Patienten mit NRAS mutierten-Melanomen fehlt es an wirksamen zielgerichteten Therapien, da sich Resistenzen entwickeln und diese Melanome sehr aggressiv sind, was im Allgemeinen zu einer schlechteren Prognose führt [140]. Folglich besteht bis heute ein ungedeckter klinischer Bedarf an nachhaltig wirksamen therapeutischen Strategien für diese Patienten. Neue Peptide-basierte Behandlungsmöglichkeiten bieten neue Therapiemöglichkeiten [141–146]. Das Peptid RDP22 zeigt eine selektive Aktivität gegen den Krebszellmarker Phosphatidylserin (PS) in Modellsystemen und Zytotoxizität gegen Melanome ohne signifikante Wirkung auf nicht-neoplastische Zellen wie Melanozyten oder Fibroblasten bei antitumoraktiven Konzentrationen [146, 145, 141]. Vor in vivo-Studien wurde eine 3D Studie durchgeführt und die Auswirkungen von RDP22 auf das organotypische Melanom-Modell mOSRep^{MUG-Mel2} (Kontrolle) untersucht und mit den Kolleg:Innen der medizinischen Universität Graz veröffentlicht [132].

Dazu wurde RDP22 (Peptid), gelöst in 0,1%iger Essigsäure (Vehikel), an den Tagen 1 und 2 topisch appliziert. Anschließend wurden die Stoffwechselaktivität und die zelluläre Integrität bewertet und Unterschiede in der Tumorprogression und -regression während der Entwicklung sowie die Proliferationsraten nach der Behandlung analysiert (*Abbildung 4-17 A*). Um die Pro- bzw. Regression des Melanoms zerstörungsfrei während der gesamten Kulturzeit zu detektieren, wurden Bilder während der 21-tägigen Kulturdauer zu bestimmten Zeitpunkten (d8, d10, d13, d15, d17, d20 und d21) aufgenommen (*Abbildung 4-18*) und mit der Software ImageJ analysiert (*Abbildung 4-17 B*). Die Analyse ergab eine 4,2- bis 4,7-fach höhere Menge an entwickelten Melanomen in den Kontrollmodellen (34,5 %) und Vehikel-behandelten Modellen (31,2 %) im Gegensatz zu den mit RDP22 behandelten Modellen (7,3 %). Zur Untersuchung des Einflusses des therapeutischen Peptids auf die Proliferationsraten und die stabilen Melanom-Charakteristika zu untersuchen, wurden Melanom-Hautäquivalente mit dem Proliferationsmarker Ki67 bzw. dem Melanommarker HMB-45 angefärbt. Anschließend wurden die Ki67-positiven Zellen quantitativ gezählt (*Abbildung 4-17 C*). Es konnten zahlreiche Ki67-positive Zellen in den unbehandelten Kontroll-Modellen beobachtet werden. Während die Modelle, die mit dem Vehikel allein behandelt wurden, keine signifikante Reaktion auf die Behandlung zeigten, sank die Anzahl der Ki67-positiv gefärbten Zellen nach der Behandlung mit 50 µg Peptid auf 40 % ab. Um die Stoffwechselaktivität der behandelten mOS-REp zu analysieren, wurde außerdem ein Viabilitätstest mittels MTT-Assay durchgeführt (*Abbildung 4-17 D*). Lediglich bei der Peptidbehandlung wurde eine leichte Verringerung der Viabilität gemessen, was mit dem Peptid-induzierten Zelltod der kleinen Menge an Melanomen in den mit RDP22 behandelten Modellen zusammenhängen könnte. Darüber hinaus wurde die zelluläre Integrität durch direkte Messung der LDH-Freisetzung im Überstand (*Abbildung 4-17*

E) gemessen. Erhöhte LDH-Freisetzung korreliert mit verminderter zellulärer Integrität. Somit wurden das Zerstören der Zellmembran und der Zelltod als Folge der Peptidbehandlung beobachtet. Um einen morphologischen Überblick über die Modelle zu erhalten, wurden außerdem Querschnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt (*Abbildung 4-17F*). In den Kontroll- und den mit dem Vehikel behandelten Modellen waren Melanomnester physiologisch an der Basalschicht einer gut stratifizierten Epidermis nachweisbar und stochastisch über das gesamte Modell verteilt. Im Gegensatz dazu waren in Modellen, die mit RDP22 behandelt worden waren, deutlich weniger und kleinere Tumornester sichtbar und die Morphologie der Modelle war verändert, was sich u.a. in einem dickeren Stratum corneum zeigte.

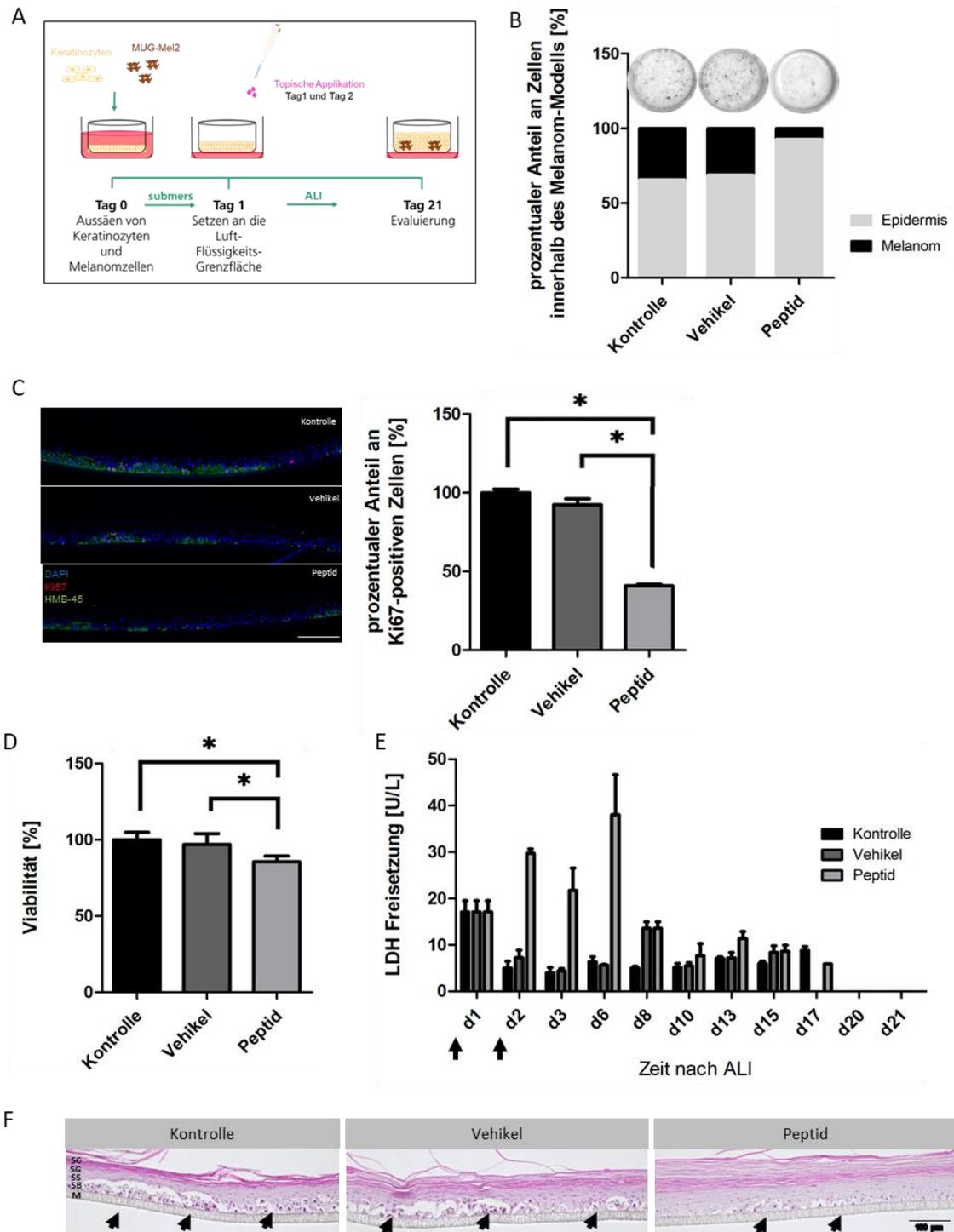


Abbildung 4-17: **Quantifizierung der Auswirkungen von Peptid RDP22 auf mOSREp^{MUG-Mel2}**. (A) Schematische Darstellung der Behandlung von epidermalen Melanom-Modellen mit dem anti-Tumor Peptid RDP22 an d1 und d2 nach ALI. Es wurden jeweils 50 µg RDP22 bzw. 0,1% Essigsäure topisch aufgetragen. (B) Zerstörungsfreie Detektion von Melanompro- und -regression. Bilder, die während 21 Tagen Kulturdauer (Abbildung A-XX) mit dem MediTOM (obere Reihe) aufgenommen wurden, wurden mit ImageJ (untere Reihe) analysiert. (C) Einfluss auf die Proliferationsraten. Melanom-Hautäquivalente wurden mit dem Melanommarker HMB-45 (grün) und dem Proliferationsmarker Ki67 (rot) gefärbt; anschließend wurden Ki67-positive Zellen quantitativ gezählt. (D) Analyse der Stoffwechselaktivität. Melanom-Hautmodelle, die mit dem Vehikel behandelt wurden, zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Viabilität. (E) Bestimmung der Zellintegrität. Die LDH-Freisetzung wurde im Überstand zu definierten Zeitpunkten während der gesamten Kulturdauer gemessen. Pfeile zeigen die Tage an, an denen 0,1 % Essigsäure oder RDP22 topisch auf die Melanom-Modelle aufgetragen wurde. (F) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von Melanom-Hautmodellen. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum

Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm . Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit Triplikaten für jede Bedingung und stellen Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen dar. Für C und D wurde der Student's t-Test angewendet, der signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle bzw. Vehikel- und Peptidbehandlung zeigte, $p < 0,001$ (). Abgeändert und integriert nach schriftlicher Zustimmung des Journals [132].*

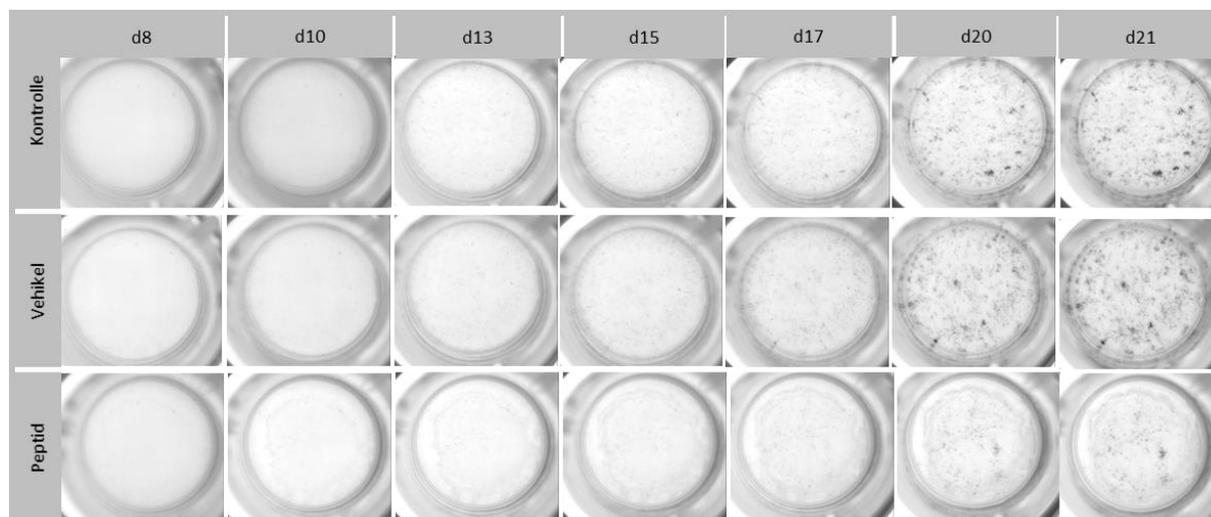


Abbildung 4-18: Nicht-invasive Detektion von Melanompro- und -regression mittels MediTOM. Während 21 Tagen Kulturdauer wurden zu definierten Zeitpunkten (d8, d10, d13, d15, d17, d20 und d21) Bilder mit dem intern entwickelten MediTOM-Gerät aufgenommen und mit der Software ImageJ analysiert. Abgeändert und integriert nach schriftlicher Zustimmung des Journals [132].

4.4. Steigerung der Komplexität des organotypischen Modells durch Integration und Analyse des Einflusses von Komponenten der Tumormikroumgebung

Um die Entwicklung von auf den Menschen übertragbaren Tumormodellen in der onkologischen Forschung voranzutreiben, sollte durch Steigerung der Komplexität eine Annäherung an die in vivo Situation erzielt werden. Hierzu wurde zunächst der Einfluss stromaler Komponenten auf die Melanomentwicklung analysiert (s. 4.4.1) und schließlich eine Immun-Komponente in die Gewebe-Äquivalente integriert (s. 4.4.3).

4.4.1. Analyse des Einflusses auf die Melanomentwicklung stromaler Komponenten im in vitro Melanom-Modell

Um die Auswirkungen der dermalen Komponente in den organotypischen Melanom-Modellen zu untersuchen, wurde in der von mir konzipierten und betreuten Masterarbeit von Corinna Junger zunächst die Morphologie und Melanomentwicklung der epidermalen und epidermal-dermalen Melanom-Modelle verglichen. In beiden Modellarten waren Melanomnester

physiologisch an der Basalschicht einer gut stratifizierten Epidermis nachweisbar und stochastisch über das gesamte Modell verteilt, offenbarten allerdings einen Unterschied in Größe und Anzahl der Tumornester. Trotz der Tatsache, dass im mFTSE-Modell zweimal so viele Melanomzellen ausgesät wurden (Verhältnis 1:50 für mFTSE gegenüber 1:100 für mOS-REp), waren in mFTSE deutlich weniger und kleinere Tumornester sichtbar als im mOS-REp (Abbildung 4-19 I). Die quantitative Analyse von Gewebeschnitten (n=10) hinsichtlich der prozentualen Verteilung der Zellen im Modell erfolgte mittels ImageJ. Die Analyse ergab eine 3-fach höhere Menge an entwickelten Melanomen in den epidermalen Modellen (52 %) im Gegensatz zu den dermal-epidermalen Modellen (17 %) (Abbildung 4-19 II).

Um die Hemmung des Fortschreitens des Melanoms in einem dermal-epidermalen Melanom-Modell weiter zu analysieren und die Auswirkungen des dermalen Teils auf die Melanomentwicklung bewerten zu können, wurden im Folgenden die Nährstoff-Konkurrenz (s. 4.4.1.1), der Einfluss adulter Zellen (s. 4.4.1.2) und die Auswirkungen von Krebs-assoziierten Fibroblasten (s. 4.4.2) im in vitro Melanom-Modell untersucht.

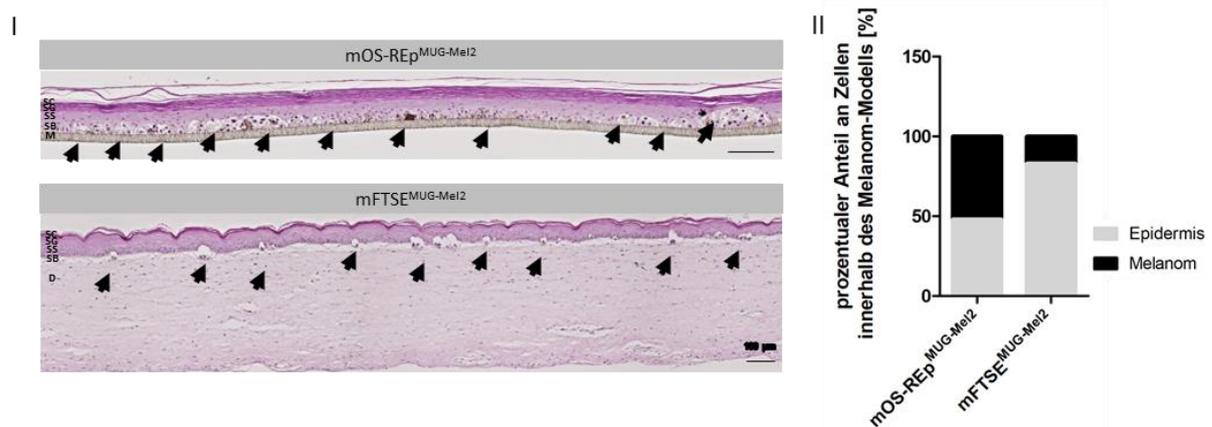


Abbildung 4-19: **Gegenüberstellung der Melanomentwicklung in epidermalen vs. dermal-epidermalen Melanom-Modellen.** (I) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von mOS-REp^{MUG-Mel2} bzw. mFTSE^{MUG-Mel2}. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran, D = Dermis. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. (II) Die quantitative Analyse von Gewebeschnitten (n=10) erfolgte mit ImageJ.

4.4.1.1. Analyse der Nährstoff-Konkurrenz im in vitro Melanom-Modell

Um zu analysieren, ob eine Nährstoff-Konkurrenz ursächlich für die unterschiedlich ausgeprägte Melanomentwicklung im epidermal-dermalen Melanom-Modell ist, wurde ein Nährstoff-Experiment durchgeführt. Hierzu wurden mFTSE^{MUG-Mel2} mit 19 mL E10-Medium statt der standardmäßigen 2,5 mL kultiviert und erhielten somit ein 7,6-fach höheres Volumen

an Medien und Nährstoffen (*Abbildung 4-20 A*). Um einen morphologischen Überblick über die Modelle zu erhalten, wurden Querschnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Modelle, die in der Deepwell-Platte kultiviert worden waren, wiesen deutlich weniger und kleinere Tumornester auf als solche, die standardmäßig kultiviert worden waren. Die quantitative Analyse von Gewebeschnitten (n=6) hinsichtlich der prozentualen Verteilung der Zellen im Modell erfolgte mittels ImageJ. Die Analyse ergab eine 2-fach höhere Menge an entwickelten Melanomen in den mFTSE^{MUG-Mel2/Deepwell} (35 %) im Gegensatz zu den mFTSE^{MUG-Mel2} (17 %) (*Abbildung 4-20 B*). Was den Glukosestoffwechsel betrifft, so wurde bei beiden Modelltypen ein ähnliches Verbrauchsprofil in Bezug auf die verschiedenen Kulturbedingungen beobachtet. Während mFTSE^{MUG-Mel2} eine leichte Steigerung des Glukoseverbrauchs (d7=103 %, d14=103,5 %, d21=103 %) im Vergleich zu gesunden Kontroll-Modellen, auf welche normiert wurde, zeigten, wurde bei mFTSE^{MUG-Mel2/Deepwell} ein deutlich erhöhter Glukoseverbrauch offenbar (125,03 % an d7 bis zu 128,16 % an d21), was einen Anstieg von 25 % im Vergleich zu den in 2,5 mL Medium kultivierten mFTSE bedeutet (*Abbildung 4-20 C*).

Was die Laktatproduktion betrifft, so wurde bei beiden Modelltypen ein ähnliches Produktionsprofil in Bezug auf die verschiedenen Kulturbedingungen beobachtet.

Während die Laktatproduktion in mFTSE^{MUG-Mel2} von d7 auf d14 um 4% leicht anstieg, (d7=108,21 %, d14=112,15 %) konnte bei den mFTSE^{MUG-Mel2/Deepwell} ein deutlicher Anstieg um 49,12 % verzeichnet werden (87,18 % an d7 auf 136,3 % an d14). Von d14 auf d21 konnte ein Rückgang der Laktatproduktion in beiden Modellen beobachtet werden; ein Rückgang um 5,35 % (d21=106,8 %) bei mFTSE^{MUG-Mel2} und auf 132,94 % bei mFTSE^{MUG-Mel2/Deepwell} (*Abbildung 4-20 C*).

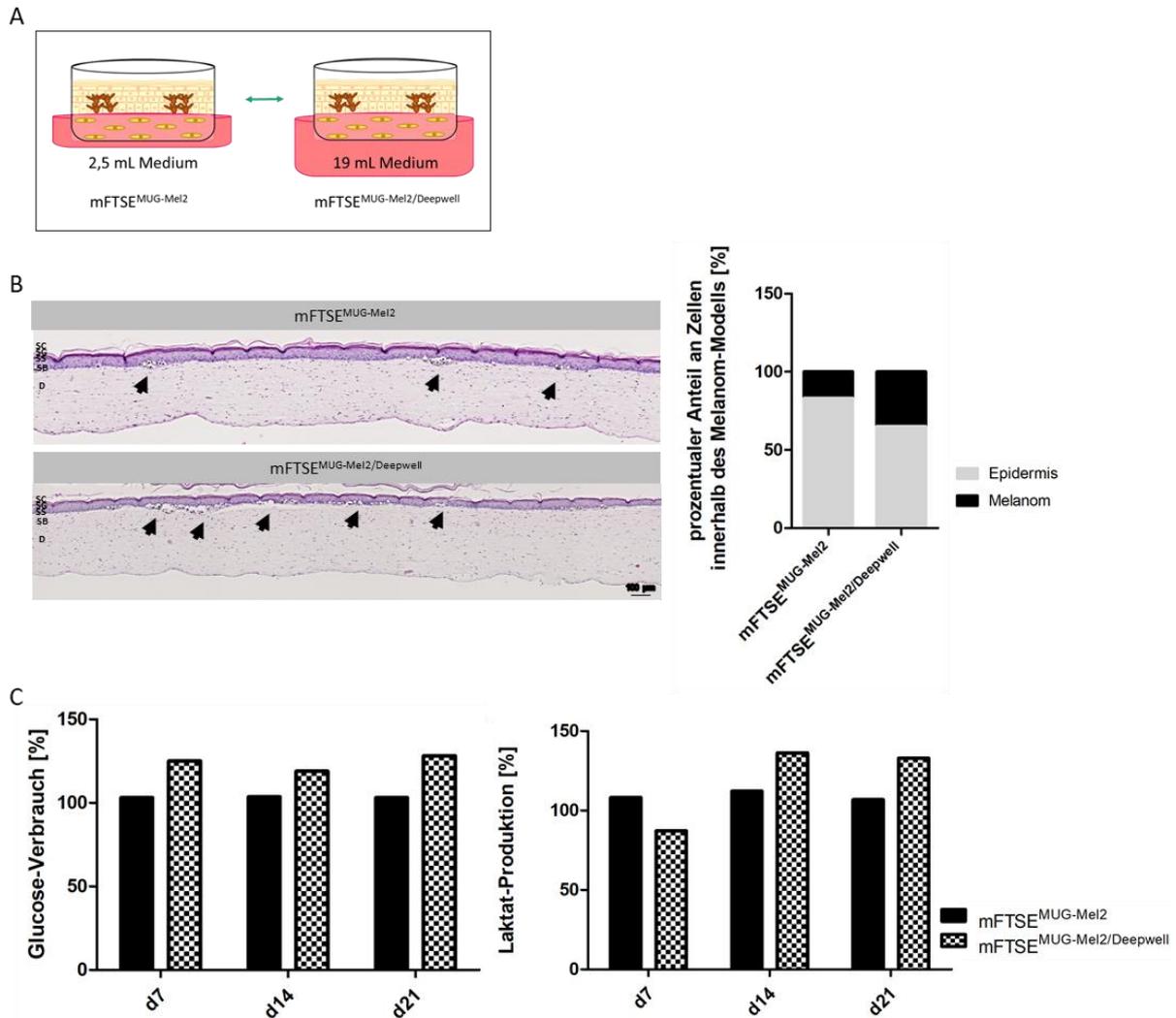


Abbildung 4-20: **Analyse der Nährstoffkonkurrenz im epidermal-dermalen Melanom-Hautäquivalent.** (A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Die Vollhaut-Modelle wurden in unterschiedlichen Mediummengen, entweder standardmäßig in 2,5 mL oder in einer Deepwell-Platte mit 19 mL, kultiviert. (B) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von mFTSE^{MUG-Mel2} bzw. mFTSE^{MUG-Mel2/Deepwell}. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, D = Dermis. Melanome sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. Die quantitative Analyse von Gewebeschnitten (n=6) erfolgte mit ImageJ. (C) Bestimmung des Glukose-Verbrauches (links) bzw. der Laktat-Produktion (rechts). Diese wurden im Überstand zu definierten Zeitpunkten (d7, d14, d21 nach ALI) während der gesamten Kulturdauer gemessen und auf die entsprechende Kontrolle normalisiert. (n=1).

4.4.1.2. Einfluss adulter Zellen im organotypischen Modell des malignen Melanoms

Um den Einfluss adulter Zellen im organotypischen Melanom-Modell zu untersuchen, wurden juvenile und adulte hEK und hdF für die Generierung von epidermalen und dermal-epidermalen Melanom-Modellen verwendet und hinsichtlich ihres Effektes auf die Melanomentwicklung analysiert (Abbildung 4-21 A). Zunächst wurde die Progression des Melanoms zerstörungsfrei nach 21-tägiger Kulturdauer im epidermalen Melanom-Hautäquivalent unter Verwendung juveniler und adulter hEK mit dem MediTOM aufgenommen

und mit ImageJ analysiert. Die Analyse ergab eine identische Menge an entwickelten Melanomen in Modellen mit einem Verhältnis der Melanom-Zellen:hEK von 1:50 (77 %; Daten nicht gezeigt). Bei einem Verhältnis von 1:100 war der Melanomanteil im Modell mit adulten heKs mit 65 % etwas höher als bei mRHE^{Juvenile} mit 61 % (*Abbildung 4-21 B*).

Um den Einfluss von juvenilen und adulten hdF auf das MUG-Mel2-Wachstum in 2D zu untersuchen, wurden die Proliferationsraten mittels XCelligence[®] bestimmt. Der Zell-Index (CI) und die Verdopplungszeit der Melanomzellen unter dem Einfluss der hdFs wurde für die Dauer von einer Woche gemessen. Für die Analyse des Zell-Indexes, der ein quantitatives Maß für die Zellzahl ist, wurde ein Zeitbereich zwischen 60 und 121 h verwendet. Die Diagramme des Zell-Indexes zeigten unterschiedliche Verläufe für MUG-Mel2 w/o hdFs, MUG-Mel2 + juvenilen hdFs oder + adulte hdFs auf. Die Verdoppelungszeit für MUG-Mel2 w/o hdF betrug etwa 55 h. Die Verdopplungszeiten unter Einfluss der hdFs waren deutlich höher; für MUG-Mel2 + juvenilen hdFs 145,97 h, für MUG-Mel2 + adulte hdFs 106,13 h. Die Steigung der MUG-Mel2 w/o hdFs wurde auf 100 % gesetzt und die Diagramme für adulte und juvenile Zellen wurden auf diesen Kontrollwert normiert. Die MUG-Mel2 + juvenile hdFs zeigten eine 1,2-fach höhere Steigung (121,4 %), für die MUG-Mel2 + adulte hdFs war die Steigung 2,64-fach höher (264 %) (*Abbildung 4-21 C*).

Um einen morphologischen Überblick über die epidermal-dermalen Modelle unter Verwendung juveniler und adulter hdF zu erhalten, wurden Querschnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Modelle, die mit adulten hdF aufgebaut wurden, wiesen dünnere epidermale Strata auf, deutlich mehr und größere Tumornester auf als solche, die standardmäßig aufgebaut worden waren. Die quantitative Analyse von Gewebeschnitten (n=6) hinsichtlich der prozentualen Verteilung der Zellen im Modell erfolgte mittels der Software ImageJ. Die Analyse ergab eine 3,2-fach höhere Menge an entwickelten Melanomen in den mFTSE^{MUG-Mel2/adult} (53 %) im Gegensatz zu den mFTSE^{MUG-Mel2/juvenil} (17 %) (*Abbildung 4-21 D*).

Was den Glukosestoffwechsel betrifft, so wurde bei beiden Modelltypen ein unterschiedliches Verbrauchsprofil in Bezug auf die verschiedenen Kulturbedingungen beobachtet. Während mFTSE^{MUG-Mel2/juvenil} eine leichte Steigerung des Glukoseverbrauchs (d7=103 %, d14=103,5 %, d21=103 %) im Vergleich zu gesunden Kontroll-Modellen, auf welche normiert wurde, zeigten, wurde bei mFTSE^{MUG-Mel2/adult} ein deutlich niedriger Glukoseverbrauch offenbar (d7 von 79 % bis d14 mit 77,75 %). Erst an d21 war der Verbrauch mit 105,27 % höher als bei der Kontrolle. Während bei den juvenilen mFTSE im Laufe der Zeit kein Anstieg zu verzeichnen war, stieg der Verbrauch bei den adulten mFTSE um 26,27 % an d21 (*Abbildung 4-21 E*).

Was die Laktatproduktion betrifft, so wurde bei beiden Modelltypen ähnliches beobachtet. Während die Laktatproduktion in mFTSE^{MUG-Mel2/juvenil} zu jedem Zeitpunkt höher liegt als die des Kontroll-Modells (d7=108,21 %, d14=112,15 %, d21=106,8 %), war die Laktatproduktion des mFTSE^{MUG-Mel2/adult} an d7 und d14 auffallend niedriger als die des Kontroll-Modells. An d21 war

ein deutlicher Anstieg um 31,25 % (auf 100,75 %) zu verzeichnen, und die Laktatproduktion entsprach fast der des Kontrollmodells (Abbildung 4-21 E).

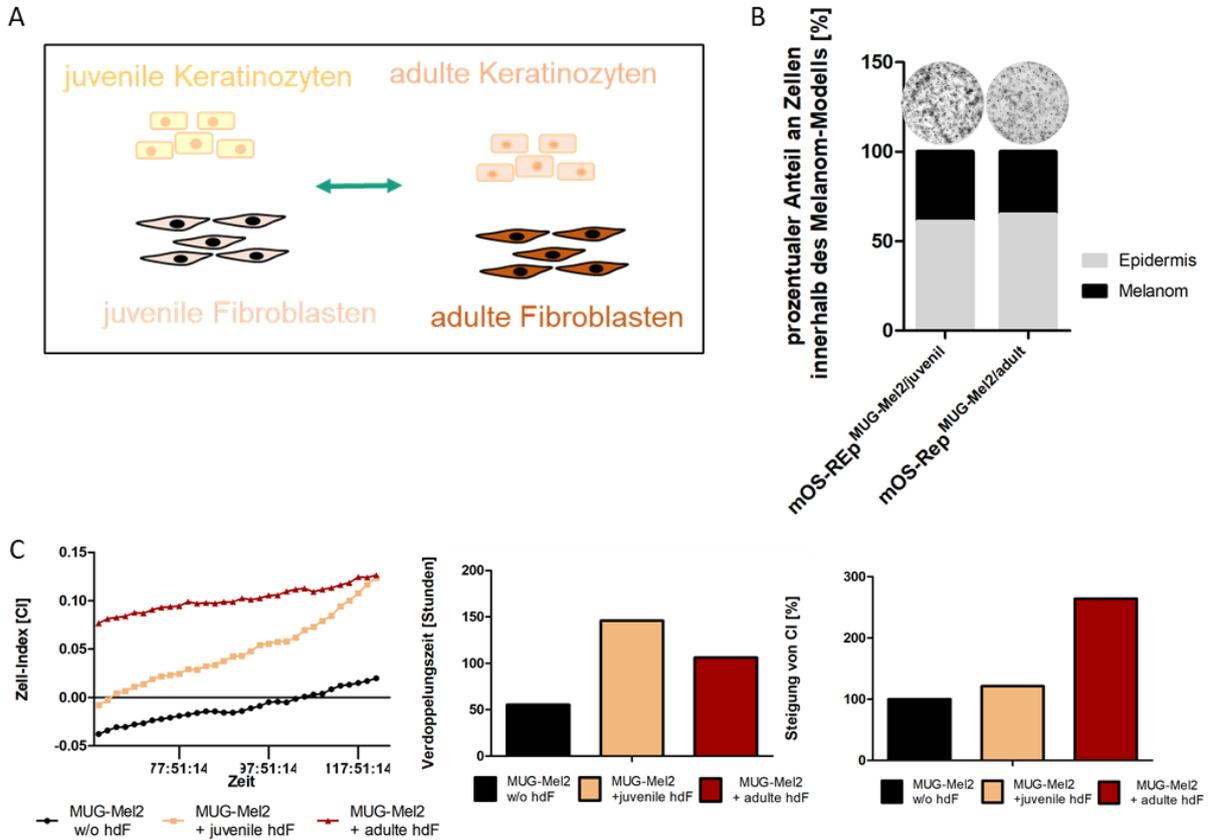


Abbildung 4-21: **Einfluss von adulten Keratinozyten und Fibroblasten auf die Melanomentwicklung.** (A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Juvenile und adulte Keratinozyten und Fibroblasten wurden für die Generierung von epidermalen und epidermal-dermalen Melanom-Modellen verwendet und hinsichtlich ihres Effektes auf die Melanomentwicklung analysiert. (B) Vergleich der Melanomprogression im epidermalen Melanom-Hautäquivalent unter Verwendung juveniler und adulter heK. Bilder, die mit dem MediTOM (obere Reihe) aufgenommen wurden, wurden mit ImageJ (untere Reihe) analysiert (n=2). (C) Bestimmung der Proliferationsraten mittels XCelligence®. Analyse des Einflusses von juvenilen und adulten hdF auf das MUG-Mel2-Wachstum in 2D. Es wurden Zell-Index, Verdopplungszeit und die Steigung des CI bestimmt.

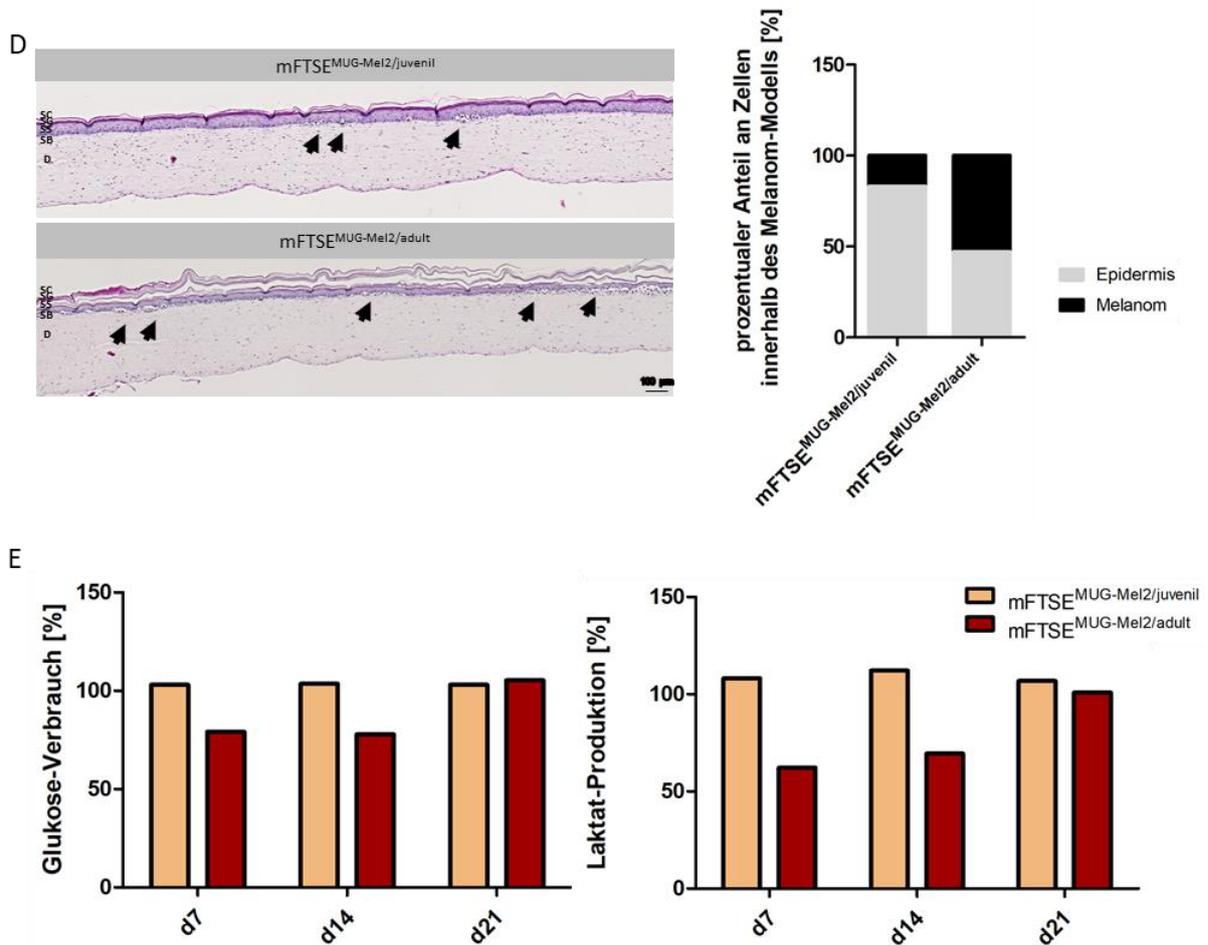


Abbildung 4-21: **Einfluss von adulten Keratinozyten und Fibroblasten auf die Melanomentwicklung** (D) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von epidermal-dermalen Melanom-Hautmodellen unter Verwendung juveniler und adulter hDF. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, D = Dermis. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Die quantitative Analyse von Gewebeschnitten ($n=6$) erfolgte mit ImageJ. (E) Bestimmung des Glukose-Verbrauches (links) bzw. der Laktat-Produktion (rechts). Diese wurden im Überstand zu definierten Zeitpunkten (d7, d14, d21 nach ALI) während der gesamten Kulturdauer gemessen und auf die entsprechende Kontrolle normalisiert. ($n=1$).

4.4.2. Integration und Analyse der Auswirkungen von Krebs-assoziierten Fibroblasten

Um die Auswirkungen von Krebs-assoziierten Fibroblasten im in vitro Melanom-Modell und deren Einfluss auf die Hemmung des Fortschreitens des Melanoms in einem dermal-epidermalen Melanom-Modell zu analysieren, wurden zunächst hDFs zu Krebs-assoziierten Fibroblasten aktiviert und anschließend der Einfluss dieser CAFs auf MUG-Mel2 in 2D analysiert. Zur Aktivierung wurden juvenile hDFs für 48 h mit TGF- β oder konditioniertem Medium (CM) oder einer 1:1 Mischung aus beidem inkubiert (Abbildung 4-22 A). Zur Überprüfung der erfolgreichen Aktivierung zu Krebs-assoziierten Fibroblasten, wurden aktivierte Fibroblasten und die CAF-Zelllinie MUCCarly1 auf die CAF-assoziierten Marker α -Smooth Muscle Actin (α SMA) und Fibroblast Activated Protein (FAP) angefärbt. Es konnten

zahlreiche α SMA- und FAP-positive MUCCarly1 detektiert werden. Während alle durch Inkubation mit TGF- β oder CM oder einer 1:1 Mischung aus beidem aktivierten hdFs eine FAP-Expression zeigten, fiel die Expression von α SMA deutlich schwächer aus (*Abbildung 4-22 B*). Um den Einfluss Krebs-assoziiierter Fibroblasten auf das MUG-Mel2-Wachstum in 2D zu untersuchen, wurden die Proliferationsraten mittels XCelligence[®] bestimmt. Der CI und die Verdopplungszeit der Melanomzellen unter dem Einfluss der CAFs wurde für die Dauer von einer Woche gemessen. Für die Analyse des CIs, der ein quantitatives Maß für die Zellzahl ist, wurde ein Zeitbereich zwischen 60 und 121 h verwendet. Die Diagramme des CIs zeigten unterschiedliche Verläufe für MUG-Mel2 w/o hdF, MUG-Mel2 + hdF^{TGF- β} oder + hdF^{CM} oder hdF^{TGF- β +CM} auf. Die Verdopplungszeit für MUG-Mel2 w/o hdF betrug etwa 55 h. Die Verdopplungszeiten unter Einfluss der CAFs waren teils deutlich niedriger; für MUG-Mel2 + hdF^{CM} 41 h, für MUG-Mel2 + hdF^{TGF- β +CM} 23,6 h. Lediglich unter Einfluss der hdF^{TGF- β} betrug die Verdopplungszeit mit 58,9 h einen ähnlichen Wert wie der der Kontrollzellen. Die Steigung der MUG-Mel2 w/o hdFs wurde auf 100 % gesetzt und die Diagramme der CAFs wurden auf diesen Kontrollwert normiert. Die MUG-Mel2 + hdF^{CM} zeigten eine 2,28-fach höhere Steigung (228,6 %), die MUG-Mel2 + hdF^{TGF- β} eine Steigung von 185,7%. Lediglich die Steigung der MUG-Mel2 + hdF^{TGF- β +CM} mit 107,1% war vergleichbar hoch zum Kontrollwert (*Abbildung 4-22 C*).

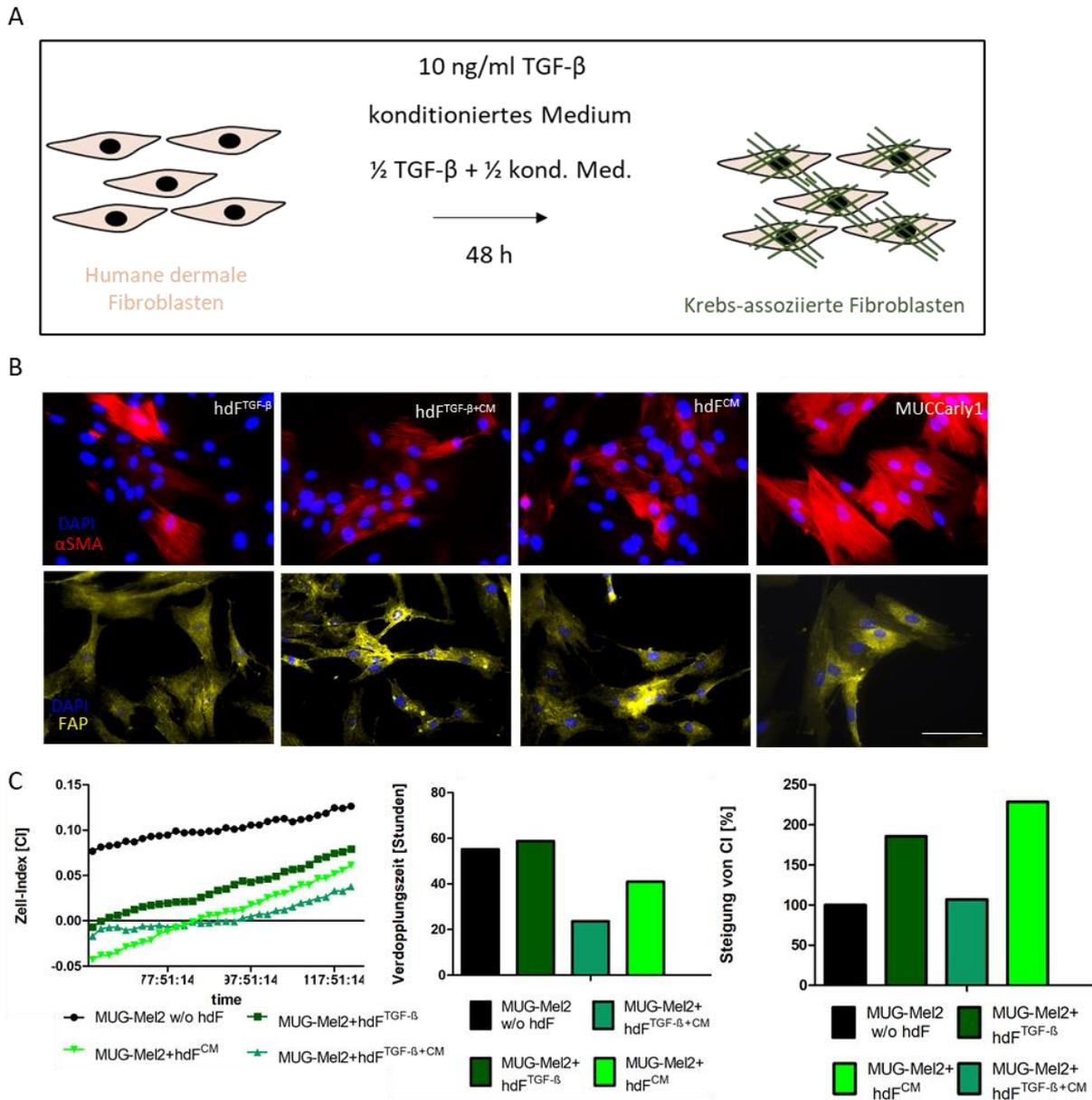


Abbildung 4-22: Aktivierung von hdFs zu Krebs-assoziierten Fibroblasten und Analyse des Einflusses von CAFs auf MUG-Mel2 in 2D. (A) Schematische Darstellung der Aktivierung von hdFs zu CAFs. Dafür wurden juvenile hdFs für 48 h mit TGF- β oder konditioniertem Medium (CM) oder einer 1:1 Mischung aus beidem inkubiert. (B) Immunfluoreszenzfärbung von aktivierten Fibroblasten und der CAF-Zelllinie MUCCarly1 für α SMA (rot) und FAP (gelb). Der Maßstabsbalken entspricht 200 μ m. (C) Bestimmung der Proliferationsraten mittels XCelligence®. Analyse des Einflusses von Krebs-assoziierten Fibroblasten auf das MUG-Mel2-Wachstum in 2D. Es wurden Zell-Index, Verdopplungszeit und die Steigung des CI bestimmt.

Im Folgenden wurden die zu Krebs-assoziierten Fibroblasten aktivierten hdFs in dermal-epidermale Melanom-Modelle integriert, um die Auswirkungen von CAFs im in vitro Melanom-Modell und deren hemmenden Einfluss auf die Progression des Melanoms zu analysieren. Hierzu wurden unaktivierte juvenile, mit TGF- β oder CM oder einer 1:1 Mischung aus beidem aktivierte hdF oder die CAF-Zelllinie MUCCarly1 für die Generierung von

dermal-epidermalen Melanom-Modellen verwendet und hinsichtlich ihres Effektes analysiert (*Abbildung 4-23 A*).

Für einen morphologischen Überblick der epidermal-dermalen Melanom-Gewebe-Äquivalente unter Verwendung verschiedenster (un)aktivierter hdF, wurden Querschnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Modelle, die mit CAFs aufgebaut wurden, wiesen teils dünnere epidermale Strata auf, sowie deutlich mehr, größere und invasivere Tumornester als solche, die standardmäßig aufgebaut worden waren. Lediglich in den Modellen, welche mit der CAF-Zelllinie MUCCarly1 generiert wurden, waren kaum Melanomnester detektierbar. Mittels ImageJ erfolgte die quantitative Analyse von Gewebeschnitten (n=6) hinsichtlich der prozentualen Verteilung der Zellen im Modell. Die Analyse ergab eine 2,8-fach niedrigere Menge an entwickelten Melanomen in den mFTSE^{MUG-Mel2/MUCCarly1} (6 %) im Gegensatz zu den mFTSE^{MUG-Mel2} (17 %). Alle anderen Modelle wiesen eine höhere Menge an entwickelten Melanomen auf im Vergleich zum mFTSE^{MUG-Mel2}; bei mFTSE^{MUG-Mel2/CM} 6% höher (23%), mFTSE^{MUG-Mel2/TGF-β+CM} 1,76-fach höher (30%) und mFTSE^{MUG-Mel2/TGF-β} am höchsten mit 53% und somit 3,1-fach höher als im mFTSE^{MUG-Mel2} (*Abbildung 4-23 B*).

Zusätzlich wurde eine IF für den Keratinozytenmarker CK14 und den CAF-Marker αSMA in Kombination mit dem Melanom-assoziierten Marker HMB-45 durchgeführt. Sowohl bei mFTSE^{MUG-Mel2/TGF-β}, mFTSE^{MUG-Mel2/TGF-β+CM}, mFTSE^{MUG-Mel2/CM}, als auch mFTSE^{MUG-Mel2/MUCCarly1} wurden im dermalen Part αSMA-positive Zellen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnte bei den mFTSE^{MUG-Mel2} kein positives Signal für αSMA beobachtet werden. Obwohl die CK14-Färbung in allen mFTSE detektiert werden konnte, war die Anzahl der CK14-positiven Zellen innerhalb der mFTSE^{MUG-Mel2/TGF-β+CM} und mFTSE^{MUG-Mel2/CM} unter allen Bedingungen am geringsten. Das stärkste CK14-Signal konnte bei mFTSE^{MUG-Mel2/MUCCarly1} und mFTSE^{MUG-Mel2/TGF-β} beobachtet werden. Korrelierend zu den Beobachtungen in den mit Hämatoxylin und Eosin gefärbten Querschnitten konnten bei mFTSE^{MUG-Mel2}, mFTSE^{MUG-Mel2/TGF-β}, mFTSE^{MUG-Mel2/TGF-β+CM}, als auch mFTSE^{MUG-Mel2/CM} HMB-45-positive Zellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte bei den mFTSE^{MUG-Mel2/MUCCarly1} kaum ein positives Signal für HMB-45 beobachtet werden (*Abbildung 4-23 C*).

Was den Glukosestoffwechsel betrifft, so wurde bei allen Modelltypen ein unterschiedliches Verbrauchsprofil in Bezug auf die verschiedenen Kulturbedingungen beobachtet. Während mFTSE^{MUG-Mel2} eine leichte Steigerung des Glukoseverbrauchs (d7=103 %, d14=103,5 %, d21=103 %) im Vergleich zu gesunden Kontroll-Modellen, auf welche normiert wurde, zeigten, wurde bei mFTSE^{MUG-Mel2/TGF-β} ein deutlich niedriger Glukoseverbrauch offenbar, welcher von 97,3 % auf 88,4 % über die angegebene Zeit sank. Während bei den mFTSE^{MUG-Mel2/TGF-β+CM} im Laufe der Zeit ein Anstieg der Glukoseaufnahme von d7 auf d14 von 20,2 % (Tag 7=116,4 %, Tag 14=136,6 %) zu verzeichnen war, gingen die Werte für d21 stark zurück, und waren ähnlich (d21=105,2 %) denen der Kontrollmodelle. Auch bei den mFTSE^{MUG-Mel2/CM} war im

Laufe der Zeit ein Anstieg der Glukoseaufnahme von 15,6 % zu verzeichnen mit dem höchsten Wert an d14. Von d7 bis d14 stieg die Glukoseaufnahme um 21,1 % (d7=89,3 %), während sie in den folgenden sieben Tagen um 5,5 % (d21=104,9 %) abnahm. Im Gegensatz dazu wurde bei mFTSE^{MUG-Mel2/MUCCarly1} zu jedem Messzeitpunkt ein deutlich niedriger Glukoseverbrauch im Vergleich zu den Kontrollmodellen offenbar (d7=97,2 %, d14=98,7 %, d21=95,6 %), welcher um 1,6 % im Laufe der angegebenen Zeit sank (*Abbildung 4-23 D*).

Was die Laktatproduktion betrifft, so wurde bei allen Modelltypen ähnliches beobachtet. Während die Laktatproduktion in mFTSE^{MUG-Mel2/TGF- β} über die angegebene Zeit von d7 mit 84 % auf 82,97 % an d21 sank, lag diese zu jedem Zeitpunkt niedriger als die des Kontroll-Modells (d7=108,21 %, d14=112,15 %, d21=106,8 %). Dagegen war die Laktatproduktion des mFTSE^{MUG-Mel2/TGF- β +CM} an d7 und d14 auffallend höher als die des Kontroll-Modells mit einem Anstieg von 28,07 % (d7=111,27 %, d14=139,34 %). Die Werte für d21 gingen stark zurück, und waren ähnlich (d21=104,55 %) denen der Kontrollmodelle. Bei den mFTSE^{CM} stieg die Laktatproduktion im Laufe der Zeit leicht an. An d7 und d14 war die Produktion etwas niedriger als beim entsprechenden Kontrollmodell (d7=99,6 %, d14=102,7 %), stieg aber im Laufe der Zeit leicht über die der Kontrollmodelle (d21=106 %). Insgesamt stieg die Produktion um 6,4 %. Obwohl auch bei mFTSE^{MUG-Mel2/MUCCarly1} ein Anstieg der Laktatproduktion um insgesamt 6,44 % zu verzeichnen war, lagen diese zu jedem Zeitpunkt niedriger als die des Kontroll-Modells (d7=87,4 %, d14=93,2 %, d21=93,84 %) (*Abbildung 4-23 D*).

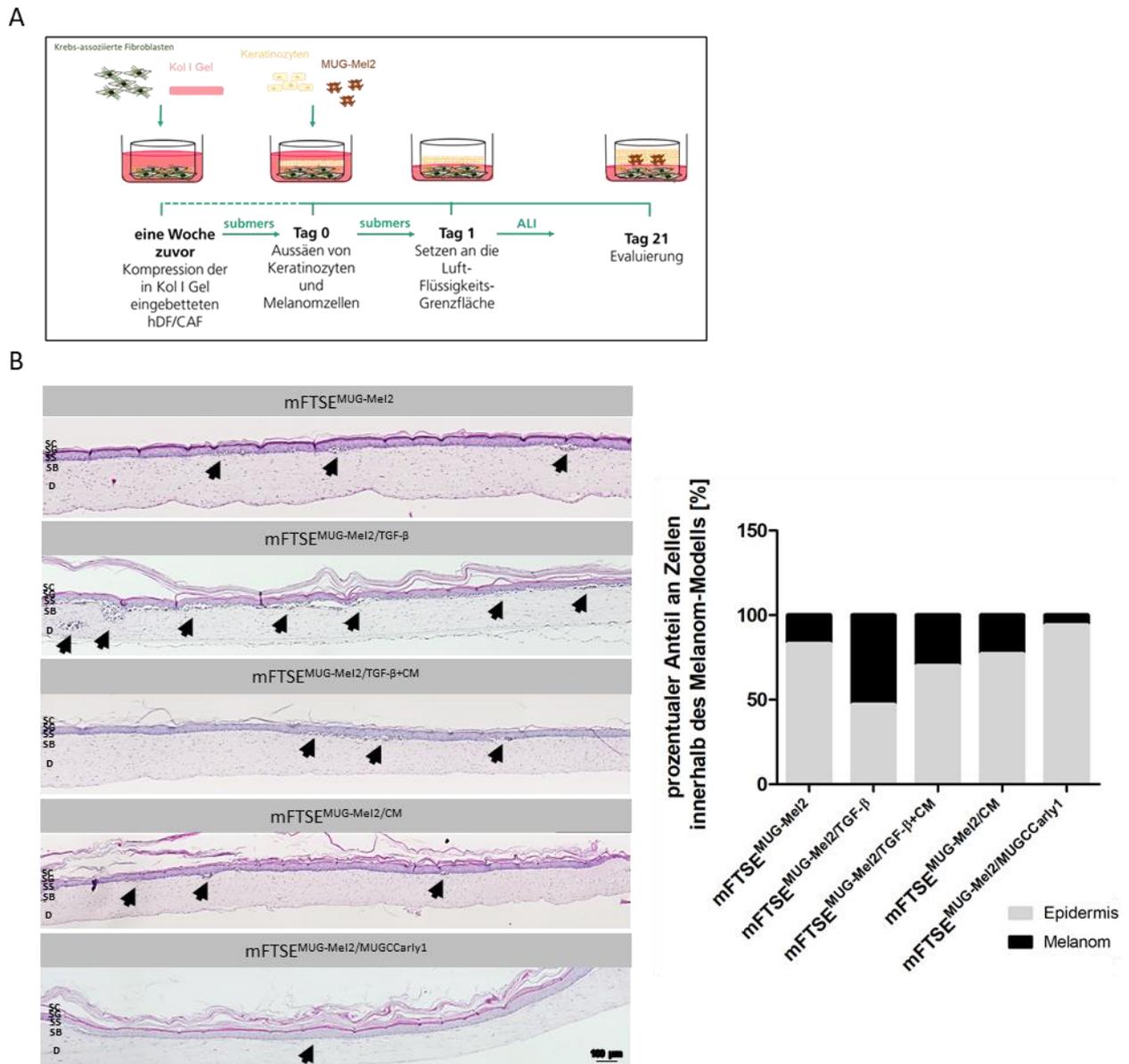


Abbildung 4-23: **Integration und Analyse von Krebs-assoziierten Fibroblasten in epidermal-dermale Melanom-Hautäquivalente.** (A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Unaktivierte juvenile, mit TGF- β oder konditioniertem Medium oder einer 1:1 Mischung aus beidem aktivierte hdF oder die CAF-Zelllinie MUGCCarly1 wurden für die Generierung von epidermal-dermalen Melanom-Modellen verwendet und hinsichtlich ihres Effektes analysiert. (B) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von epidermal-dermalen Melanom-Hautmodellen unter Verwendung verschiedenster (aktiverter) hdF. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, D = Dermis. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Die quantitative Analyse von Gewebeschnitten erfolgte mit der Software ImageJ.

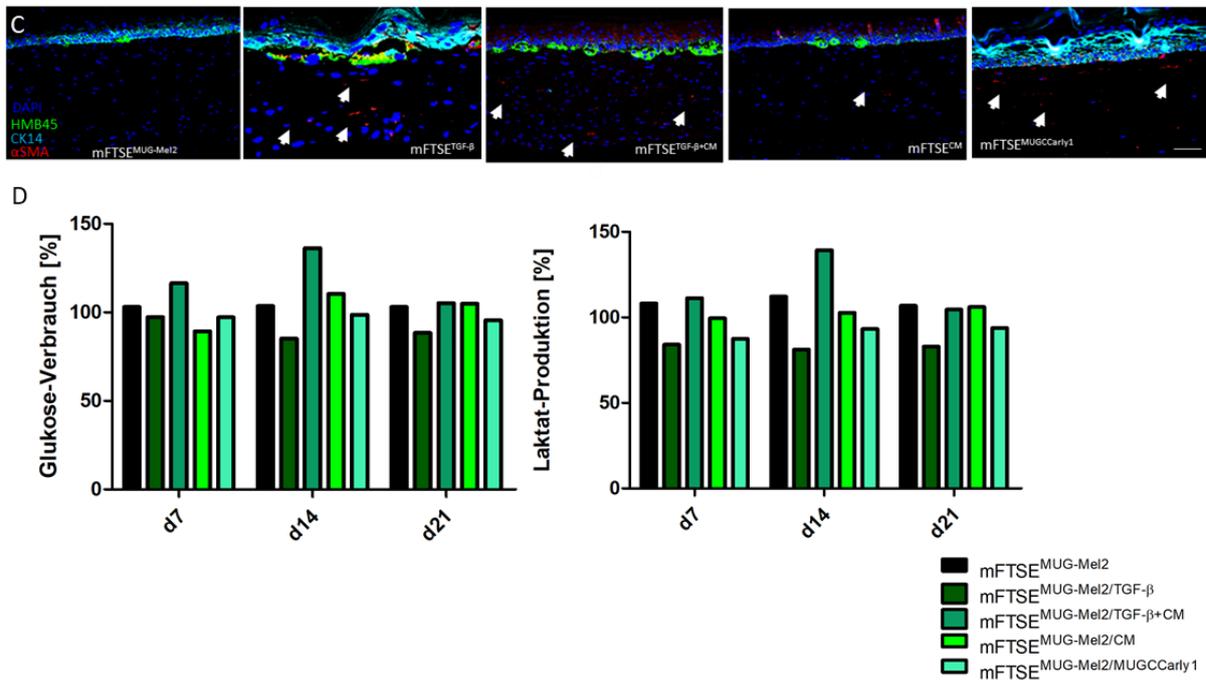


Abbildung 4-23: **Integration und Analyse von Krebs-assoziierten Fibroblasten in epidermal-dermale Melanom-Hautäquivalente.** (C) Immunfluoreszenzfärbung. Die Melanom-Hautäquivalente wurden mit dem Melanommarker HMB-45 (grün), dem Keratinozytenmarker CK14 (cyan) und dem CAF-Marker α SMA (rot) gefärbt. Krebs-assoziierte hdF sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m. (D) Bestimmung des Glukose-Verbrauchs (links) bzw. der Laktat-Produktion (rechts). Diese wurden im Überstand zu definierten Zeitpunkten (d7, d14, d21 nach ALI) während der gesamten Kulturdauer gemessen und auf die entsprechende Kontrolle normalisiert. (n=2).

4.4.3. Integration von T Zellen in die organotypischen Gewebe-Äquivalente

Um zukünftig den Effekt bzw. die Wirkung von ICIs in vitro belegen und abschätzen zu können und eine Annäherung an die in vivo Situation zu erzielen, sollte, da das Immunsystem wichtiger Bestandteil des TME ist, eine Immun-Komponente in Form von T Zellen in die organotypischen Gewebe-Äquivalente integriert werden. Das Vorhaben die Entwicklung von auf den Menschen übertragbaren Tumormodellen in der onkologischen Forschung voranzutreiben, sollte durch Steigerung der Komplexität zudem vorangetrieben werden.

Neben erfolgreichen Strategien zur Integration von T Zellen in epidermale (s. 4.4.3.1) und dermal-epidermale (s. 4.4.3.2) Melanom-Modelle, sind in *Tabelle 4-1* weitere Strategien aufgeführt, deren Umsetzung nicht zum gewünschten Ziel, zur Generierung immun-kompetenter organotypischer in vitro Modelle des malignen Melanoms, geführt haben.

Tabelle 4-1: Strategien zur Generierung immun-kompetenter organotypischer in vitro Modelle des malignen Melanoms.

Strategie	Umsetzung	Problem
Einwandern ins Modell	Etablierung von epidermalen Modellen basierend auf Membranen mit großen Poren	Kein selbstständiges Einwandern der T Zellen
Verletzungsfreies Einbringen	Topische Applikation	Kein Einwandern der T Zellen
Räumliche Nähe Effektor und Zielzelle	Injektion ins Melanom	Keine homogene Verteilung bzw Migration
Räumliche Nähe Effektor und Zielzelle	Sphäroid aus T Zellen mit/ohne Melanomzellen	Keine homogene Verteilung bzw Migration
Homogene Verteilung bzw Migration	Aktivierung via CCL19	Keine homogene Verteilung bzw Migration
Homogene Verteilung bzw Migration	Aktivierung via PMA/Ionomycin	Keine homogene Verteilung bzw Migration

4.4.3.1. Strategien zur Integration von T Zellen in epidermale Melanom-Modelle

Um T Zellen (T Zs) in epidermale Gewebe-Äquivalente zu integrieren, wurde die Strategie verfolgt, T Zs systemisch zu den humanen organotypische 3D Modellen zu verabreichen. Hierbei wurde ein cytotoxisches Milieu durch Zugabe CD3/CD28 aktivierter/unstimulierter T Zs zu epidermalen in vitro Haut-Modellen generiert. Nach 14-tägiger Kultivierung an der Luft_Flüssigkeits-Grenzfläche erfolgte die Ko-Kultur durch systemische Zugabe der 72 h pre-stimulierten T Zs für 48 h (*Abbildung 4-24 A I*). Um die Stoffwechselaktivität der OS-REp zu analysieren, wurde ein Viabilitätstest mittels MTT-Assay nach 48-stündiger Ko-Kultur durchgeführt (*Abbildung 4-24 A II*). Nur bei der Ko-Kultur mit CD3/CD28 aktivierten T Zs wurde eine Verringerung der Viabilität auf nahezu die Hälfte gemessen. Eine Ko-Kultur mit unstimulierten T Zs hatte keinen negativen Einfluss auf die Viabilität. Um einen morphologischen Überblick über die OS-REp und OS-Rep^{T Zellen} zu erhalten, wurden Querschnitte Hämatoxylin und Eosin gefärbt (*Abbildung 4-24 A III*). Histologisch waren OS-REp durch die Bildung einer mehrschichtigen gut stratifizierten und differenzierten Epidermis, bestehend aus den vier charakteristischen Epidermisschichten der menschlichen Haut Stratum Basale, Stratum Spinosum, Stratum Granulosum und Stratum Corneum gekennzeichnet. Nach Ko-Kultur mit unstimulierten T Zs war diese klassische Morphologie und Stratifizierung erhalten; lediglich im Vergleich zur Kontrolle etwas aufgelockerter. OS-Rep^{T Zellen} wiesen histopathologische Veränderungen des Hautgewebes auf, wie eine Veränderung der

Basalschicht, die Ausbildung einer subepidermalen Spalte, Bildung von Mikro-Vesikeln und das beginnende Ablösen der Epidermis.

Da die Porengröße der verwendeten Polycarbonat-Membran-Inserts mit $0,4\ \mu\text{m}$ ein Einwandern von Immunzellen unmöglich macht, wurden epidermale Haut- und Melanom-Modelle mit großen Poren ($8,0\ \mu\text{m}$) etabliert. Für die Modell-Generierung von OS-REp und mOS-REp basierend auf Membranen mit großen Poren, welche ein Einwandern der T Zs erlauben sollen, wurden zunächst die Poren der Polycarbonat-Membran-Inserts von einer Porengröße von $8,0\ \mu\text{m}$ an d0 zunächst durch Auftragen von Kollagen I Gel verschlossen. In definierten Mischverhältnissen wurden hEK oder hEK und Melanomzellen in Einzelsuspension anschließend darauf ausgesät und für 24 h submers kultiviert. An d1 wurden die Modelle ALI gesetzt und bis d21 unter Standardbedingungen kultiviert (*Abbildung 4-24 B I*). Für einen morphologischen Überblick erfolgte eine HE-Färbung eines Querschnitts von einem epidermalen gesunden Hautäquivalenten aufgebaut auf einer Membran mit großen Poren OS-Rep^{große Poren}. Histologisch waren diese, wie OS-REp, durch die Bildung einer mehrschichtigen gut stratifizierten und differenzierten Epidermis, bestehend aus den vier charakteristischen Epidermisschichten der menschlichen Haut Stratum Basale, Stratum Spinosum, Stratum Granulosum und Stratum Corneum gekennzeichnet, welche auf einer dünnen Schicht Kollagen I Gel, mit welchem die Poren verschlossen waren, gebildet war (*Abbildung 4-24 B II*).

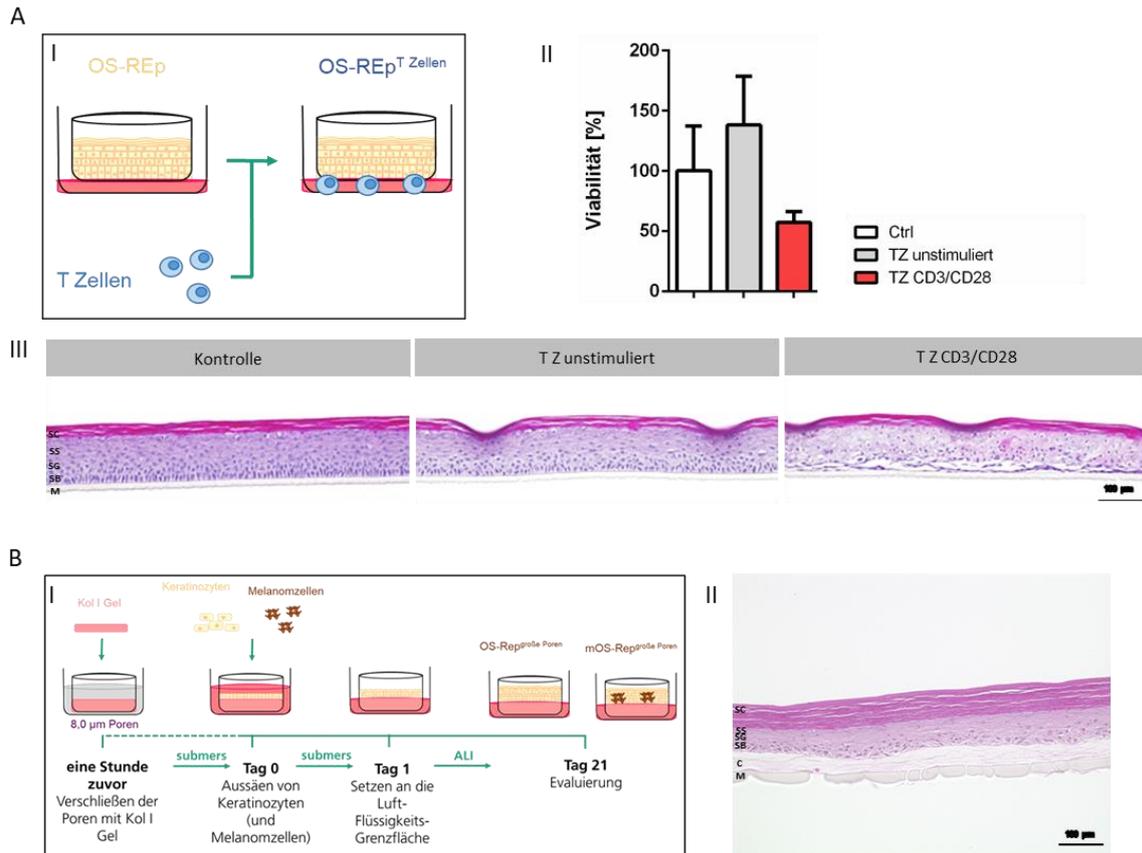


Abbildung 4-24: Strategien zur Integration von T Zellen (T Z) in epidermale Gewebe-Äquivalente. (A) Humane immunkompetente epidermale 3D Modelle. (I) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Generierung eines cytotoxischen Milieus durch Zugabe CD3/CD28 aktivierter/unstimulierter T Zellen zu epidermalen *in vitro* Haut-Modellen. Die Ko-Kultur erfolgte nach 14-tägiger Kultivierung an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche durch systemische Zugabe der 72 h pre-stimulierten T Zs für 48 h. (II) Analyse der metabolischen Aktivität der *in vitro* Modelle. Via MTT-Assays wurde nach 48-stündiger Ko-Kultur die Viabilität des Testsystems bestimmt. Diese wurde aus jeweils technischen Triplikaten bestimmt und auf unbehandelte Kontrollen normalisiert. (III) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von epidermalen gesunden Hautäquivalenten und Hautmodellen eines pathologischen Phänotyps. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. (B) Epidermale Haut- und Melanom-Modelle mit großen Poren. (I) Schematische Darstellung der Modell-Generierung von OS-Rep und mOS-Rep basierend auf Membranen mit großen Poren, welche ein Einwandern der T Zs erlauben sollen. Für die *in vitro* RHE-Modelle wurden die Poren der Polycarbonat-Membran-Inserts von einer Porengröße von 8,0 µm an Tag 0 zunächst durch Auftragen von Kollagen I Gel verschlossen. Anschließend wurden hEK oder hEK und Melanomzellen in Einzelsuspension in definierten Mischverhältnissen ausgesät. Am Tag 1 wurden die Modelle an die Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche (Air-Liquid-Interface, ALI) gesetzt und bis Tag 21 kultiviert. (II) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung eines Querschnitts von einem epidermalen gesunden Hautäquivalenten aufgebaut auf einer Membran mit großen Poren (OS-Rep^{große Poren}). SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, C = Kollagen I Gel, M = Membran. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

4.4.3.2. Strategien zur Integration von T Zellen in dermal-epidermale Melanom-Modelle

Um T Zs in dermal-epidermale Gewebe-Äquivalente zu integrieren, wurde die Strategie verfolgt, T Zs nach 19-tägiger Kultivierung an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche in mFTSE^{frühes Stadium} zu injizieren und für 48 h zu kultivieren (*Abbildung 4-25 A I*). Nach 48 h Ko-Kultur wurde im Überstand die IFN γ -Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die Menge an IFN γ lag beim immun-kompetenten mFTSE bei 119,42 pg/mL; im Überstand des mFTSE^{frühes Stadium} konnte kein IFN γ nachgewiesen werden (*Abbildung 4-25 A II*). Zudem wurde eine IF auf den T Zell-Marker CD3 durchgeführt. Zahlreiche CD3-positive Zellen konnten in der Dermis detektiert werden (*Abbildung 4-25 A III*). Für einen morphologischen Überblick wurde von Querschnitten eines mFTSE und in die Dermis injizierter T Zs Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Histologisch war das mFTSE durch die Ausbildung einer dermalen Komponente, in der die Fibroblasten homogen im Hydrogel verteilt vorlagen, die Bildung einer mehrschichtigen gut stratifizierten und differenzierten Epidermis, bestehend aus den vier charakteristischen Epidermisschichten Stratum Basale, Stratum Spinosum, Stratum Granulosum und Stratum Corneum, sowie die Ausbildung von Melanomclustern an der dermoepidermalen Junktionszone, die deutlich vom umgebenden gesunden Gewebe abgegrenzt waren, gekennzeichnet. Die in die Dermis injizierten T Zs wiesen die typische runde Morphologie auf und befanden sich am Ort der Injektion; im Kollagen I Gel konnte der Injektionskanal anhand der Verletzung durch die Kanüle identifiziert werden (*Abbildung 4-25 A IV*).

Da im mFTSE keine homogene Verteilung der T Zs erzielt werden konnte bzw. keine Migration beobachtet werden konnte, wurde als weitere Strategie zur Integration von T Zs in Melanom-Modelle ein immun-kompetentes mFTSE^{PA6} generiert. Hierzu wurden auf 2 Wochen alte dermale Komponenten T Zs ausgesät und unter ein 19 Tage altes mFTSE^{PA6} für 48 h gespannt (*Abbildung 4-25 B I*). Um einen morphologischen Überblick zu erhalten, wurde eine Hämatoxylin und Eosin-Färbung von Querschnitten eines dermal-epidermalen immun-kompetenten mFTSE^{PA6} mit in der Dermis integrierter T Zs angefertigt. Histologisch war das immun-kompetente mFTSE^{PA6} durch die Bildung einer mehrschichtigen gut stratifizierten und differenzierten Epidermis, bestehend aus den vier charakteristischen Epidermisschichten Stratum Basale, Stratum Spinosum, Stratum Granulosum und Stratum Corneum, die Ausbildung von Melanomclustern, die deutlich vom umgebenden gesunden Gewebe abgrenzbar waren, an der dermoepidermalen Junktionszone, sowie die Ausbildung einer dermalen Komponente, in der die Fibroblasten homogen im Hydrogel verteilt vorlagen, gekennzeichnet. Zudem befanden sich die T Zs in der Dermis zwischen den beiden dermalen Schichten, zwischen derer sie ausgesät und gespannt wurden (*Abbildung 4-25 B II*).

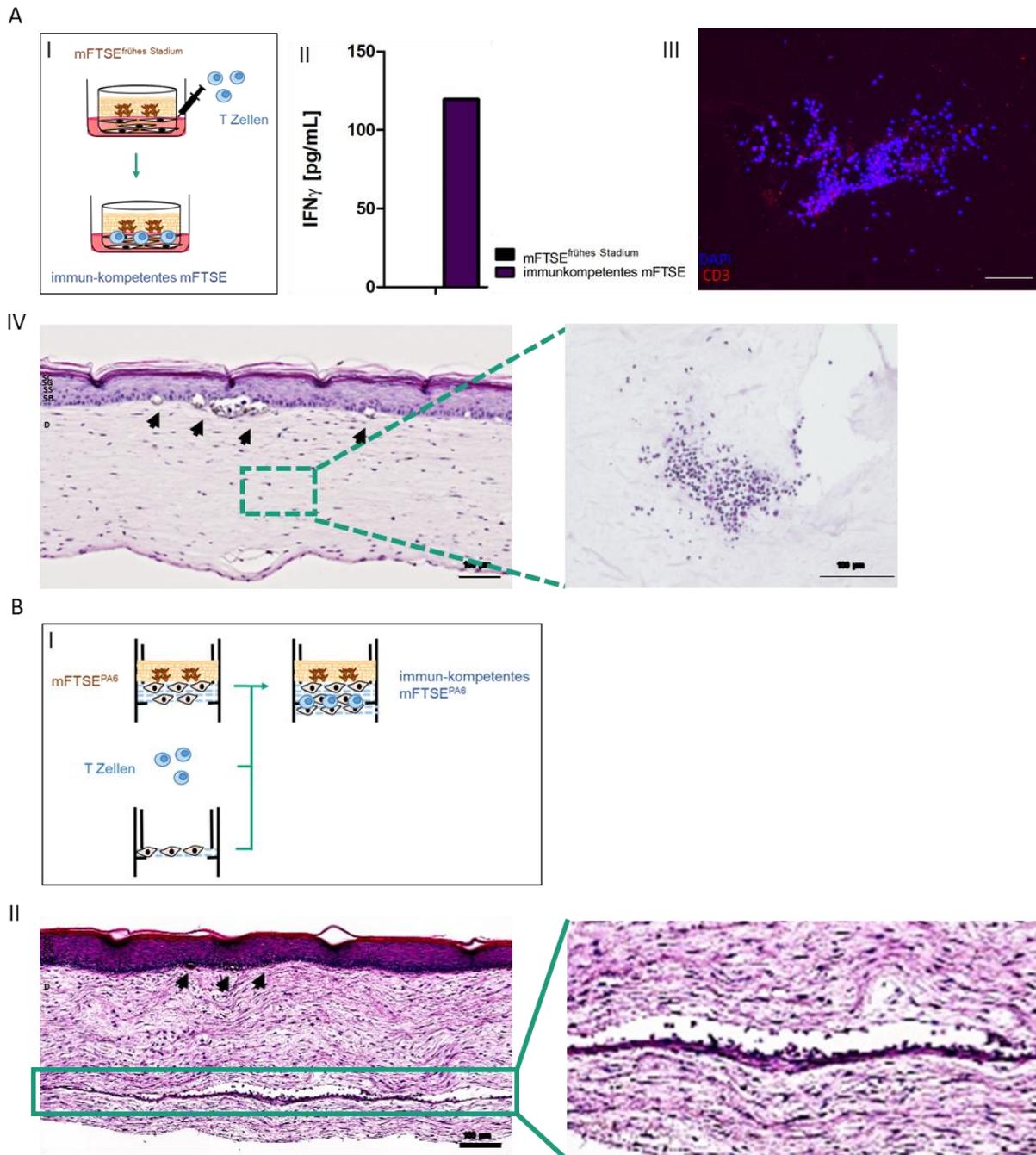


Abbildung 4-25: Strategien zur Integration von T Zellen (T Z) in dermal-epidermale Gewebe-Äquivalente. (A) Immun-kompetentes mFTSE. (I) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Injektion der T Zs nach 19-tägiger Kultivierung an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche und Kultivierung für 48 h. (II) Bestimmung der IFN γ -Konzentration mittels ELISA. Diese wurde im Überstand 48 h nach Ko-Kultur bestimmt (n=1). (III) Immunfluoreszenzfärbung. Das Gewebe-Äquivalent wurde mit dem T Zell-Marker CD3 (rot) gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. (IV) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten eines dermal-epidermalen mFTSE und in die Dermis injizierter T Zs. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, D = Dermis. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. (B) Immun-kompetentes mFTSE^{PA6}. (I) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. T Zs wurden auf 2 Wochen alte dermale Komponenten ausgesät und für 48 h unter ein 19 Tage altes mFTSE^{PA6} gespannt. (II) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten eines dermal-epidermalen immun-kompetenten mFTSE^{PA6} mit in die Dermis integrierter T Zs. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, D = Dermis. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

5. Diskussion

Die weltweite Inzidenz des malignen Melanoms, einer multifaktoriellen Erkrankung mit zahlreichen Treibermutationen, die zur malignen Transformation beitragen [147, 20], hat in den letzten fünf Jahrzehnten enorm zugenommen [148]. Nur eine kleine Teilmenge der Patienten spricht auf konventionelle Anti-Tumor Therapien an aufgrund der patientenspezifischen Unterschiede und der zellulären Heterogenität, sowie der Ursachen- und Mutationsvielfalt des malignen Melanoms [149, 150]. Eine erfolgreiche Behandlung des malignen Melanoms in Zukunft setzt daher die Etablierung personalisierter und tumorspezifischer Melanomtherapien voraus, für die die Entwicklung adäquater Testsysteme unabdingbar ist.

Dafür wurde in dieser Arbeit ein umfangreiches Portfolio an humanen 3D organotypischen Melanom-Modellen (Abbildung 5-1) etabliert, bei welchem die hier vorgestellten Modelle abhängig von der wissenschaftlichen Fragestellung als einfachere epidermale bis hin zu unterschiedlich komplexen Vollhautmodellen Anwendung finden, viele potentielle therapeutische Angriffspunkte und Melanom-Subtypen im Modell widerspiegeln und verschiedene Stadien der Tumor-Entwicklung reflektieren können (s. 4.1).

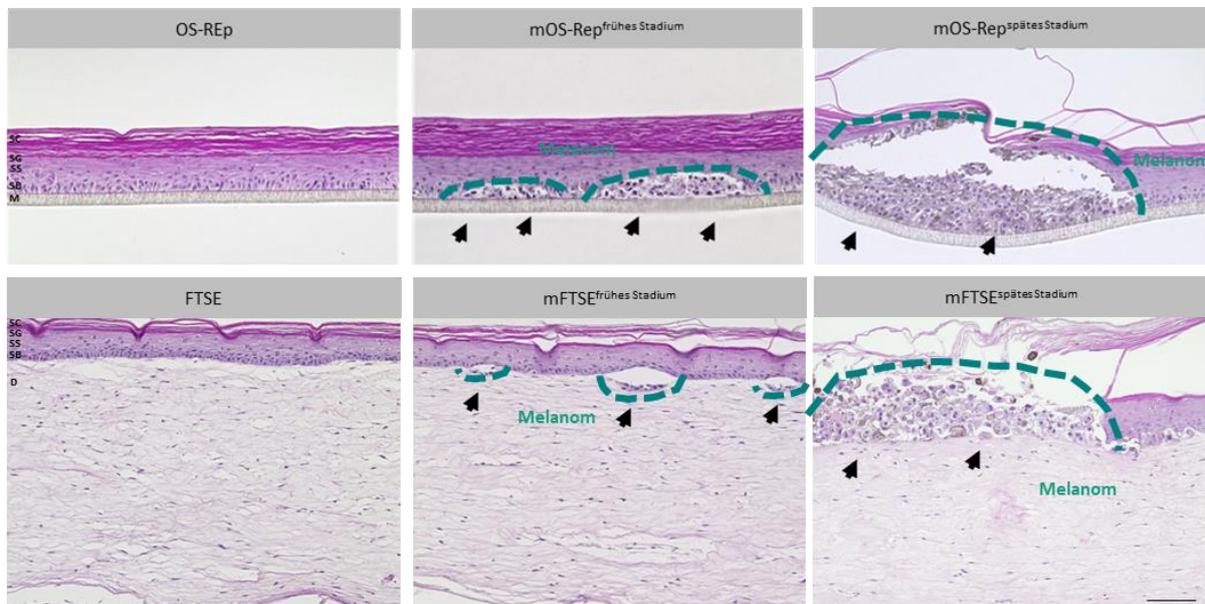


Abbildung 5-1: **Portfolio humaner 3D organotypischer in vitro Modelle des malignen Melanoms.** Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von epidermalen gesunden Hautäquivalenten (OS-REp) und Melanom-Hautmodellen (mOS-Rep) beider Tumorstadien (obere Reihe), sowie von dermal-epidermalen gesunden Hautäquivalenten (FTSE) und Melanom-Vollhautmodellen (mFTSE) beider Tumorstadien (untere Reihe). SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, D = Dermis, M = Membran. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m.

Da sich verschiedene Melanome hinsichtlich Aggressivität, Ursprung und Treibermutationen unterscheiden, wurden in unserem Labor zehn Zelllinien systematisch mit demselben experimentellen Ansatz untersucht [123]. Wir konnten eine erfolgreiche Melanomentwicklung in 3D-Modellen u.a. für die Melanomzelllinien A11, SK-MEL-28, MUG-Mel2 und MeWo beobachten (*Abbildung 4-6*). Das Verhältnis von Melanomzellen zu Keratinozyten, das für die Bildung von Tumoren in der Epidermis erforderlich ist, hängt auch von der Melanomzelllinie ab und wurde für jede Zelllinie individuell, durch Auswertung verschiedener Aussaatverhältnisse ermittelt. Suboptimale Verhältnisse würden dazu führen, dass Melanomzellen in den Modellen nicht detektiert werden könnten oder im Gegensatz dazu das Modell von Melanomen überwuchert würde. Durch erfolgreiche Integration unterschiedlichster humaner Melanomzelllinien ins Modell und der Tatsache, dass sich diese durch ihre Treibermutationen, die zur Krankheitsentstehung beitragen, unterscheiden, werden unterschiedliche Ansprüche an potentielle therapeutische Angriffspunkte und somit viele Melanom-Subtypen in vitro widergespiegelt. Ferner konnte gezeigt werden, dass es sowohl in den epidermalen (*Abbildung 4-3*) als auch den dermal-epidermalen (*Abbildung 4-5*) Melanom-Modellen möglich ist, verschiedene Stadien der Tumor-Entwicklung über die Zugabe von Melanomzellen in Einzelsuspension bzw. von Melanom-Sphäroiden widerzuspiegeln. Histologisch unterschieden sich frühes und spätes Tumorstadium deutlich durch Größe, Form und Ausdehnung der gebildeten Melanomcluster. Die Morphologie des mOS-REp und mFTSE war mit der in vivo vergleichbar (s. 4.1), da die Modelle die Entwicklung u.a. aller vier charakteristischen Strata zeigten, wobei die Melanomcluster physiologischerweise von der Basalschicht einer gut geschichteten Epidermis ausgehen (*Abbildung 4-1*) bzw. die physiologische Bildung von Tumornestern an der dermoepidermalen Junctionszone zu beobachten war, wobei die Melanome selbst die gleiche aufgelockerte und zerklüftete Morphologie aufwiesen wie in vivo (*Abbildung 4-5*). Bei mOS-REp und mFTSE ergab die immunhistologische Analyse die Expression klinisch relevanter melanom-assoziierten Marker (*Abbildung 4-3*), die mit dem Hautmelanom in vivo vergleichbar sind (*Abbildung 4-5*). Obwohl die epidermale Morphologie durch die Tumornester erheblich gestört war, war die Barrierefunktion der Modelle insgesamt nicht beeinträchtigt, was auf das Vorhandensein eines intakten Stratum corneums zurückzuführen ist, das den Hauptbeitrag zur Hautbarriere leistet [123].

Um die Melanomagenese oder die Wirksamkeit von Medikamenten zu untersuchen, wurden verschiedene In-vitro-Ansätze unter Verwendung unterschiedlicher Melanomzelllinien entwickelt [103]. Die herkömmliche 2D Zellkultur stellt jedoch nur einen reduktionistischen Ansatz dar, bei dem wichtige Merkmale der hochkomplexen Tumormikroumgebung fehlen, die das Tumorverhalten nachweislich erheblich beeinflussen [104]. Dementsprechend wurden

verschiedene Mausmodelle entwickelt, um die Melanomagenese, das Tumorwachstum und die Ausbreitung in einem komplexen In-vivo-System zu untersuchen [105]. Dennoch haben Maus-Melanom-Modelle wie gentechnisch veränderte Mäuse und Xenograft- oder syngene Transplantationsmausmodelle verschiedene Tücken. Neben den ethischen Bedenken, die mit Tierversuchen verbunden sind, haben Mausmodelle in den letzten Jahren zunehmend wissenschaftliche und wirtschaftliche Kritik auf sich gezogen. Ein Hauptkritikpunkt ist der geringe Vorhersagewert von Tiermodellen aufgrund ihrer geringen Reproduzierbarkeit und begrenzten Übertragbarkeit auf die menschliche Biologie, die in genetischen und phänotypischen Unterschieden zwischen den Arten oder physischen Unterschieden zwischen den Versuchstieren begründet ist. Außerdem beeinträchtigt die systemische Komplexität lebender Organismen die Fähigkeit, eine bestimmte Beobachtung auf eine mögliche Ursache zurückzuführen, da ein solches präklinisches Modellsystem durch zahlreiche Variablen gekennzeichnet ist [107, 106]. Infolgedessen ist die Erfolgsquote neuer Therapien in der Onkologie extrem niedrig (~5 %) [98]. Daher hat die Anwendung neuartiger, prädiktiverer Modelle in der präklinischen Entwicklung von Arzneimitteln das Potenzial, den Zeit- und Kostenaufwand für die Entwicklung neuer Therapien erheblich zu verringern und die Zahl der Tierversuche zu reduzieren. Neben 2D-Kulturen von Melanomzelllinien und Tiermodellen gibt es mehrere Ansätze zur Untersuchung des Melanoms in vitro. 3D Modelle stellen einen guten Kompromiss zwischen dem Fehlen der Mikroumgebung in 2D-Zellkulturen und der Komplexität von Tiermodellen dar [108]. Die ersten Ansätze für eine 3D-Anordnung der Tumorzellen sind Sphäroide. Diese Modelle können aus Tumorzellen allein oder in Kombination mit anderen tumorassoziierten Zellen, z. B. Fibroblasten [109] oder Endothelzellen [110], erzeugt werden. Im Vergleich zur 2D-Zellkultur ermöglichen Sphäroide Zell-Zell-Kontakte sowie die Bildung einer heterogenen Tumormasse durch einen Sauerstoff- und Nährstoffgradienten (*Abbildung 4-1*) [111–115]. Sphäroide spiegeln jedoch nur den Tumor und nicht das gesunde Gewebe wider, in dem sich der Tumor entwickelt. Daher wird die Interaktion zwischen Tumor und Gewebe nicht ausreichend wiedergespiegelt, was die Vorhersagbarkeit bei der Arzneimittelprüfung einschränkt. Außerdem können topisch verabreichte Arzneimittel nicht in Sphäroiden getestet werden. Hautmodelle ahmen die Anatomie der menschlichen Haut nach und könnten daher als elegantes Modell dienen, um die Entstehung eines Melanoms und seine Behandlung oder die zelluläre und molekulare Wechselwirkung zwischen dem Tumor und den umgebenden Hautzellen zu untersuchen. Dieser Ansatz wurde in verschiedenen Studien verwendet, hauptsächlich durch die Integration von Melanomzelllinien in dermal-epidermale Modelle [151–162]. Diese Vollhautmodelle werden in zahlreichen Forschungsprojekten verwendet, sind aber aufgrund der schwierigen Standardisierung noch nicht in behördlich anerkannte Richtlinien aufgenommen worden. Um jedoch in präklinischen Studien eingesetzt werden zu können, müssen die Modelle eine

Hochskalierung und Reproduzierbarkeit ermöglichen. Dies unterstreicht den Bedarf an der Entwicklung weniger komplexer 3D-In-vitro-Testsysteme, wie z. B. der rekonstruierten humanen Epidermis. Wir konnten zeigen, dass unser RHE mit integriertem Melanom (s. 4.1.1) die Lücke zwischen der Einfachheit herkömmlicher 2D-Zellkulturen oder Sphäroide und der Komplexität von Vollhautäquivalenten und Tiermodellen schließen kann [123]. Dieses Testsystem bietet eine angemessene Darstellung des menschlichen Gewebes bzw. Nachahmung der Mikroumgebung des Melanoms und kontrolliert gleichzeitig die Anzahl der Variablen innerhalb des Systems. Im Jahr 2023 befanden sich 1025 Therapien gegen das maligne Melanom in klinischen Phasen und erforderten in präklinischen Phasen eine beträchtliche Anzahl von Tiermodellen für Wirksamkeits- und Sicherheitstests [96]. Die Verwendung von RHE mit integrierten Melanomen wird daher das von Russel und Burch [116] erstmals beschriebene 3R-Prinzip unterstützen, indem die Zahl der Tierversuche in den präklinischen Phasen der Entwicklung von Anti-Melanom-Therapien reduziert wird [123]. Da in der normalen Epidermis die Keratinozyten die Proliferation und Lokalisierung der Melanozyten regulieren und während der Umwandlung von Melanozyten in Melanomzellen Tumorzellen der strengen Kontrolle der Keratinozyten durch die Herunterregulierung von Adhäsionsmolekülen entgehen [18, 60] stellt unser mRHE ein elegantes Modell dar, welches ein Melanom in der Epidermis nachahmt (*Abbildung 4-1*). RHE bieten einen guten Kompromiss zwischen in vivo-Korrelation und Standardisierung und werden in der Kosmetik-, Chemie- und Pharmaindustrie eingesetzt [123]. Andere Modelle, die als präklinische Testplattformen für die in vitro-Arzneimittelentdeckung eingeführt wurden, reichen von di-, tri- über multizelluläre Melanom-Sphäroide [163], spiegeln aber oft nicht das Gewebe wider, in dem sich der Tumor entwickelt. Darüber hinaus wurden komplexere Modelle entwickelt, wie z. B. Co-Kulturmodelle mit Hautzellen [164], komplexe Hautäquivalente mit Blut- und Lymphkapillaren [159] oder integrierten Immunzellen [165, 166], ein Melanom-Modell auf Sheet-Basis [159] und humanen Hautäquivalenten auf einer Chip-Plattform [167]. Diese Modelle sind jedoch schwierig in Hochdurchsatz-Screenings zu implementieren. Darüber hinaus ist die Standardisierung und damit die industrielle Anwendbarkeit für die präklinische Arzneimittelprüfung begrenzt, da die zunehmende Komplexität dieser Testsysteme sich nachteilig auf die Reproduzierbarkeit und das Scale-up auswirken. Anders das entwickelte mFTSE (s. 4.1.2), das diese Anforderungen adressiert bei gleichzeitig begrenzter Anzahl von Variablen im komplexeren Melanom-Modell, welches die Mikroumgebung des Melanoms nachahmt und eine physiologische Entwicklung des malignen Melanoms an der dermoepidermalen Junctionszone erlaubt (*Abbildung 4-4*).

Ein Aspekt, um in Zukunft den Einsatz von Tieren in der Melanomforschung zu minimieren, ist der Ersatz von aus Tieren gewonnenen Komponenten für die Zellkultur. Ein Nachteil unseres Modells im Hinblick auf den Tierschutz ist, dass die hier verwendete Methode teilweise von

Komponenten abhängt, die in oder von Tieren hergestellt werden, wie z.B. Kollagen I, FCS oder Antikörper.

Die Abhängigkeit von Gerüstmaterialien tierischen Ursprungs ist eine der größten Herausforderungen bei der Entwicklung von Weichgewebe in vitro. Ohne die Verwendung von tierischen Matrixkomponenten stellt die Erweiterung klassischer dichter elektrogewebener Gerüste mit hoher Porosität und beweglichen Fasern eine vollsynthetische und definierte Alternative zu kollagengel-basierten Gewebemodellen (s. 4.1.2) dar und ist ein vielversprechendes System für die Konstruktion von Gewebe-Äquivalenten als in vitro Modelle oder in vivo Implantate [119]. Die ECM von Weichteilgeweben in vivo hat bemerkenswerte biologische und strukturelle Eigenschaften. So sorgt die ECM für mechanische Stabilität, während sie gleichzeitig durch zellulären Umbau während der Gewebereifung oder Heilungsprozesse umgestaltet werden kann. Moderne synthetische Alternativen bieten diese Schlüsseleigenschaften jedoch nicht an. Synthetische Matrizen werden in der Regel vollständig abgebaut oder sind inert, was den zellulären Umbau betrifft. Auf der Grundlage eines verfeinerten Elektrosponnverfahrens wurde eine Methode entwickelt, um synthetische Gerüste mit hochporösen Faserstrukturen und erweiterten Faser-Faser-Abständen zu erzeugen [119]. Da dieser Ansatz Zellmigration, Matrixumbau und ECM-Synthese ermöglicht, bietet das Gerüst eine ideale Plattform für die Erzeugung von Weichgewebe-Äquivalenten, wie ein mehrschichtiges Hautäquivalent einschließlich subdermalen Fettgewebes [119] oder dermal-epidermale Melanom-Modelle unterschiedlicher Tumorstadien (*Abbildung 4-10*). Um tierische Materialien zukünftig zu ersetzen, bietet die Entwicklung von 3D-Gewebsmodellen auf der Grundlage dieser Faserkonstrukte einen entscheidenden Schritt. Darüber hinaus können durch den Ersatz von aus Tieren gewonnenen Medienzusätzen durch humane oder rekombinante Alternativen in naher Zukunft vollständig tierfreie Gewebekonstrukte generierbar sein. Um die Komplexität von künstlichen Geweben zu erhöhen, eignen sich hochporöse faserige Gerüste besonders für den Aufbau von schichtartigen, hierarchischen Geweben oder wie in dieser Arbeit gezeigt die Integration einer Immun-Komponente (*Abbildung 4-25*).

Obwohl aus einem umfangreichen Portfolio an organotypischen in vitro Melanom-Modellen gewählt werden kann (s. 4.1), die die wichtigsten morphologischen, funktionellen und mikroökologischen Merkmale des malignen Melanoms in vivo adäquat nachahmen, fehlen ihm zelluläre Komponenten, die für die Tumorprogression wichtig sind. So ist beispielsweise das Gefäßsystem wichtig, um das Wachstum und Fortschreiten des Melanoms über die Tumorangiogenese zu unterstützen. Dieser Prozess basiert auf einem komplexen Zusammenspiel von u.a. Endothel- und Tumorzellen und ist für die Versorgung eines wachsenden Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff unerlässlich. Aufgrund eines angiogenen Schalters vermitteln Wachstumsfaktoren, die von Tumorzellen sezerniert werden, die

Angiogenese und lösen die angiogene Reaktion von Endothelzellen aus, was zur Bildung neuer Blutgefäße führt [168, 169]. Außerdem können Tumorzellen in das Blut- oder Lymphsystem eindringen und Metastasen im gesamten Körper bilden. Um beide Prozesse in vitro zu untersuchen, wird ein vaskuläres Netzwerk benötigt, z. B. durch den Einsatz von Endothelzellen, xenogenen vaskularisierten Matrices [170] oder neuartige Bio-Printing-Ansätze [171] oder Multi-Organ-on-a-Chip-Systeme.

Neben dem Gefäßsystem, sind typischen Bestandteilen des TME das Tumorstroma, zu dem CAFs, infiltrierende Immunzellen wie Makrophagen und Lymphozyten, lösliche Moleküle und die ECM als wichtige Komponenten zählen [43]. Für das Wachstum, das Überleben, die lokale Invasion und die metastatische Ausbreitung von Tumorzellen ist die dynamische Interaktion zwischen TME und Tumorzellen entscheidend [44]. Um die Interaktion des Melanoms mit der Mikroumgebung im in vitro Modell zu analysieren, erfolgte in 4.1.4 eine histologische Charakterisierung organotypischer in-vitro-Modelle des malignen Melanoms. Zudem wurde, um die Hemmung des Fortschreitens des Melanoms in einem epidermal-dermalen Melanom-Modell zu analysieren und die Auswirkungen des dermalen Teils auf die Melanomentwicklung bewerten zu können, die Nährstoff-Konkurrenz (s. 4.4.1.1), der Einfluss adulter Zellen (s. 4.4.1.2) und die Auswirkungen von Krebs-assoziierten Fibroblasten (s. 4.4.2) im in vitro Melanom-Modell untersucht. Tumorzellen stehen in engen Kontakt mit den Keratinozyten, welche die Proliferation von Melanozyten regulieren [70]. Durch Herunterregulieren von Zelladhäsionsmolekülen, wie z. B. E-Cadherin, P-Cadherin, Desmoglein und Connexine können Melanomzellen dieser Kontrolle entgehen. Gleichzeitig wird die Interaktion mit Fibroblasten und Endothelzellen gefördert durch die Hochregulierung von N-Cadherin [60]. E-Cadherin spielt eine Rolle als Tumorsuppressor bei der EMT, während der es von den Transkriptionsfaktoren Snail, Slug, Twist und Zeb1/2 unterdrückt wird, was zu einem Verlust der epithelialen Eigenschaften und einer erhöhten Migrations- und Invasionsfähigkeit atypischer Melanozyten führt [71]. Melanozyten und Keratinozyten haben als Folge der verminderten Expression von E-Cadherin eine schwächere Zell-Zell-Adhäsion. Zudem werden einzelne Melanomzellen aus dem Primärtumor leichter freigesetzt. Im Gegensatz dazu wird die Invasion und Metastasierung atypischer Melanozyten durch die vermehrte Expression von N-Cadherin erhöht [72]. Zudem führt die Veränderung der Mikroumgebung zur radialen Wachstumsphase des Melanoms. Währenddessen kommt es zur Interaktion von distal differenzierten Notch-Liganden exprimierenden Keratinozyten mit Melanomzellen. Dies initiiert die Invasion durch die Basalmembran der Epidermis und ermöglicht die Migration in die Dermis [73]. Fibroblasten, die durch eine Vielzahl von Faktoren rekrutiert und aktiviert werden, dagegen leisten tumorunterstützende Arbeiten [46] und sind für die Umgestaltung der ECM zugunsten des Tumors verantwortlich. Durch die Herunterregulierung von E-Cadherin, wird nicht nur eine erhöhte Expression von N-Cadherin erzielt [47], sondern auch die Rekrutierung

von Fibroblasten. Dadurch haben Melanomzellen die Möglichkeit, mit anderen Zellen, die N-Cadherin exprimieren, wie Fibroblasten und Endothelzellen, zu interagieren [49, 48], was dazu führen könnte, dass Fibroblasten aktiviert werden. Verschiedene Faktoren, die die Tumorentwicklung und Metastasierung fördern, werden von CAFs freigesetzt. Neben der Expression der membrangebundenen Peptidase FAP, das Kollagen spaltet und somit das Tumorwachstum stimuliert [50, 51], exprimieren CAFs auch lösliche Proteasen vom Typ der MMPs [52], die verschiedene Bestandteile der ECM wie Fibrinogen, Kollagen, Laminin, Elastin und andere Wachstumsfaktoren spalten [54, 53]. Nach dem Abbau der ECM hat der Tumor sofort mehr Raum, um sich auszubreiten [53], wobei das Tumorwachstum durch die Aktivierung von MMPs und die Spaltung von Wachstumsfaktoren und Zytokinen weiter gefördert wird. Neben den Proteinen, die für die Transformation der ECM verantwortlich sind, synthetisieren CAFs auch Wachstumsfaktoren und Zytokine. Zu den sezernierten Faktoren gehören TGF- β , HGF, VEGF, PDGF, SDF-1, bFGF und Interleukine IL-6, IL-8 und IL-1 β . Diese Faktoren haben alle eine Stimulation des Tumorwachstums oder des Metastasierungspotenzials des Tumors [57, 53, 58] zur Folge. Adulte oder seneszente Fibroblasten sezernieren mehr EGF-ähnliche Wachstumsfaktoren, welche RAS-mutierte Melanomzellen zur Umgehung der Apoptose verwenden und die Progression des Melanoms stimulieren (s. 4.4.1.2) [172, 173]. Durch Umgestaltung der ECM durch Synthese geringerer Mengen an Kollagen I und III, sowie Sezernierung von Kollagenasen und MMP-3 fördern sie zudem die Fähigkeit von Melanomzellen, in die Dermis einzuwandern. Zudem sezernieren sie den Wnt-Antagonisten sFRP2, der verschiedene Signalkaskaden in Melanomzellen aktiviert, was in einer geringeren Expression von β -Catenin resultiert und mit einer erhöhten Metastasierung einhergeht [174, 175].

Die histopathologische Beurteilung von Gewebeschnitten mittels Hämatoxylin und Eosin und immunhistochemischer Färbungen ist nach wie vor der Goldstandard für die Diagnose des malignen Melanoms in der Klinik [20], und wird auch im Labor bisher standardmäßig durchgeführt, um den Behandlungserfolg in 3D-Melanom-Modellen zu beurteilen. Abgesehen von der Tatsache, dass Immunfluoreszenz- und Immunhistochemische Färbungen eine morphologische Beobachtung und zelltypspezifische Lokalisierung von Behandlungseffekten direkt im Gewebe ermöglichen, weisen histologische Färbungen mehrere praktische Mängel auf, die sie zur Feststellung des Behandlungserfolgs ungeeignet machen. So geben gefärbte Gewebeschnitte nur Einblicke in einen bestimmten Modellteil, repräsentieren aber nicht die gesamte Modellsituation angemessen wieder. Die Abbildung des gesamten Modells durch sequenzielles Färben von Querschnitten, beispielsweise zur Quantifizierung der Größenreduktion von Melanomen infolge einer medikamentösen Behandlung, ist zwar möglich, aber mit erheblichem Zeitaufwand verbunden, so dass sich solche histologischen

Färbemethoden nicht für Hochdurchsatzanalysen eignen. Darüber hinaus ist die Durchführung und Auswertung der histologischen Färbungen nicht nur zeitaufwendig, sondern aufgrund der subjektiven Auswahl der Mikroskopiестellen auch schwer zu standardisieren. Das optische Messsystem „MediTOM“ wurde zur zerstörungsfreien Detektion der Tumorpro- und – regression im epidermalen in vitro Melanom-Modell in das bestehende Methoden-Spektrum implementiert und erlaubt die digitalisierte Erfassung von Veränderungen an den Zellen und die Analyse pigmentierter in-vitro Modelle des malignen Melanoms automatisiert mittels Durchlicht im Schattenwurfverfahren (s. 4.2.1). Um auch die Pro- und Regression nicht-pigmentierter Melanome in den organotypischen Melanom-Modellen zerstörungsfrei beobachten zu können, wurde die OCT als neues technisches Analyse-Verfahren etabliert. Dieses Analyse-Verfahren ermöglicht eine tomografische Aufnahme bzw. Querschnitt des gesamten epidermalen und dermal-epidermalen in vitro Melanom-Modells (s. 4.2.2).

Der Stoffwechsel von normalen Zellen und Tumorzellen unterscheidet sich erheblich [32]. Die Melanomageneese ist mit einer signifikanten Veränderung der Stoffwechselaktivität von Tumorzellen verbunden, die sich in einer erhöhten Glukoseumsatzrate und einer verstärkten Laktatproduktion äußert. Diese erhöhte glykolytische Verstoffwechselung von Glukose in Gegenwart von Sauerstoff wurde ursprünglich von Otto Warburg beobachtet [34, 35]. Gleichzeitig verändern die Tumorzellen die metabolische Zusammensetzung des umgebenden extrazellulären Milieus und beeinflussen so die Mikroumgebung des Tumors. Vergleichbar mit in vivo war der Gesamtglukoseverbrauch der Melanom-Modelle bei beiden Zelllinien erhöht, wenn auch nur bei mOS-REp^{A11} signifikant [123]. Darüber hinaus konnte ein lokal erhöhter Glukoseverbrauch innerhalb der Melanomnester mit Hilfe von fluoreszenzmarkierter Glukose nachgewiesen werden (Daten werden nicht gezeigt). Diese Ergebnisse zeigen, dass die metabolischen Eigenschaften des Melanoms in den Modellen mit denen des Melanoms in vivo korrelieren. Die Visualisierung des lokalen Glukoseverbrauchs zeigt, dass die erhöhte Glukoseaufnahme auf die Tumornester beschränkt ist und sich nicht gleichmäßig über das Modell verteilt. 2-P-FLIM ermöglicht die nicht-invasive Messung der Stoffwechselverschiebung zwischen Melanom und gesunden Zellen. Die Fluoreszenzlebensdauer von NAD(P)H ist höher (~2,4 ns), wenn es mit Enzymen im Krebszyklus und mit Komplex I der Elektronentransportkette interagiert. NAD(P)H hat eine kürzere Fluoreszenzlebensdauer (~0,4 ns), wenn es während der Glykolyse gebildet wird oder frei im Zytoplasma vorliegt [176, 127]. Wenn der τ_{avg} -Wert höher ist, ist der Beitrag von proteingebundenem NAD(P)H zum zellulären Stoffwechsel größer als der von freiem NAD(P)H, was bedeutet, dass sich die Zelle mehr auf OxPhos als auf die Glykolyse als Hauptenergieproduktionsweg verlässt [127, 177, 178]. Die Ergebnisse in Abbildung *Abbildung 4-14* zeigen für beide Modelle, dass die Keratinozyten eine statistisch signifikant längere Fluoreszenzlebensdauer aufweisen, was auf eine höhere Abhängigkeit von OxPhos hindeutet,

während das Melanom kürzere Fluoreszenzlebensdauern aufweist, die auf die Glykolyse hindeuten. Dies steht im Einklang mit dem Warburg-Effekt und der stärkeren Abhängigkeit von der Glykolyse. Dies geschieht, um sich anzupassen und die Aufnahme und den Einbau von Nährstoffen für die Biosynthese zu erleichtern, die für die Vermehrung benötigt werden [37, 179–181]. Um den zellulären Stoffwechsel mithilfe von 2-P-FLIM weiter zu untersuchen, wurde auch die FAD⁺-Fluoreszenzintensität erfasst. FAD⁺ entsteht bei der Interaktion seiner nicht fluoreszierenden Form FADH₂ mit Komplex II der Elektronentransportkette und wird während des Krebszyklus oxidiert [182, 183]. Zusätzlich zur NAD(P)H-Fluoreszenzintensität ist es möglich, die ORR zu berechnen. Die Ergebnisse in Abbildung *Abbildung 4-14* zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied in beiden Modellen beim Vergleich zwischen den höheren Werten der ORR in Keratinozyten und der geringeren ORR von Melanomzellen. Die Analyse dieser Daten deutet darauf hin, dass die Summe der Fluoreszenzintensität von FAD⁺ mit NAD(P)H in Melanomzellen geringer ist, was die ORR verringert. Interessanterweise zeigt dies eine stärkere Abhängigkeit des Glutaminolyse-Wegs in den Melanomzellen. Wie von Varone et al. [137] beobachtet, hängt dieser ORR-Trend mit einem erhöhten Glutaminverbrauch zusammen und wurde durch biochemische Tests in präkanzerösen Epithelgeweben bestätigt. In der Tat hat sich gezeigt, dass der höhere Glutaminolyseverbrauch ein metabolisches Merkmal von Tumorzellen ist, das mit einem höheren Glukoseverbrauch und einer höheren Laktatsekretion einhergeht [184–187]. 2-P-FLIM-ermöglicht es einem somit, die humanen epidermalen Melanom-Modelle nicht-invasiv hinsichtlich des Tumor-Metabolismus und die Stoffwechselverschiebung zwischen gesunden Zellen und Tumorzellen im selben Sichtfeld zu untersuchen [137, 184–186].

Um die Eignung und Anwendbarkeit der etablierten Melanom-Hautäquivalente für die Medikamentenevaluierung und das Wirkstoffscreening von anti-Tumor Therapeutika zu prüfen, wurden die Modelle hinsichtlich klinisch verwendeter etablierter anti-Tumor Therapeutika evaluiert (s. 4.3.1) und in der präklinischen Therapieentwicklung validiert (s. 4.3.2). Bevor der BRAF-Inhibitor Vemurafenib, der MEK-Inhibitor Cobimetinib und eine Kombination aus beiden an den Modellen getestet werden konnten, mussten geeignete Wirkstoffkonzentrationen dieser zielgerichteten Therapeutika auf der Grundlage der wachstumshemmenden Wirkung der Wirkstoffe in der 2D-Zellkultur bestimmt werden (s. 4.3.1.1). Die in diesem Zusammenhang zunächst untersuchten Wirkstoffkonzentrationen wurden in Absprache mit der Dermatologie des Universitätsklinikums Würzburg ausgewählt, da in klinischen Studien zu diesen oral verabreichten Wirkstoffen variable und patientenspezifische Plasmakonzentrationen berichtet wurden [188–190]. Die morphologische Beurteilung des Ansprechens auf die Behandlung, die Bestimmung der Lebensfähigkeit und die Analyse des Glukoseverbrauchs in 2D-Kulturen zeigte, dass nicht nur die BRAF-mutierte Zelllinie SK-MEL-28, sondern auch die BRAF-Wildtyp-Zelllinie hEK auf eine gezielte

Melanombehandlung mit Vemurafenib, Cobimetinib und einer Kombination aus beiden ansprach. Erwartet worden war, dass nur BRAF^{V600E}-mutierte Zellen wie SK-MEL-28, nicht aber BRAF-Wildtyp hEK auf den selektiven BRAFV600E-Inhibitor Vemurafenib ansprechen würden. Bei Exposition gegenüber HaCaT-Zellen, einer spontan immortalisierten menschlichen Keratinozyten-Zelllinie [191], zeigte Vemurafenib nur eine minimale Zytotoxizität bei den in 2D kultivierten Zellen. Darüber hinaus wurde über eine erhöhte Proliferation von HaCaT-Zellen berichtet, wenn diese mit Vemurafenib-Konzentrationen von bis zu 2 µM behandelt wurden [192]. Im Gegensatz dazu wurde bei hEK, das mit 1 µM Vemurafenib behandelt wurde, eher ein verringertes Zellwachstum als eine Hyperproliferation beobachtet (*Abbildung 4-15*). In Anbetracht der Tatsache, dass es sich bei den in dieser Studie verwendeten Keratinozyten um primäre Zellen handelte, die bekanntermaßen chemoempfindlicher auf Medikamente reagieren als genetisch immortalisierte Zelllinien [193], wurde angenommen, dass die unerwartete Reaktion von hEK auf Vemurafenib auf das Fehlen von zellschützenden Diffusionsbarrieren unter 2D-Kulturbedingungen zurückzuführen ist. Vermutete zytotoxische Eigenschaften des Lösungsmittels DMSO, in dem der Wirkstoff suspendiert war [194], konnten in Lösungsmittelkontrollen nicht bestätigt werden, zudem ist DMSO bei Konzentrationen unter 10 % als nicht toxisch bekannt [195]. Im Gegensatz zu Vemurafenib, welches ausschließlich V600E-mutiertes BRAF in bösartigen Zellen hemmt, zielt die hemmende Wirkung von Cobimetinib auf die Wildtyp-MEK-Kinasen MEK1 und MEK2 sowohl in gesunden als auch in bösartigen Zellen [196]. Dementsprechend wurde erwartet, dass alle in dieser Studie verwendeten Zelltypen dosisabhängig auf die Behandlung mit Cobimetinib ansprechen würden. Tatsächlich zeigte die Analyse der Lebensfähigkeit und des Glukoseverbrauchs eine konzentrationsabhängige Reaktion von hEK, SK-MEL-28 und MeWo auf die Anwendung von Cobimetinib (*Abbildung 4-15*). Diese nicht selektive hemmende Wirkung von Cobimetinib, die in dieser Studie bei allen Zellpopulationen beobachtet wurde, veranschaulicht, warum MEK-Inhibitoren, die als Einzeltherapeutika eingesetzt werden, bei Melanompatienten eine höhere Inzidenz von unerwünschten Arzneimittelwirkungen und gleichzeitig eine geringere Behandlungswirksamkeit aufweisen als BRAF-Inhibitoren, die als Einzeltherapie eingesetzt werden [20]. Dennoch werden MEK-Inhibitoren trotz verschiedener Nebenwirkungen in Kombination mit selektiven BRAF-Inhibitoren zur Behandlung des fortgeschrittenen BRAF-mutierten Melanoms eingesetzt, da der häufigste Resistenzmechanismus gegenüber der Einzeltherapie mit BRAF-Inhibitoren durch die Reaktivierung des MAPK-Signalwegs über MEK vermittelt wird [197]. Es wurde berichtet, dass eine Kombinationstherapie aus Vemurafenib und Cobimetinib das Auftreten der MAPK-bedingten erworbenen Resistenz, die häufig mit der Anwendung von Einzelwirkstoffen verbunden ist, verzögert oder sogar verhindert und gleichzeitig die durch Vemurafenib vermittelte hemmende Wirkung auf BRAFV600E-mutierte Melanome in vivo verstärkt [198].

Auch wenn aus dieser Studie keine Rückschlüsse auf die Entwicklung einer Arzneimittelresistenz gezogen werden konnten, konnte ein verstärktes Ansprechen von SK-MEL-28 auf die Kombinationstherapie durch eine signifikante Abnahme der zellulären Lebensfähigkeit und des Glukoseverbrauchs im Vergleich zur alleinigen Anwendung von Vemurafenib beobachtet werden (*Abbildung 4-15*). Nachdem die hemmende Wirksamkeit und das Zusammenspiel der Anti-Melanom-Wirkstoffe in der 2D-Zellkultur untersucht wurden, wurde die Anwendung von Medikamenten auf mOS-REp durchgeführt, um deren Eignung als standardisiertes präklinisches Testsystem für die Therapiebewertung zu bewerten (*Abbildung 4-16*). Da die Voraussetzung für den erfolgreichen Einsatz eines Modellsystems als Medikamententestplattform die Verfügbarkeit von prädiktiven Read-Out-Assays ist, die eine standardisierte Bestimmung des Behandlungserfolgs ermöglichen, wurde sich auch auf die Etablierung solcher potentieller Methoden konzentriert. Es sollte eine standardisierte Bewertungsmethode gefunden werden, die eine spezifische Erkennung von hemmenden Behandlungseffekten auf Melanomzellen innerhalb des Gewebemodells ermöglicht. Die Schwierigkeit, eine solche Methode zu finden, ergibt sich aus der Tatsache, dass Melanom-Modelle aus zwei verschiedenen Zelltypen - Keratinozyten und Melanomzellen - hergestellt werden. Daher muss die gewünschte Methode eine klare Unterscheidung zwischen den beiden Zellpopulationen ermöglichen, um eine spezifische Überwachung der Behandlungseffekte auf Melanomzellen zu erlauben. Alle verfügbaren Standardmethoden, die zur Bewertung des Behandlungserfolgs in Melanom-Hautmodellen verwendet wurden, wiesen ihre eigenen Vorteile und Einschränkungen auf. Eine jede wies sich eingeschränkt als geeignete eigenständige Methode für eine detaillierte und standardisierte Bewertung des Behandlungserfolgs aus, da die meisten von ihnen bedingt spezifisch genug sind, um eine behandlungsinduzierte Beobachtung auf einen melanomspezifischen Effekt zurückzuführen. Um dieses Problem zu überwinden, wird langfristig an der Re-Isolierung von Keratinozyten und Melanomzellen aus Melanom-Hautmodellen gearbeitet, das die selektive Analyse beider Zelltypen und damit die Verwendung von Standard-Laborverfahren zur Bewertung des Behandlungserfolgs ermöglicht.

Die Entwicklung von zielgerichteten Therapien und Immuntherapien hat zu einer erheblichen Verbesserung der Gesamtüberlebenszeit geführt, insbesondere bei nicht-NRAS-mutierten Melanomen (v.a. BRAF-mutiert). Leider fehlen wirksame zielgerichtete Therapien für Patienten mit NRAS-mutierten Melanomen aufgrund der zunehmenden Resistenz und hohen Aggressivität, was im Allgemeinen zu einer schlechteren Prognose führt [140]. Daher besteht bis heute ein ungedeckter klinischer Bedarf an nachhaltig wirksamen therapeutischen Strategien für NRASmut-Melanompatienten. Es wurden beträchtliche Anstrengungen unternommen den MAPK-Signalweg allein oder in Kombination mit anderen Medikamenten zu hemmen. Neue Klassen von Inhibitoren wie PROTAC (proteolysis targeting chimera), die den

Einsatz neuartiger Mono-, Dual- oder sogar Triple-Targeting-Therapien beinhaltet, oder mRNA-Vakzine, die eine gezielte Immunantwort gegen personalisierte Tumorantigene stimulieren können, werden angemessen untersucht [140, 199]. Dennoch sind intrinsische und erworbene Resistenzen wahrscheinlich, und manchmal sind die Toxizitäten und Nebenwirkungen für den Patienten massiv belastend. Für die Mehrheit der fortgeschrittenen Melanompatienten müssen neue Klassen pharmakologischer Wirkstoffe in Betracht gezogen werden, um ein langes und gut verträgliches progressionsfreies Überleben zu erreichen. Gemeinsam mit der medizinischen Universität Graz wurde die Wirkung eines bisher gut charakterisierten Anti-Tumor-Peptids, RDP22 (R-DIM-P-LF11-322), auf die hochaggressive Melanom-Metastasen-Zelllinie MUG-Mel2, die eine NRAS-Mutation trägt, untersucht. Um die Anzahl der Tiere zu reduzieren, wurde dem In-vivo-Experiment eine Abfolge von Modellstudien vorgeschaltet. Beginnend mit Studien zur PS-Exposition von MUG-Mel2, liposomalen und zellulären PS-Peptid-Interaktionsstudien und Toxizitätsstudien in vitro mit 2D- und 3D-Kulturen und einem organotypischen Melanom-Modell, folgten die in vivo-Studien mit einem MUG-Mel2-Xenotransplantat [132]. Wie bereits für verschiedene Krebszelltypen wie Glioblastom, Rhabdomyosarkom [200], Brustkrebs [201, 202], Leukämie [203] und Melanom und deren Metastasen [204, 200] gezeigt werden konnte, weist MUG-Mel2 im Vergleich zu nicht-malignen Zellen, wie hdf, einen deutlich erhöhten PS-Gehalt auf, und zwar um das Zweifache. Diese negative Ladung auf Krebszellen kann durch kationische amphipathische Peptide wie RDP22 von neutralen, nicht PS-exponierenden Plasmamembranen nicht-maligner Zellen unterschieden und somit selektiv angegriffen werden [205]. In der Tat konnte eine Kollokalisierung von PS an Liposomen sowie von MUG-Mel2 mit dem Peptid RDP22 gezeigt werden. Kürzlich konnte nachgewiesen werden, dass das von Melanomzellen des Typs A375 freigesetzte PS wie ein Türschloss für den spezifischen Eintritt von Peptiden wie RDP22 in die Krebszelle wirkt, um anschließend durch Interaktion mit inneren Zielstrukturen wie dem Golgi-Apparat den Zelltod durch Apoptose effektiv auszulösen [144]. In-vitro-Studien mit MUG-Mel2 zeigen ebenfalls eine hohe Spezifität von etwa dem 7,5-fachen für MUG-Mel2 ($LC_{50} \text{ MUG-Mel2 } 8,5 \mu\text{M}$) im Vergleich zu hdf ($LC_{50} \text{ hdf } 63,6 \mu\text{M}$) [141]. Ebenso wurde gezeigt, dass RDP22 in den MUG-Mel2-Zellen hauptsächlich Apoptose auslöst. Wie bereits für RDP22 berichtet, ist der durch Apoptose ausgelöste Zelltod mit einer krebsspezifischen Toxizität verbunden, im Gegensatz zu unspezifischen Peptiden wie R-DIM-LF11-318, die eine Nekrose auslösen, die sowohl maligne als auch nicht maligne Zellen schädigt [144]. Um die In-vivo-Bedingungen im Rahmen der Studie besser nachzuahmen, wurden die In-vitro-Experimente auf 3D-Kulturen ausgeweitet. Zuvor konnte gezeigt werden, dass RDP22 den Zelltod in Tumor-Sphäroiden von Melanomzellen des Typs A375 und sogar in Mischungen von Melanom- und normalen Hautfibroblasten, die den Tumor mit Tumorstroma nachahmen, auslöst, während Sphäroide aus normalen Fibroblasten bei den anti-tumoraktiven Konzentrationen nicht

signifikant geschädigt wurden [141]. Die Fähigkeit zum Eindringen in den Kern und zur effizienten Abtötung von MUG-Mel2-Sphäroiden wurde auch in der vorliegenden Studie beobachtet, was eine notwendige Eigenschaft eines wirksamen Anti-Tumormittels ist. Darüber hinaus wurden mit MUG-Mel2 [206] erfolgreich organotypische In-vitro-Modelle von Melanomen erzeugt, die topisch mit dem Peptid oder dem Vehikel behandelt wurden (*Abbildung 4-17*). Wie zuvor gezeigt, reifte das Melanom innerhalb einer physiologisch geschichteten Epidermis. Die anhaltende Pigmentierung von MUG-Mel2 in den In-vitro-Modellen [132] ermöglichte den zerstörungsfreien Nachweis der Tumorprogression und -regression während der gesamten Kulturdauer mit dem selbst entwickelten MediTOM-Gerät. Die Durchlichtmikroskopie zeigte einen massiven Rückgang des Tumorwachstums nach der Behandlung mit RDP22 und ermöglichte die Bewertung der Wirksamkeit des potenziellen Anti-Tumor Therapeutikums. Außerdem verdeutlichten die metabolische Aktivität und die zelluläre Integrität sowie die Proliferationsraten nach der Behandlung eine selektiv präventive Abtötung von MUG-Mel2 in den 3D-Hautmodellen. Obwohl die organotypischen Modelle die komplexen Tiermodelle und das menschliche Gewebe bereits adäquat imitieren, fehlen ihnen nachteiligerweise noch wichtige Komponenten der Tumormikroumgebung. Somit können Tierversuche noch nicht vollständig ersetzt, aber deutlich reduziert werden und helfen, unabhängig von speziesspezifischen Unterschieden zu entscheiden, ob Tierversuche indiziert sind oder nicht. Nach schrittweisen Untersuchungen der Wirksamkeit in immer anspruchsvolleren Modellen lässt sich sagen, dass das Anti-Tumor-Peptid RDP22 einen neuen Ansatz für die Behandlung von MUG-Mel2, einem NRAS-mutierten Melanom mit einem hohen Bedarf an kurativer Behandlung, bietet.

Neben zielgerichteten Therapien haben Immuntherapien in jüngster Zeit das Überleben von Patienten mit malignem Melanom signifikant verlängert [207]. Bisher konnte der Effekt von ICIs in vitro jedoch noch nicht belegt werden, was den massiven Einsatz von Tiermodellen in der Entwicklung dieser Therapieformen notwendig macht. Um das Ergebnis dieser neuen Therapien zukünftig vorhersagen zu können, wurde darauf abgezielt, Komponenten des Immunsystems in in vitro Melanom-Modelle zu integrieren (s. 4.4.3). Durch die Integration von T Zellen könnten immunkompetente Modelle als Testplattform dienen, um die Wirksamkeit von Immuntherapeutika wie Checkpoint-Inhibitoren oder chimären Antigenrezeptor-T Zellen (CAR T Zellen) [208] oder CAR-Zellen auf Basis natürlicher Killerzellen [209] zu bewerten. Herausforderndstes Ziel neben der Integration war das Erreichen einer homogenen Verteilung der T Zellen im Hautmelanom-Modell, Grundvoraussetzung für die Testung der ICIs, da nur so die zelluläre Interaktion zwischen T Zellen und Melanom erreicht werden kann. Diese konnte bisher nicht erzielt werden. Die unzureichende Migration könnte durch die hohe Kollagenkonzentration von 48 mg/mL in den mFTSE begründet liegen. Dadurch sind zwar die

biophysikalischen Eigenschaften der Modelle vergleichbarer zur in vivo Situation, für die Migration der T Zellen müssen allerdings noch andere Ansätze evaluiert werden.

Allgemein ermöglichen die hier etablierten Melanom-Modelle die Vorhersage der Wirkung gezielter Krebstherapien auf Tumore mit unterschiedlichen Treibermutationen. Moderne Krebstherapien greifen immer gezielter in veränderte Signalwege ein, was die Effizienz der Therapien erhöht, aber nur bei einem bestimmten Subtyp des Melanoms funktioniert. Die entwickelten Modelle können diese Heterogenität durch die Einführung verschiedener Zelllinien mit unterschiedlichen Treibermutationen abbilden und unterstützen damit die effiziente präklinische Entwicklung neuer zielgerichteter Therapien. In Zukunft könnte die Verwendung von patienteneigenen Zellen auch eine Vorhersage des Erfolgs von Therapien in der Klinik ermöglichen, was einen wichtigen Beitrag zur personalisierten Medizin darstellt.

6. Fazit und Ausblick

Diese Arbeit erlaubte eine erhebliche Weiterentwicklung des humanen organotypischen 3D Modells des Malignen Melanoms als in vitro Testsystem für die Bewertung der Wirksamkeit von anti-Tumor Therapeutika. Es konnten unterschiedlich komplexe Melanom-Modelle etabliert werden, die abhängig von der wissenschaftlichen Fragestellung als einfachere epidermale bis hin zu unterschiedlich komplexen Vollhautmodellen Anwendung finden können. Durch Integration unterschiedlichster humaner Melanomzelllinien ins Modell, die sich durch ihre Treibermutationen unterscheiden, die zur Krankheitsentstehung beitragen, wird das Widerspiegeln vieler Melanom-Subtypen im Modell ermöglicht und unterschiedliche Ansprüche an potentielle therapeutische Angriffspunkte gestellt. Ferner ist es möglich, verschiedene Stadien der Tumor-Entwicklung widerzuspiegeln. Zudem bieten sich in den etablierten Modellen einzigartige Möglichkeiten, um die Interaktion humaner Tumorzellen und gesunder Zellen, sowie Komponenten des TMEs in einem Gewebeverband zu untersuchen. Die Integration technischer Analyse-Verfahren erlaubt die zerstörungsfreie Detektion der Tumor- Pro- und Regression, die Beurteilung der Wirksamkeit von potenziellen Anti-Tumor-Therapien sowie der Evaluierung des Tumor-Metabolismus. Es konnte zudem für bestimmte Therapie-Ansätze des malignen Melanoms, wie zielgerichtete Therapien, die hervorragende Eignung als präklinisches Testsystem zur Wirksamkeitsbewertung unter Beweis gestellt werden.

Perspektivisch eignen sich die etablierten Modelle durch Simulation der Tumor-Mikroumgebung zur präklinischen Validierung neuer Tumor-Therapeutika, sowie der Erforschung der Melanomagene und pathologischer Vorgänge, von der Tumor-Formierung bis zur Metastasierung. Zur Aufklärung molekularer und zellbiologischer Mechanismen des zerebralen Tropismus des malignen Melanoms, der häufigsten Todesursache von Patienten mit malignem Melanom, kann basierend auf Multi-Organ-on-a-Chip-Systemen in vitro in einem humanisierten Gewebekontext die systemischen Prozesse der zerebralen Metastasierung abgebildet und analysiert werden. Generell ermöglicht eine Implementierung in ein fluidisches System eine Langzeitkultivierung der Modelle ohne manuellen Mediumwechsel über Zeiträume von über vier Wochen. Langfristig ermöglichen immun-kompetente Melanom-Modelle die Austestung neuer Immun- und Zelltherapien in einem voll humanen System. Methodisch kann das Implementieren einer Immun-Kompetenz in ein in vitro Gewebe-Äquivalent auf immun-medierte Erkrankungen übertragen werden, wie Psoriasis, Atopische Dermatitis oder Graft-versus-Host Disease. Aufgrund der patientenspezifischen Unterschiede in jeder Tumorerkrankung und der zellulären Heterogenität spricht nur eine kleine Teilmenge der Patienten auf Standard-Therapien an; daher ist die personalisierte Medizin ein wichtiger Schritt in der Krebstherapie. Testsysteme müssen diese Populationsunterschiede

berücksichtigen, um das Ansprechen in klinischen Kohorten zu imitieren. Durch die Verwendung von patienteneigenen Tumorzellen zur Generierung der in vitro Modelle können diese zukünftig als neuartiges Instrument in der Präzisionsmedizin eingesetzt werden, z.B. für die Vorhersage individueller Therapien.

Insgesamt konnte ein entscheidender Beitrag geleistet werden, die Effizienz der Vorhersagekraft der in der Präklinik zur Ermittlung der Wirksamkeit von Substanzen verwendeten Modelle zu erhöhen. Die in dieser Studie entwickelten in vitro Melanom-Modelle überwinden Limitationen bisheriger Modelle und gestatten ein Testen von Therapien präklinisch nahe an der in vivo Situation. Dadurch kann eine fokussierte Vorauswahl von Wirksubstanzen erfolgen und gleichzeitig signifikant zur Reduktion der beträchtlichen Zahl der Tierversuche in den präklinischen Phasen der Entwicklung von Anti-Melanom-Therapien beigetragen werden.

Literaturverzeichnis

1. Miller AJ, Mihm MC (2006) Melanoma. *New England Journal of Medicine* 355:51–65. <https://doi.org/10.1056/NEJMra052166>
2. Garbe C, Peris K, Hauschild A et al. (2010) Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline. *European Journal of Cancer* 46:270–283. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.10.032>
3. Damsky WE, Rosenbaum LE, Bosenberg M (2011) Decoding Melanoma Metastasis. *Cancers* 3:126–163. <https://doi.org/10.3390/cancers3010126>
4. Winder M, Virós A (2018) Mechanisms of Drug Resistance in Melanoma. *Handb Exp Pharmacol* 249:91–108. https://doi.org/10.1007/164_2017_17
5. Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2019) Krebs in Deutschland 2015/2016. <https://doi.org/10.25646/5977.3>
6. Matthews NH, Li W-Q, Qureshi AA et al. (2017) Epidemiology of Melanoma. In: Ward WH, Farma JM (eds) *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*, Brisbane (AU)
7. Ward WH, Farma JM (eds) (2017) *Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy*, Brisbane (AU)
8. Leitlinienprogramm Onkologie S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms: Version 3.3 – Juli 2020 AWMF-Register-Nummer: 032/024OL
9. Krieter M et al. Das maligne Melanom. *MMW Fortschritte der Medizin* 161(10): 42-50 (2019). In:
10. Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR et al. (2014) Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo* 28:1005–1011
11. Matthias Goebeler HH (2017) *Basiswissen Dermatologie*
12. Köhler C, Nittner D, Rambow F et al. (2017) Mouse Cutaneous Melanoma Induced by Mutant BRAF Arises from Expansion and Dedifferentiation of Mature Pigmented Melanocytes. *Cell Stem Cell* 21:679-693.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2017.08.003>
13. Baggiolini A, Callahan SJ, Montal E et al. (2021) Developmental chromatin programs determine oncogenic competence in melanoma. *Science* 373:eabc1048. <https://doi.org/10.1126/science.abc1048>
14. Kozovska Z, Gabrisova V, Kucerova L (2016) Malignant melanoma: diagnosis, treatment and cancer stem cells. *Neoplasma* 63:510–517. https://doi.org/10.4149/neo_2016_403
15. Bandarchi B, Ma L, Navab R et al. (2010) From melanocyte to metastatic malignant melanoma. *Dermatol Res Pract* 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/583748>
16. Lin JY, Fisher DE (2007) Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445:843–850. <https://doi.org/10.1038/nature05660>

17. Shain AH, Bastian BC (2016) From melanocytes to melanomas. *Nat Rev Cancer* 16:345–358. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.37>
18. Gurzu S, Beleaua MA, Jung I (2018) The role of tumor microenvironment in development and progression of malignant melanomas - a systematic review. *Rom J Morphol Embryol* 59:23–28. <https://doi.org/Review>
19. Wang JX, Fukunaga-Kalabis M, Herlyn M (2016) Crosstalk in skin: melanocytes, keratinocytes, stem cells, and melanoma. *J Cell Commun Signal* 10:191–196. <https://doi.org/10.1007/s12079-016-0349-3>
20. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C et al. (2015) Melanoma. *Nat Rev Dis Primers* 1:15003. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.3>
21. McCourt C, Dolan O, Gormley G (2014) Malignant melanoma: a pictorial review. *Ulster Med J* 83:103–110
22. Daud A, Bastian BC (2012) Beyond BRAF in melanoma. *Curr Top Microbiol Immunol* 355:99–117. https://doi.org/10.1007/82_2011_163
23. Dhillon AS, Hagan S, Rath O et al. (2007) MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 26:3279–3290. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210421>
24. Heppt MV, Siepmann T, Engel J et al. (2017) Prognostic significance of BRAF and NRAS mutations in melanoma: a German study from routine care. *BMC Cancer* 17:536. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3529-5>
25. Hayward NK, Wilmott JS, Waddell N et al. (2017) Whole-genome landscapes of major melanoma subtypes. *Nature* 545:175–180. <https://doi.org/10.1038/nature22071>
26. Davies EJ, Reijers S, van Akkooi A et al. (2022) Isolated limb perfusion for locally advanced melanoma in the immunotherapy era. *European Journal of Surgical Oncology* 48:1288–1292. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2022.01.027>
27. Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M (2015) The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemp Oncol (Pozn)* 19:A68-77. <https://doi.org/10.5114/wo.2014.47136>
28. Colombino M, Capone M, Lissia A et al. (2012) BRAF/NRAS mutation frequencies among primary tumors and metastases in patients with melanoma. *J Clin Oncol* 30:2522–2529. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.41.2452>
29. Davies H, Bignell GR, Cox C et al. (2002) Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 417:949–954. <https://doi.org/10.1038/nature00766>
30. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV et al. (2012) A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 150:251–263. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.024>
31. Clark WH (1991) Tumour progression and the nature of cancer. *Br J Cancer* 64:631–644. <https://doi.org/10.1038/bjc.1991.375>

32. Romero-Garcia S, Lopez-Gonzalez JS, Báez-Viveros JL et al. (2011) Tumor cell metabolism: an integral view. *Cancer Biol Ther* 12:939–948. <https://doi.org/10.4161/cbt.12.11.18140>
33. Mazurek S, Eigenbrodt E (2003) The tumor metabolome. *Anticancer Res* 23:1149–1154
34. Warburg O (1924) Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle. *Naturwissenschaften* 12:1131–1137. <https://doi.org/10.1007/BF01504608>
35. WARBURG O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* 123:309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
36. WARBURG O, Wind F, Negelein E (1927) THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol* 8:519–530. <https://doi.org/10.1085/jgp.8.6.519>
37. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324:1029–1033. <https://doi.org/10.1126/science.1160809>
38. Keibler MA, Wasylenko TM, Kelleher JK et al. (2016) Metabolic requirements for cancer cell proliferation. *Cancer & Metabolism* 4:16. <https://doi.org/10.1186/s40170-016-0156-6>
39. Liberti MV, Locasale JW (2016) The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends Biochem Sci* 41:211–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.12.001>
40. Pavlova NN, Thompson CB (2016) The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab* 23:27–47. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.12.006>
41. Pavlides S, Whitaker-Menezes D, Castello-Cros R et al. (2009) The reverse Warburg effect: aerobic glycolysis in cancer associated fibroblasts and the tumor stroma. *Cell Cycle* 8:3984–4001. <https://doi.org/10.4161/cc.8.23.10238>
42. Capparelli C, Guido C, Whitaker-Menezes D et al. (2012) Autophagy and senescence in cancer-associated fibroblasts metabolically supports tumor growth and metastasis via glycolysis and ketone production. *Cell Cycle* 11:2285–2302. <https://doi.org/10.4161/cc.20718>
43. Hanahan D, Coussens LM (2012) Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21:309–322. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>
44. Scott AM, Wiseman G, Welt S et al. (2003) A Phase I dose-escalation study of sibrotuzumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer. *Clin Cancer Res* 9:1639–1647
45. Wu T, Dai Y (2017) Tumor microenvironment and therapeutic response. *Cancer Lett* 387:61–68. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.043>
46. Alkasalias T, Moyano-Galceran L, Arsenian-Henriksson M et al. (2018) Fibroblasts in the Tumor Microenvironment: Shield or Spear? *Int J Mol Sci* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19051532>

47. Pietras K, Ostman A (2010) Hallmarks of cancer: interactions with the tumor stroma. *Exp Cell Res* 316:1324–1331. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.045>
48. Hsu MY, Meier FE, Nesbit M et al. (2000) E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am J Pathol* 156:1515–1525. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65023-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65023-7)
49. Tang A, Eller MS, Hara M et al. (1994) E-cadherin is the major mediator of human melanocyte adhesion to keratinocytes in vitro. *J Cell Sci* 107 (Pt 4):983–992. <https://doi.org/10.1242/jcs.107.4.983>
50. Cheng JD, Valianou M, Canutescu AA et al. (2005) Abrogation of fibroblast activation protein enzymatic activity attenuates tumor growth. *Mol Cancer Ther* 4:351–360. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-04-0269>
51. Huber MA, Kraut N, Park JE et al. (2003) Fibroblast activation protein: differential expression and serine protease activity in reactive stromal fibroblasts of melanocytic skin tumors. *J Invest Dermatol* 120:182–188. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2003.12035.x>
52. Augsten M, Hägglöf C, Peña C et al. (2010) A digest on the role of the tumor microenvironment in gastrointestinal cancers. *Cancer Microenviron* 3:167–176. <https://doi.org/10.1007/s12307-010-0040-9>
53. Cirri P, Chiarugi P (2012) Cancer-associated-fibroblasts and tumour cells: a diabolic liaison driving cancer progression. *Cancer Metastasis Rev* 31:195–208. <https://doi.org/10.1007/s10555-011-9340-x>
54. Sternlicht MD, Werb Z (2001) How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17:463–516. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.463>
55. Roy R, Yang J, Moses MA (2009) Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer. *J Clin Oncol* 27:5287–5297. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.5556>
56. Xing F, Saidou J, Watabe K (2010) Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment. *Front Biosci (Landmark Ed)* 15:166–179. <https://doi.org/10.2741/3613>
57. Kalluri R, Zeisberg M (2006) Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* 6:392–401. <https://doi.org/10.1038/nrc1877>
58. Worthley DL, Giraud AS, Wang TC (2010) Stromal fibroblasts in digestive cancer. *Cancer Microenviron* 3:117–125. <https://doi.org/10.1007/s12307-009-0033-8>
59. Casey TM, Eneman J, Crocker A et al. (2008) Cancer associated fibroblasts stimulated by transforming growth factor beta1 (TGF-beta 1) increase invasion rate of tumor cells: a population study. *Breast Cancer Res Treat* 110:39–49. <https://doi.org/10.1007/s10549-007-9684-7>

60. Villanueva J, Herlyn M (2008) Melanoma and the tumor microenvironment. *Curr Oncol Rep* 10:439–446. <https://doi.org/10.1007/s11912-008-0067-y>
61. Ogunwobi OO, Liu C (2011) Hepatocyte growth factor upregulation promotes carcinogenesis and epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via Akt and COX-2 pathways. *Clin Exp Metastasis* 28:721–731. <https://doi.org/10.1007/s10585-011-9404-x>
62. Underiner TL, Herbertz T, Miknyoczki SJ (2010) Discovery of small molecule c-Met inhibitors: Evolution and profiles of clinical candidates. *Anticancer Agents Med Chem* 10:7–27. <https://doi.org/10.2174/1871520611009010007>
63. Halaban R, Tyrrell L, Longley J et al. (1993) Pigmentation and proliferation of human melanocytes and the effects of melanocyte-stimulating hormone and ultraviolet B light. *Ann N Y Acad Sci* 680:290–301. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1993.tb19691.x>
64. Dvorak HF (2002) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol* 20:4368–4380. <https://doi.org/10.1200/JCO.2002.10.088>
65. Zhou L, Yang K, Andl T et al. (2015) Perspective of Targeting Cancer-Associated Fibroblasts in Melanoma. *J Cancer* 6:717–726. <https://doi.org/10.7150/jca.10865>
66. Singh A, Settleman J (2010) EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* 29:4741–4751. <https://doi.org/10.1038/onc.2010.215>
67. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC et al. (2005) Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 121:335–348. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.02.034>
68. Schauer IG, Sood AK, Mok S et al. (2011) Cancer-associated fibroblasts and their putative role in potentiating the initiation and development of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia* 13:393–405. <https://doi.org/10.1593/neo.101720>
69. Veirman K de, Rao L, Bruyne E de et al. (2014) Cancer associated fibroblasts and tumor growth: focus on multiple myeloma. *Cancers* 6:1363–1381. <https://doi.org/10.3390/cancers6031363>
70. Ciołczyk-Wierzbicka D, Laidler P (2018) The inhibition of invasion of human melanoma cells through N-cadherin knock-down. *Med Oncol* 35:42. <https://doi.org/10.1007/s12032-018-1104-9>
71. Mendonsa AM, Na T-Y, Gumbiner BM (2018) E-cadherin in contact inhibition and cancer. *Oncogene* 37:4769–4780. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0304-2>
72. Casal JI, Bartolomé RA (2019) Beyond N-Cadherin, Relevance of Cadherins 5, 6 and 17 in Cancer Progression and Metastasis. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20133373>

73. Golan T, Messer AR, Amitai-Lange A et al. (2015) Interactions of Melanoma Cells with Distal Keratinocytes Trigger Metastasis via Notch Signaling Inhibition of MITF. *Mol Cell* 59:664–676. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.06.028>
74. Cazzato G (2023) Histopathological Diagnosis of Malignant Melanoma at the Dawn of 2023: Knowledge Gained and New Challenges. *Dermatopathology (Basel)* 10:91–92. <https://doi.org/10.3390/dermatopathology10010013>
75. Bacchi Cea (1996) HMB-45: A Review. *Applied Immunohistochemistry*:73–85
76. Massi, G. and P.E. LeBoit (2014) *Histological Diagnosis of Nevi and Melanoma. Vol. 2.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg
77. Busam KJ, Jungbluth AA (1999) Melan-A, a new melanocytic differentiation marker. *Adv Anat Pathol* 6:12–18. <https://doi.org/10.1097/00125480-199901000-00002>
78. Krähn G, Kaskel P, Sander S et al. (2001) 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* 21:1311–1316
79. Breslow A (1970) Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 172:902–908. <https://doi.org/10.1097/00000658-197011000-00017>
80. Balch CM, Gershenwald JE, Soong S-J et al. (2009) Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol* 27:6199–6206. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.23.4799>
81. Curti BD, Faries MB (2021) Recent Advances in the Treatment of Melanoma. *New England Journal of Medicine* 384:2229–2240. <https://doi.org/10.1056/NEJMra2034861>
82. Michielin O, Atkins MB, Koon HB et al. (2020) Evolving impact of long-term survival results on metastatic melanoma treatment. *J Immunother Cancer* 8. <https://doi.org/10.1136/jitc-2020-000948>
83. Deutsche Dermatologische Gesellschaft e. V.
84. Bollag G, Hirth P, Tsai J et al. (2010) Clinical efficacy of a RAF inhibitor needs broad target blockade in BRAF-mutant melanoma. *Nature* 467:596–599. <https://doi.org/10.1038/nature09454>
85. Lee JT, Li L, Brafford PA et al. (2010) PLX4032, a potent inhibitor of the B-Raf V600E oncogene, selectively inhibits V600E-positive melanomas. *Pigment Cell Melanoma Res* 23:820–827. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00763.x>
86. Tanda ET, Vanni I, Boutros A et al. (2020) Current State of Target Treatment in BRAF Mutated Melanoma. *Front Mol Biosci* 7:154. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2020.00154>
87. Poulikakos PI, Zhang C, Bollag G et al. (2010) RAF inhibitors transactivate RAF dimers and ERK signalling in cells with wild-type BRAF. *Nature* 464:427–430. <https://doi.org/10.1038/nature08902>

88. González-Cao M, Rodón J, Karachaliou N et al. (2015) Other targeted drugs in melanoma. *Ann Transl Med* 3:266. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2305-5839.2015.08.12>
89. Larkin J, Ascierto PA, Dréno B et al. (2014) Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *New England Journal of Medicine* 371:1867–1876. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1408868>
90. Franklin C, Livingstone E, Roesch A et al. (2017) Immunotherapy in melanoma: Recent advances and future directions. *European Journal of Surgical Oncology* 43:604–611. <https://doi.org/10.1016/j.ejso.2016.07.145>
91. Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM (2015) Immune checkpoint blockade: a common denominator approach to cancer therapy. *Cancer Cell* 27:450–461. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2015.03.001>
92. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF et al. (2010) Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *New England Journal of Medicine* 363:711–723. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1003466>
93. Ribas A, Hamid O, Daud A et al. (2016) Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma. *JAMA* 315:1600–1609. <https://doi.org/10.1001/jama.2016.4059>
94. Weber JS, D'Angelo SP, Minor D et al. (2015) 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* 16:375–384. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70076-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70076-8)
95. Verband der forschenden Pharma-Unternehmen in Deutschland
96. GlobalData. In:
97. Informa pharma intelligence trialtrove. In:
98. Bhattacharjee Y (2012) Biomedicine. Pharma firms push for sharing of cancer trial data. *Science* 338:29. <https://doi.org/10.1126/science.338.6103.29>
99. Roses AD (2008) Pharmacogenetics in drug discovery and development: a translational perspective. *Nat Rev Drug Discov* 7:807–817. <https://doi.org/10.1038/nrd2593>
100. DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG (2003) The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ* 22:151–185. [https://doi.org/10.1016/S0167-6296\(02\)00126-1](https://doi.org/10.1016/S0167-6296(02)00126-1)
101. Deutsche Krebsgesellschaft DKG
102. Schlander M, Hernandez-Villafuerte K, Cheng C-Y et al. (2021) How Much Does It Cost to Research and Develop a New Drug? A Systematic Review and Assessment. *Pharmacoeconomics* 39:1243–1269. <https://doi.org/10.1007/s40273-021-01065-y>
103. Vincent KM, Postovit L-M (2017) Investigating the utility of human melanoma cell lines as tumour models. *Oncotarget*; Vol 8, No 6

104. Pampaloni F, Reynaud EG, Stelzer EHK (2007) The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:839–845. <https://doi.org/10.1038/nrm2236>
105. Kuzu OF, Nguyen FD, Noory MA et al. (2015) Current State of Animal (Mouse) Modeling in Melanoma Research. *Cancer Growth Metastasis* 8:81–94. <https://doi.org/10.4137/CGM.S21214>
106. Hartung T (2008) Thoughts on limitations of animal models. *Parkinsonism Relat Disord* 14 Suppl 2:S81-3. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2008.04.003>
107. Mak IW, Evaniew N, Ghert M (2014) Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment. *Am J Transl Res* 6:114–118
108. Beaumont KA, Mohana-Kumaran N, Haass NK (2013) Modeling Melanoma In Vitro and In Vivo. *Healthcare (Basel)* 2:27–46. <https://doi.org/10.3390/healthcare2010027>
109. Hoffmann TK, Schirlau K, Sonkoly E et al. (2009) A novel mechanism for anti-EGFR antibody action involves chemokine-mediated leukocyte infiltration. *Int J Cancer* 124:2589–2596. <https://doi.org/10.1002/ijc.24269>
110. Lazzari G, Nicolas V, Matsusaki M et al. (2018) Multicellular spheroid based on a triple co-culture: A novel 3D model to mimic pancreatic tumor complexity. *Acta Biomater* 78:296–307. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.08.008>
111. Vinci M, Gowan S, Boxall F et al. (2012) Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biology* 10:29. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-10-29>
112. Zanoni M, Piccinini F, Arienti C et al. (2016) 3D tumor spheroid models for in vitro therapeutic screening: a systematic approach to enhance the biological relevance of data obtained. *Scientific Reports* 6:19103. <https://doi.org/10.1038/srep19103>
113. Marconi A, Quadri M, Saltari A et al. (2018) Progress in melanoma modelling in vitro. *Exp Dermatol* 27:578–586. <https://doi.org/10.1111/exd.13670>
114. Mueller-Klieser W (1987) Multicellular spheroids. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 113:101–122. <https://doi.org/10.1007/BF00391431>
115. Lin R-Z, Chang H-Y (2008) Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. *Biotechnology Journal* 3:1172–1184. <https://doi.org/10.1002/biot.200700228>
116. Russell, W. M. S. & Burch, R. L. Te principles of humane experimental technique.: *Med. J. Austral.* 1,500. <https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x> (1960)
117. Reuter C, Walles H, Groeber F (2017) Preparation of a Three-Dimensional Full Thickness Skin Equivalent. *Methods Mol Biol* 1612:191–198. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7021-6_14

118. Groeber F, Schober L, Schmid FF et al. (2016) Catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method based on an open source reconstructed epidermis (phase II). *Toxicol In Vitro* 36:254–261. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2016.07.008>
119. Weigel T, Malkmus C, Weigel V et al. (2022) Fully Synthetic 3D Fibrous Scaffolds for Stromal Tissues—Replacement of Animal-Derived Scaffold Materials Demonstrated by Multilayered Skin. *Adv Mater* 34:2106780. <https://doi.org/10.1002/adma.202106780>
120. Bordignon P, Bottoni G, Xu X et al. (2019) Dualism of FGF and TGF- β Signaling in Heterogeneous Cancer-Associated Fibroblast Activation with ETV1 as a Critical Determinant. *Cell Rep* 28:2358–2372.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.07.092>
121. Prommersberger S, Hudecek M, Nerretter T (2020) Antibody-Based CAR T Cells Produced by Lentiviral Transduction. *Current Protocols in Immunology* 128:e93. <https://doi.org/10.1002/cpim.93>
122. Römer PS, Berr S, Avota E et al. (2011) Preculture of PBMCs at high cell density increases sensitivity of T-cell responses, revealing cytokine release by CD28 superagonist TGN1412. *Blood* 118:6772–6782. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-12-319780>
123. Leikeim A, Wußmann M, Schmidt FF et al. (2022) A preclinical model of cutaneous melanoma based on reconstructed human epidermis. *Scientific Reports* 12:16269. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19307-0>
124. Stepanenko AA, Dmitrenko VV (2015) Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. *Gene* 574:193–203. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.08.009>
125. Schmitz S (ed) (2011) *Der Experimentator: Zellkultur*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
126. Floudas A, Neto N, Marzaioli V et al. (2020) Pathogenic, glycolytic PD-1+ B cells accumulate in the hypoxic RA joint. *JCI Insight* 5. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.139032>
127. Skala MC, Riching KM, Gendron-Fitzpatrick A et al. (2007) In vivo multiphoton microscopy of NADH and FAD redox states, fluorescence lifetimes, and cellular morphology in precancerous epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:19494–19499. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708425104>
128. Okkelman IA, Neto N, Papkovsky DB et al. (2020) A deeper understanding of intestinal organoid metabolism revealed by combining fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) and extracellular flux analyses. *Redox Biology* 30:101420. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101420>
129. Renate Lüllmann-Rauch (2009) *Taschenlehrbuch Histologie*
130. Ulrich Welsch, Wolfgang Kummer, Thomas Deller (2022) *Histologie – Lehrbuch und Atlas*

131. Kyrylkova K, Kyryachenko S, Leid M et al. (2012) Detection of apoptosis by TUNEL assay. *Methods Mol Biol* 887:41–47. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-860-3_5
132. Wußmann M, Groeber-Becker FK, Riedl S et al. (2022) In Model, In Vitro and In Vivo Killing Efficacy of Antitumor Peptide RDP22 on MUG-Mel2, a Patient Derived Cell Line of an Aggressive Melanoma Metastasis. *Biomedicines* 10. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10112961>
133. Meleshina AV, Dudenkova VV, Bystrova AS et al. (2017) Two-photon FLIM of NAD(P)H and FAD in mesenchymal stem cells undergoing either osteogenic or chondrogenic differentiation. *Stem Cell Res Ther* 8:15. <https://doi.org/10.1186/s13287-017-0484-7>
134. Walsh AJ, Mueller KP, Tweed K et al. (2021) Classification of T-cell activation via autofluorescence lifetime imaging. *Nat Biomed Eng* 5:77–88. <https://doi.org/10.1038/s41551-020-0592-z>
135. Perottoni S, Neto NGB, Di Nitto C et al. (2021) Intracellular label-free detection of mesenchymal stem cell metabolism within a perivascular niche-on-a-chip. *Lab on a Chip* 21:1395–1408. <https://doi.org/10.1039/D0LC01034K>
136. Quinn KP, Bellas E, Furligas N et al. (2012) Characterization of metabolic changes associated with the functional development of 3D engineered tissues by non-invasive, dynamic measurement of individual cell redox ratios. *Biomaterials* 33:5341–5348. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.04.024>
137. Varone A, Xylas J, Quinn KP et al. (2014) Endogenous two-photon fluorescence imaging elucidates metabolic changes related to enhanced glycolysis and glutamine consumption in precancerous epithelial tissues. *Cancer Res* 74:3067–3075. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2713>
138. Sobacki M, Mrouj K, Camasses A et al. (2016) The cell proliferation antigen Ki-67 organises heterochromatin. *Elife* 5:e13722. <https://doi.org/10.7554/eLife.13722>
139. McIlwain DR, Berger T, Mak TW (2013) Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5:a008656. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a008656>
140. Randic T, Kozar I, Margue C et al. (2021) NRAS mutant melanoma: Towards better therapies. *Cancer Treat Rev* 99:102238. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2021.102238>
141. Grissenberger S, Riedl S, Rinner B et al. (2020) Design of human lactoferricin derived antitumor peptides-activity and specificity against malignant melanoma in 2D and 3D model studies. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1862:183264. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183264>
142. Heitzer E, Groenewoud A, Meditz K et al. (2019) Human melanoma brain metastases cell line MUG-Mel1, isolated clones and their detailed characterization. *Scientific Reports* 9:4096. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40570-1>

143. Maxian T, Gerlitz L, Riedl S et al. (2021) Effect of L- to D-Amino Acid Substitution on Stability and Activity of Antitumor Peptide RDP215 against Human Melanoma and Glioblastoma. *Int J Mol Sci* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22168469>
144. Wodlej C, Riedl S, Rinner B et al. (2019) Interaction of two antitumor peptides with membrane lipids - Influence of phosphatidylserine and cholesterol on specificity for melanoma cells. *PLoS One* 14:e0211187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211187>
145. Riedl S, Leber R, Rinner B et al. (2015) Human lactoferricin derived di-peptides deploying loop structures induce apoptosis specifically in cancer cells through targeting membranous phosphatidylserine. *Biochim Biophys Acta* 1848:2918–2931. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.07.018>
146. Riedl S, Rinner B, Schaidler H et al. (2014) Killing of melanoma cells and their metastases by human lactoferricin derivatives requires interaction with the cancer marker phosphatidylserine. *Biometals* 27:981–997. <https://doi.org/10.1007/s10534-014-9749-0>
147. Bressac-de-Paillerets B, Avril M-F, Chompret A et al. (2002) Genetic and environmental factors in cutaneous malignant melanoma. *Biochimie* 84:67–74. [https://doi.org/10.1016/s0300-9084\(01\)01360-8](https://doi.org/10.1016/s0300-9084(01)01360-8)
148. Rigel DS, Carucci JA (2000) Malignant melanoma: prevention, early detection, and treatment in the 21st century. *CA Cancer J Clin* 50:215-36; quiz 237-40. <https://doi.org/10.3322/canjclin.50.4.215>
149. Domingues B, Lopes JM, Soares P et al. (2018) Melanoma treatment in review. *Immunotargets Ther* 7:35–49. <https://doi.org/10.2147/ITT.S134842>
150. Wilson MA, Schuchter LM (2016) Chemotherapy for Melanoma. *Cancer Treat Res* 167:209–229. https://doi.org/10.1007/978-3-319-22539-5_8
151. Meier F, Nesbit M, Hsu M-Y et al. (2000) Human Melanoma Progression in Skin Reconstructs: Biological Significance of bFGF. *Am J Pathol* 156:193–200. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64719-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64719-0)
152. Eves P, Layton C, Hedley S et al. (2000) Characterization of an in vitro model of human melanoma invasion based on reconstructed human skin. *Br J Dermatol* 142:210–222. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.2000.03287.x>
153. Li L, Fukunaga-Kalabis M, Herlyn M (2011) The Three-Dimensional Human Skin Reconstruct Model: a Tool to Study Normal Skin and Melanoma Progression. *JoVE*:e2937. <https://doi.org/10.3791/2937>
154. Gibot L, Galbraith T, Huot J et al. (2013) Development of a tridimensional microvascularized human skin substitute to study melanoma biology. *Clin Exp Metastasis* 30:83–90. <https://doi.org/10.1007/s10585-012-9511-3>

155. Vörsmann H, Groeber F, Walles H et al. (2013) Development of a human three-dimensional organotypic skin-melanoma spheroid model for in vitro drug testing. *Cell Death & Disease* 4:e719-e719. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.249>
156. Hill DS, Robinson ND, Caley MP et al. (2015) A Novel Fully Humanized 3D Skin Equivalent to Model Early Melanoma Invasion. *Mol Cancer Ther* 14:2665–2673. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-15-0394>
157. Marques, Claudia Mirian de Godoy, MacNeil S (2016) 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* 11:e0156931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156931>
158. Haridas P, McGovern JA, McElwain SD et al. (2017) Quantitative comparison of the spreading and invasion of radial growth phase and metastatic melanoma cells in a three-dimensional human skin equivalent model. *PeerJ* 5:e3754. <https://doi.org/10.7717/peerj.3754>
159. Bourland J, Fradette J, Auger FA (2018) Tissue-engineered 3D melanoma model with blood and lymphatic capillaries for drug development. *Scientific Reports* 8:13191. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31502-6>
160. Commandeur S, Sparks SJ, Chan H-L et al. (2014) In-vitro melanoma models: invasive growth is determined by dermal matrix and basement membrane. *Melanoma Research* 24
161. Michielon E, López González M, Burm JLA et al. (2020) Micro-environmental cross-talk in an organotypic human melanoma-in-skin model directs M2-like monocyte differentiation via IL-10. *Cancer Immunology, Immunotherapy* 69:2319–2331. <https://doi.org/10.1007/s00262-020-02626-4>
162. Patton EE, Mueller KL, Adams DJ et al. (2021) Melanoma models for the next generation of therapies. *Cancer Cell* 39:610–631. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2021.01.011>
163. Klicks J, Maßlo C, Kluth A et al. (2019) A novel spheroid-based co-culture model mimics loss of keratinocyte differentiation, melanoma cell invasion, and drug-induced selection of ABCB5-expressing cells. *BMC Cancer* 19:402. <https://doi.org/10.1186/s12885-019-5606-4>
164. Morales D, Lombart F, Truchot A et al. (2018) 3D Coculture Models Underline Metastatic Melanoma Cell Sensitivity to Vemurafenib. *Tissue Engineering Part A* 25:1116–1126. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2018.0210>
165. Kaur A, Ecker BL, Douglass SM et al. (2019) Remodeling of the Collagen Matrix in Aging Skin Promotes Melanoma Metastasis and Affects Immune Cell Motility. *Cancer Discov* 9:64–81. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-18-0193>

166. Pupovac A, Senturk B, Griffoni C et al. (2018) Toward Immunocompetent 3D Skin Models. *Adv Healthc Mater* 7:e1701405. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701405>
167. Abaci HE, Gledhill K, Guo Z et al. (2015) Pumpless microfluidic platform for drug testing on human skin equivalents. *Lab on a Chip* 15:882–888. <https://doi.org/10.1039/C4LC00999A>
168. Folkman J (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine* 285:1182–1186. <https://doi.org/10.1056/NEJM197111182852108>
169. Bergers G, Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3:401–410. <https://doi.org/10.1038/nrc1093>
170. Kress S, Baur J, Otto C et al. (2018) Evaluation of a Miniaturized Biologically Vascularized Scaffold in vitro and in vivo. *Scientific Reports* 8:4719. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22688-w>
171. Moroni L, Boland T, Burdick JA et al. (2018) Biofabrication: A Guide to Technology and Terminology. *Trends Biotechnol* 36:384–402. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.10.015>
172. Bardeesy N, Kim M, Xu J et al. (2005) Role of epidermal growth factor receptor signaling in RAS-driven melanoma. *Mol Cell Biol* 25:4176–4188. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.10.4176-4188.2005>
173. Boone B, Jacobs K, Ferdinande L et al. (2011) EGFR in melanoma: clinical significance and potential therapeutic target. *J Cutan Pathol* 38:492–502. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0560.2011.01673.x>
174. Kim KB, Kefford R, Pavlick AC et al. (2013) Phase II study of the MEK1/MEK2 inhibitor Trametinib in patients with metastatic BRAF-mutant cutaneous melanoma previously treated with or without a BRAF inhibitor. *J Clin Oncol* 31:482–489. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.43.5966>
175. Lago JC, Puzzi MB (2019) The effect of aging in primary human dermal fibroblasts. *PLoS One* 14:e0219165. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219165>
176. Lakowicz JR, Szmajcinski H, Nowaczyk K et al. (1992) Fluorescence lifetime imaging. *Anal Biochem* 202:316–330. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(92\)90112-k](https://doi.org/10.1016/0003-2697(92)90112-k)
177. Ying Q-L, Wray J, Nichols J et al. (2008) The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature* 453:519–523. <https://doi.org/10.1038/nature06968>
178. König K, Uchugonova A, Gorjup E (2011) Multiphoton fluorescence lifetime imaging of 3D-stem cell spheroids during differentiation. *Microsc Res Tech* 74:9–17. <https://doi.org/10.1002/jemt.20866>
179. DeBerardinis RJ, Lum JJ, Hatzivassiliou G et al. (2008) The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. *Cell Metab* 7:11–20. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.10.002>

180. Provenzano PP, Eliceiri KW, Keely PJ (2009) Multiphoton microscopy and fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to monitor metastasis and the tumor microenvironment. *Clin Exp Metastasis* 26:357–370. <https://doi.org/10.1007/s10585-008-9204-0>
181. Walsh A, Cook RS, Rexer B et al. (2012) Optical imaging of metabolism in HER2 overexpressing breast cancer cells. *Biomed Opt Express* 3:75–85. <https://doi.org/10.1364/BOE.3.000075>
182. Neto N, Dmitriev RI, Monaghan MG (2020) Seeing Is Believing: Noninvasive Microscopic Imaging Modalities for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. In: Gimble JM, Marolt Presen D, Oreffo R et al. (eds) *Cell Engineering and Regeneration*. Springer International Publishing, Cham, pp 1–41
183. Alam MM, Lee J, Lee S-Y (2017) Recent Progress in the Development of TSPO PET Ligands for Neuroinflammation Imaging in Neurological Diseases. *Nuclear Medicine and Molecular Imaging* 51:283–296. <https://doi.org/10.1007/s13139-017-0475-8>
184. Yang L, Venneti S, Nagrath D (2017) Glutaminolysis: A Hallmark of Cancer Metabolism. *Annual Review of Biomedical Engineering* 19:163–194. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071516-044546>
185. Dang CV (2010) Glutaminolysis: Supplying carbon or nitrogen or both for cancer cells? *Cell Cycle* 9:3884–3886. <https://doi.org/10.4161/cc.9.19.13302>
186. DeBerardinis RJ, Cheng T (2010) Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene* 29:313–324. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.358>
187. Pérez-Escuredo J, Dadhich RK, Dhup S et al. (2016) Lactate promotes glutamine uptake and metabolism in oxidative cancer cells. *Cell Cycle* 15:72–83. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1120930>
188. Funck-Brentano E, Alvarez JC, Longvert C et al. (2015) Plasma vemurafenib concentrations in advanced BRAFV600mut melanoma patients: impact on tumour response and tolerance. *Ann Oncol* 26:1470–1475. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv189>
189. Kichenadasse G, Hughes JH, Miners JO et al. (2020) Relationship between vemurafenib plasma concentrations and survival outcomes in patients with advanced melanoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 85:615–620. <https://doi.org/10.1007/s00280-019-04002-1>
190. Han K, Jin JY, Marchand M et al. (2015) Population pharmacokinetics and dosing implications for cobimetinib in patients with solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol* 76:917–924. <https://doi.org/10.1007/s00280-015-2862-0>

191. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D et al. (1988) Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* 106:761–771. <https://doi.org/10.1083/jcb.106.3.761>
192. Roh MR, Kim JM, Lee SH et al. (2015) Low-concentration vemurafenib induces the proliferation and invasion of human HaCaT keratinocytes through mitogen-activated protein kinase pathway activation. *J Dermatol* 42:881–888. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.12950>
193. Olschläger V, Schrader A, Hockertz S (2009) Comparison of primary human fibroblasts and keratinocytes with immortalized cell lines regarding their sensitivity to sodium dodecyl sulfate in a neutral red uptake cytotoxicity assay. *Arzneimittelforschung* 59:146–152. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1296378>
194. Galvao J, Davis B, Tilley M et al. (2014) Unexpected low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. *The FASEB Journal* 28:1317–1330. <https://doi.org/10.1096/fj.13-235440>
195. Verheijen M, Lienhard M, Schrooders Y et al. (2019) DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Scientific Reports* 9:4641. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40660-0>
196. Andrlová H, Zeiser R, Meiss F (2018) Cobimetinib (GDC-0973, XL518). *Recent Results Cancer Res* 211:177–186. https://doi.org/10.1007/978-3-319-91442-8_12
197. Arozarena I, Wellbrock C (2017) Overcoming resistance to BRAF inhibitors. *Ann Transl Med* 5:387. <https://doi.org/10.21037/atm.2017.06.09>
198. Ribas A, Gonzalez R, Pavlick A et al. (2014) Combination of vemurafenib and cobimetinib in patients with advanced BRAFV600-mutated melanoma: a phase 1b study. *Lancet Oncol* 15:954–965. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(14\)70301-8](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(14)70301-8)
199. Posternak G, Tang X, Maisonneuve P et al. (2020) Functional characterization of a PROTAC directed against BRAF mutant V600E. *Nature Chemical Biology* 16:1170–1178. <https://doi.org/10.1038/s41589-020-0609-7>
200. Riedl S, Rinner B, Asslaber M et al. (2011) In search of a novel target - phosphatidylserine exposed by non-apoptotic tumor cells and metastases of malignancies with poor treatment efficacy. *Biochim Biophys Acta* 1808:2638–2645. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2011.07.026>
201. Ran S, Downes A, Thorpe PE (2002) Increased exposure of anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels. *Cancer Res* 62:6132–6140
202. Ran S, He J, Huang X et al. (2005) Antitumor effects of a monoclonal antibody that binds anionic phospholipids on the surface of tumor blood vessels in mice. *Clin Cancer Res* 11:1551–1562. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1645>
203. Schröder-Borm H, Bakalova R, Andrä J (2005) The NK-lysin derived peptide NK-2 preferentially kills cancer cells with increased surface levels of negatively charged

phosphatidylserine. FEBS Lett 579:6128–6134.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.09.084>

204. Utsugi T, Schroit AJ, Connor J et al. (1991) Elevated expression of phosphatidylserine in the outer membrane leaflet of human tumor cells and recognition by activated human blood monocytes. *Cancer Res* 51:3062–3066
205. Riedl S, Zweytick D, Lohner K (2011) Membrane-active host defense peptides--challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. *Chem Phys Lipids* 164:766–781. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2011.09.004>
206. Rinner B, Gandolfi G, Meditz K et al. (2017) MUG-Mel2, a novel highly pigmented and well characterized NRAS mutated human melanoma cell line. *Scientific Reports* 7:2098. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02197-y>
207. Nogrady B (2020) How cancer genomics is transforming diagnosis and treatment. *Nature* 579:S10-S11. <https://doi.org/10.1038/d41586-020-00845-4>
208. Wallstabe L, Göttlich C, Nelke LC et al. (2019) ROR1-CAR T cells are effective against lung and breast cancer in advanced microphysiologic 3D tumor models. *JCI Insight* 4. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.126345>
209. Kloess S, Oberschmidt O, Dahlke J et al. (2019) Preclinical Assessment of Suitable Natural Killer Cell Sources for Chimeric Antigen Receptor Natural Killer-Based "Off-the-Shelf" Acute Myeloid Leukemia Immunotherapies. *Hum Gene Ther* 30:381–401. <https://doi.org/10.1089/hum.2018.247>

Appendix

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1-1: **Das 5 Stadien umfassende Modell der Melanomagenese nach Clark.** Biologische Ereignisse und molekulare Veränderungen während der Melanom-Progression, charakteristisch für ein jedes Stadium. Entnommen aus [1].*..... 4
- Abbildung 1-2: **Schematische Darstellung des Glukose-Stoffwechsels von gesunden (links) und Tumorzellen (rechts).** (A) Normale Zellen verstoffwechseln in Gegenwart von Sauerstoff zunächst Glukose über die Glykolyse zu Pyruvat und oxidieren dann den größten Teil dieses Pyruvats in den Mitochondrien während des Prozesses der oxidativen Phosphorylierung vollständig zu CO₂ und produzieren so ungefähr 36 ATP pro Glukosemolekül. In einer hypoxischen Umgebung werden Pyruvate angesammelt und erzeugen nur zwei ATP. (B) Krebszellen nutzen, unabhängig davon, ob Sauerstoff vorhanden ist oder nicht, nahezu ausschließlich den Glykolyseprozess; pro Glukosemolekül werden 4 ATP produziert.* 6
- Abbildung 4-1: **Herstellung epidermaler Melanom-Modelle unterschiedlicher Tumorstadien.** (A) Schematische Darstellung der Modell-Generierung von mOS-REp (melanoma open source reconstructed epidermis) des frühen und späten Stadiums. Für die in vitro RHE-Modelle wurden in definierten Mischverhältnissen auf Polycarbonat-Membran-Inserts an Tag 0 humane epidermale Keratinozyten (hEK) und Melanomzellen in Einzelsuspension (frühes Stadium) bzw. hEK und Melanom-Sphäroide (spätes Stadium) ausgesät. Am Tag 1 wurden die Modelle an die Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche (Air-Liquid-Interface, ALI) gesetzt und bis Tag 21 kultiviert. (B) Makroskopische Bilder von mOS-REp des frühen (links) und des späten Stadiums (rechts). Gebildete Mikrotumore der Zelllinie MUG-Mel2 erscheinen im Modell als dunkle Flecken. (C) Melanom-Sphäroid der Zelllinie MUG-Mel2. (I) Phasenkontrastmikroskopie. Der Maßstabsbalken entspricht 1050 µm. (II) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. (III) Immunfluoreszenzfärbung für den Melanommarker HMB-45 (grün) und den Proliferationsmarker KI67 (rot). Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. (D) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von epidermalen gesunden Hautäquivalenten (OS-REp) und Melanom-Hautmodellen beider Tumorstadien. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.*54

Abbildung 4-2: **Stratifizierung und Melanom-Progression in epidermalen in vitro Haut- und Melanom-Äquivalenten.** Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von OS-REp (linke Spalte) und mOS-REp des frühen (mittlere Spalte) bzw. späten Tumor-Stadiums (rechte Spalte) zu ausgewählten Zeitpunkten (d3, d6, d15, d17, d20) der 21-tägigen Kulturdauer. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.....56

Abbildung 4-3: **Charakterisierung epidermaler Melanom-Modelle unterschiedlicher Tumorstadien.** Immunhistochemische Färbung von Querschnitten von epidermalen gesunden Hautäquivalenten (OS-REp) und Melanom-Hautmodellen beider Tumorstadien an d21. DAB-Färbung (braun) für den Melanommarker HMB-45. Magenta-Färbungen (pink) für die klinisch relevanten melanom-assoziierten Marker Melan-A, S100β, MITF, SOX10 und PRAME, sowie den Proliferationsmarker KI67. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.....57

Abbildung 4-4: **Herstellung und Charakterisierung dermal-epidermaler Melanom-Äquivalenten auf Kollagen-Hydrogel-Basis unterschiedlicher Tumorstadien.** (A) Schematische Darstellung der Modell-Generierung von mFTSE (melanoma full thickness skin equivalent) des frühen und späten Stadiums. Die in vitro Vollhaut-Modelle verfügen über eine dermale Komponente, welche aus in Kollagen I-Gel eingebetteten humanen dermalen Fibroblasten besteht; auf die dermale Komponente wurden hEK und Melanomzellen in Einzelsuspension in definierten Mischverhältnissen (frühes Stadium) bzw. hEK und Melanom-Sphäroide (spätes Stadium) ausgesät, an Tag 1 die Modelle an die Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche (Air-Liquid-Interface, ALI) gesetzt und für 21 Tage kultiviert. (B) Makroskopische Bilder von mFTSE des frühen (links) und des späten Stadiums (rechts). Gebildete Mikrotumore der Zelllinie MUG-Mel2 erscheinen im Modell als dunkle Flecken. (C) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von dermal-epidermalen gesunden Hautäquivalenten (FTSE) und Melanom-Vollhautmodellen beider Tumorstadien. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, D = Dermis. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.....59

Abbildung 4-5: **Charakterisierung dermal-epidermaler Melanom-Modelle unterschiedlicher Tumorstadien.** Immunhistochemische Färbung von Querschnitten von dermal-epidermalen Melanom-Hautmodellen beider Tumorstadien an d21 sowie in situ Melanomen. DAB- (braun) und Magenta-Färbungen (pink) für die klinisch relevanten Melanom-assoziierten Marker Melan-A, S100β, SOX10 und PRAME, sowie den Proliferationsmarker KI67. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, D = Dermis. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.61

Abbildung 4-6: Integration unterschiedlichster humaner Melanomzelllinien in epidermale und dermal-epidermale Melanomäquivalente. Durch verschiedene zugrunde liegende Treiber Mutationen, die zur Krankheitsentstehung beitragen, stellen sie unterschiedliche Ansprüche an potentielle therapeutische Angriffspunkte und ermöglichen das Widerspiegeln vieler Melanom-Subtypen im Modell. (I) Phasenkontrastmikroskopie von SK-MEL-28, MeWo und MUG-Mel2. Der Maßstabsbalken entspricht 450 μm . (II) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von mOS-REp (obere Reihe) bzw. mFTSE (untere Reihe). SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran, D = Dermis. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm63

Abbildung 4-7: Interaktion des Melanoms mit der Mikroumgebung im in vitro Modell. Immunfluoreszenzfärbung von Querschnitten von epidermalen (linke Spalten) und dermal-epidermalen Melanom-Hautmodellen (rechte Spalten) beider Tumorstadien an d21 für den Keratinozytenmarker Cytokeratin 14 (CK14, grün), den Basalmembranmarker KollagenIV (CollIV, grün), die Notch-Liganden DLL1 (grün) und Jagged1 (grün), sowie den Notch-Rezeptor Notch 1 (grün), jeweils in Kombination mit dem Melanommarker HMB-45 (rot). Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm64

Abbildung 4-8: Expressionsprofil von Melanoma Inhibitory Activity (MIA) im in vitro Melanom-Modell. (I) Immunhistochemische Färbung (DAB, braun) von Querschnitten von epidermalen (linke Spalten) und dermal-epidermalen Melanom-Hautmodellen (rechte Spalten) beider Tumorstadien an d21 für MIA. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran, D=Dermis. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm . (II) Bestimmung der MIA-Konzentration mittels ELISA. Diese wurde im Überstand biologischer Duplikate zu definierten Zeitpunkten (d7, d8, d14 nach ALI) während der gesamten Kulturdauer bestimmt (n=1). Für II wurde der Student's t-Test angewendet, der signifikante Unterschiede zeigte, $p < 0,001$ (*).65

Abbildung 4- 9: Cadherin-Expression im in vitro Melanom-Modell. Immunfluoreszenzfärbung von Querschnitten von epidermalen (linke Spalten) und epidermal-dermalen Melanom-Hautmodellen (rechte Spalten) beider Tumorstadien an d21 für die Cadherin-Marker E-Cadherin (gelb) und N-Cadherin (grün) in Kombination mit dem Melanommarker HMB-45 (rot). Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm66

Abbildung 4-10: Herstellung und Charakterisierung dermal-epidermalen Melanom-Äquivalente auf Basis vollsynthetischer PA6-Fasern. (A) Schematische Darstellung der Modell-Generierung von (m)FTSE^{PA6} ((melanoma) full thickness skin equivalent on PA6 basis). Die in vitro Vollhaut-Modelle verfügen über eine dermale Komponente, welche aus in elektrogesponnene Fasern eingebetteten humanen dermalen Fibroblasten besteht; auf die dermale Komponente wurden hEK bzw. hEK und Melanomzellen in Einzelsuspension in

definierten Mischverhältnissen ausgesät, an Tag 1 die Modelle an die Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche (Air-Liquid-Interface, ALI) gesetzt und für 21 Tage kultiviert. (B) Makroskopische Bilder von FTSE^{PA6} (links) und mFTSE^{PA6} (rechts). Gebildete Mikrotumore der Zelllinie MUG-Mel2 erscheinen im Modell als dunkle Flecken. (C) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von epidermal-dermalen gesunden Hautäquivalenten und Melanom-Vollhautmodellen auf Basis der elektrogenesponnenen PA6-Fasern, sowie eines in situ Melanoms. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, D = Dermis. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. (E) Immunfluoreszenzfärbung von mFTSE^{PA6} für den Keratinozytenmarker Cytokeratin 14 (CK14, türkis) in Kombination mit dem Melanommarker HMB-45 (grün), den Extrazellulär-Matrix (ECM)-Marker Collagen I (Coll, grün) und den Fibroblastenmarker Vimentin (rot). Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.....68

Abbildung 4-11: Zerstörungsfreie und voll-automatische Detektion der Tumorpro- und -regression im epidermalen in vitro Melanom-Modell. (A) Das optische Messsystem „MediTOM“ erlaubt die Analyse der in-vitro Modelle des malignen Melanoms automatisiert mittels Durchlicht im Schattenwurfverfahren und die digitalisierte Erfassung von Veränderungen an den Zellen. (B) Histologische Hämatoxylin- und Eosin-Übersichtsfärbung eines epidermalen in vitro Melanom-Modells und Detektion des Melanoms mittels Schattenwurfverfahrens. Melanome sind grün umrandet und sowohl in der histologischen Färbung (links) als auch in dem MediTOM -Bild (rechts) sichtbar. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. (C) Nicht-invasive Detektion des Tumor-Fortschreitens im in vitro Melanom-Modell mittels Schattenwurfverfahrens. Das Medi-TOM erlaubt eine Differenzierung zwischen gesundem (links) und krankem Stadium (rechts) (I+II) sowie eine Detektion der Tumorprogression über die komplette Kulturdauer hinweg (II). Während 21 Tagen Kulturdauer wurden zu definierten Zeitpunkten (d7, d14, d21) Durchlicht-Aufnahmen von Melanom-Modellen des späten Tumorstadiums aufgenommen.....70

Abbildung 4-12: Nicht-invasive voll-automatische Detektion der Melanomprogression in epidermalen Melanom-Modellen unterschiedlicher Aussaatverhältnisse. Während 21 Tagen Kulturdauer wurden zu definierten Zeitpunkten (d3, d7, d9, d11, d15, d18 und d21) Bilder mit dem intern entwickelten MediTOM-Gerät aufgenommen.71

Abbildung 4-13: Zerstörungsfreie Detektion des Tumorwachstums nicht-pigmentierter Melanome im epidermalen und dermal-epidermalen in vitro Melanom-Modell mittels Optischer Kohärenz-Tomographie . (A) Histologische Hämatoxylin- und Eosin-Übersichtsfärbung eines epidermalen Haut-Modells (I) und in vitro Melanom-Modells (II) und tomografische Aufnahme/Querschnitt des gesamten epidermalen Modells. Melanome sind

grün umrandet und sowohl in der histologischen Färbung (links) als auch in dem OCT -Bild (rechts) sichtbar. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm . (B) Histologische Hämatoxylin- und Eosin-Übersichtsfärbung eines dermal-epidermalen Haut-Modells (I) und in vitro Melanom-Modells (II) und tomografische Aufnahme/Querschnitt des gesamten Modells. Melanome sind grün umrandet und sowohl in der histologischen Färbung (links) als auch in dem OCT -Bild (rechts) sichtbar. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, D = Dermis. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μm73

Abbildung 4-14: Zwei-Photonen Fluoreszenz-Lifetime-Imaging-Mikroskopie (2-P FLIM) der NAD(P)H und FAD⁺ Analyse. (A, B) Repräsentative NAD(P)H und FAD⁺ Bilder von mOS-REp^{A11}. (C, D) Berechnete durchschnittliche Fluoreszenz-Lebensdauer (average fluorescence lifetime; τ_{avg}) von NAD(P)H und optisches Redoxverhältnis (ORR) für OS-REp, mOS-REp^{SK-MEL-28} und mOS-REp^{A11}. Abgeändert und integriert nach schriftlicher Zustimmung des Journals [123].75

Abbildung 4-15: Zielgerichtete medikamentöse Melanom-Behandlung in 2D. (A) Experimenteller Aufbau der zielgerichteten Melanomtherapie in 2D. HEK, SK-MEL-28 und MeWo wurden in Zellkulturplatten ausgesät (Tag 0) und für 24 h unter Standardkulturbedingungen inkubiert, bevor Vemurafenib, Cobimetinib oder eine Kombination aus beiden in unterschiedlichen Konzentrationen systemisch appliziert wurden (Tag 1). Nach Inkubationszeiten von 24 h (Tag 2), 48 h (Tag 3) oder 72 h (Tag 4) mit wiederholter Arzneimittelapplikation nach 48 h (Tag 3) wurden die Behandlungseffekte analysiert. (B) Zielgerichtete Mono-Therapie mit Vemurafenib für 72 h. (I) Phasenkontrastmikroskopie von hEK, SK-MEL-28 und MeWo, die 72 Stunden lang mit Vemurafenib (unbehandelt, 1 μM , 3 μM und 5 μM) behandelt wurden. Der Maßstabsbalken entspricht 450 μm . (II) Viabilität der behandelten Zellen nach 72 h Arzneimittelinkubation. Die Viabilität wurde aus biologischen Triplikaten mit jeweils technischen Duplikaten bestimmt und auf unbehandelte Kontrollen (n=1) normiert. (III) Glukoseverbrauch behandelter Zellen nach 72 h Arzneimittelinkubation. Der Glukoseverbrauch wurde aus biologischen Triplikaten (n = 1) bestimmt.78

Abbildung 4-16: Zielgerichtete medikamentöse Melanom-Behandlung in 3D. (A) Experimenteller Aufbau der zielgerichteten Melanomtherapie in 3D. Die Behandlung von 21 d alten epidermalen Gewebe-Äquivalenten (gesunde OS-REp; organotypische Modelle des Malignen Melanoms mit den Zelllinien SK-MEL-28 und MeWo) wurde am Tag 21 nach ALI durchgeführt. Dazu wurde Vemurafenib, Cobimetinib oder eine Kombination aus beiden systemisch in unterschiedlichen Konzentrationen durch Zugabe der Wirkstoffe zum Zellkulturmedium appliziert (Tag 21). Nach einer Inkubation von 72 h (Tag 24) mit wiederholter

Arzneimittelapplikation nach 48 h (Tag 23) wurden die Therapieeffekte analysiert. (B) Viabilität 72 Stunden nach Verabreichung des Medikaments. Die Viabilität wurde aus biologischen Triplikaten mit jeweils technischen Duplikaten bestimmt und auf unbehandelte Kontrollen (n=3) normalisiert. (C) Glukoseverbrauch nach 72 Stunden Arzneimittelgabe. Der Glukoseverbrauch wurde aus biologischen Triplikaten (n = 3) bestimmt. (D) TUNEL-Färbung von OS-REp behandelt mit 1 % Triton X-100 bzw. DMSO für jeweils 24 h (Positivkontrolle), mOS-REp^{SK-MEL-28} behandelt mit 100 nM Cobimetinib für 72 h, und unbehandelte nativer menschlicher Haut (Negativkontrolle). Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.85

Abbildung 4-17: **Quantifizierung der Auswirkungen von Peptid RDP22 auf mOSREp^{MUG-Mel2}**. (A) Schematische Darstellung der Behandlung von epidermalen Melanom-Modellen mit dem anti-Tumor Peptid RDP22 an d1 und d2 nach ALI. Es wurden jeweils 50 µg RDP22 bzw. 0,1% Essigsäure topisch aufgetragen. (B) Zerstörungsfreie Detektion von Melanompro- und -regression. Bilder, die während 21 Tagen Kulturdauer (Abbildung A-XX) mit dem MediTOM (obere Reihe) aufgenommen wurden, wurden mit ImageJ (untere Reihe) analysiert. (C) Einfluss auf die Proliferationsraten. Melanom-Hautäquivalente wurden mit dem Melanommarker HMB-45 (grün) und dem Proliferationsmarker Ki67 (rot) gefärbt; anschließend wurden Ki67-positive Zellen quantitativ gezählt. (D) Analyse der Stoffwechselaktivität. Melanom-Hautmodelle, die mit dem Vehikel behandelt wurden, zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Viabilität. (E) Bestimmung der Zellintegrität. Die LDH-Freisetzung wurde im Überstand zu definierten Zeitpunkten während der gesamten Kulturdauer gemessen. Pfeile zeigen die Tage an, an denen 0,1 % Essigsäure oder RDP22 topisch auf die Melanom-Modelle aufgetragen wurde. (F) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von Melanom-Hautmodellen. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. Die Daten sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente mit Triplikaten für jede Bedingung und stellen Mittelwerte mit entsprechenden Standardabweichungen dar. Für C und D wurde der Student's t-Test angewendet, der signifikante Unterschiede zwischen Kontrolle bzw. Vehikel- und Peptidbehandlung zeigte, p < 0,001 (*). Abgeändert und integriert nach schriftlicher Zustimmung des Journals [132].91

Abbildung 4-18: **Nicht-invasive Detektion von Melanompro- und -regression mittels MediTOM.** Während 21 Tagen Kulturdauer wurden zu definierten Zeitpunkten (d8, d10, d13, d15, d17, d20 und d21) Bilder mit dem intern entwickelten MediTOM-Gerät aufgenommen und mit der Software ImageJ analysiert. Abgeändert und integriert nach schriftlicher Zustimmung des Journals [132].92

Abbildung 4-19: **Gegenüberstellung der Melanomentwicklung in epidermalen vs. dermal-epidermalen Melanom-Modellen.** (I) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten

von $mOS-REP^{MUG-Mel2}$ bzw. $mFTSE^{MUG-Mel2}$. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran, D = Dermis. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. (II) Die quantitative Analyse von Gewebeschnitten ($n=10$) erfolgte mit ImageJ.....93

Abbildung 4-20: **Analyse der Nährstoffkonkurrenz im epidermal-dermalen Melanom-Hautäquivalent.** (A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Die Vollhaut-Modelle wurden in unterschiedlichen Mediummengen, entweder standardmäßig in 2,5 mL oder in einer Deepwell-Platte mit 19 mL, kultiviert. (B) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von $mFTSE^{MUG-Mel2}$ bzw. $mFTSE^{MUG-Mel2/Deepwel}$. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, D = Dermis. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ m. Die quantitative Analyse von Gewebeschnitten ($n=6$) erfolgte mit ImageJ. (C) Bestimmung des Glukose-Verbrauches (links) bzw. der Laktat-Produktion (rechts). Diese wurden im Überstand zu definierten Zeitpunkten (d7, d14, d21 nach ALI) während der gesamten Kulturdauer gemessen und auf die entsprechende Kontrolle normalisiert. ($n=1$).....95

Abbildung 4-21: **Einfluss von adulten Keratinozyten und Fibroblasten auf die Melanomentwicklung.** (A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Juvenile und adulte Keratinozyten und Fibroblasten wurden für die Generierung von epidermalen und epidermal-dermalen Melanom-Modellen verwendet und hinsichtlich ihres Effektes auf die Melanomentwicklung analysiert. (B) Vergleich der Melanomprogression im epidermalen Melanom-Hautäquivalent unter Verwendung juveniler und adulter heK. Bilder, die mit dem MediTOM (obere Reihe) aufgenommen wurden, wurden mit ImageJ (untere Reihe) analysiert ($n=2$). (C) Bestimmung der Proliferationsraten mittels XCelligence®. Analyse des Einflusses von juvenilen und adulten hdF auf das MUG-Mel2-Wachstum in 2D. Es wurden Zell-Index, Verdopplungszeit und die Steigung des CI bestimmt.....97

Abbildung 4-22: **Aktivierung von hdFs zu Krebs-assoziierten Fibroblasten und Analyse des Einflusses von CAFs auf MUG-Mel2 in 2D.** (A) Schematische Darstellung der Aktivierung von hdFs zu CAFs. Dafür wurden juvenile hdFs für 48 h mit TGF- β oder konditioniertem Medium (CM) oder einer 1:1 Mischung aus beidem inkubiert. (B) Immunfluoreszenzfärbung von aktivierten Fibroblasten und der CAF-Zelllinie MUCCarly1 für α SMA (rot) und FAP (gelb). Der Maßstabsbalken entspricht 200 μ m. (C) Bestimmung der Proliferationsraten mittels XCelligence®. Analyse des Einflusses von Krebs-assoziierten Fibroblasten auf das MUG-Mel2-Wachstum in 2D. Es wurden Zell-Index, Verdopplungszeit und die Steigung des CI bestimmt..... 100

Abbildung 4-23: **Integration und Analyse von Krebs-assoziierten Fibroblasten in epidermal-dermale Melanom-Hautäquivalente.** (A) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Unaktivierte juvenile, mit TGF- β oder konditioniertem Medium oder einer

1:1 Mischung aus beidem aktivierte hdF oder die CAF-Zelllinie MUCCarly1 wurden für die Generierung von epidermal-dermalen Melanom-Modellen verwendet und hinsichtlich ihres Effektes analysiert. (B) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von epidermal-dermalen Melanom-Hautmodellen unter Verwendung verschiedenster (aktivierter) hdF. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, D = Dermis. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. Die quantitative Analyse von Gewebeschnitten erfolgte mit der Software ImageJ. 103

Abbildung 4-24: Strategien zur Integration von T Zellen (T Z) in epidermale Gewebe-Äquivalente.

(A) Humane immunkompetente epidermale 3D Modelle. (I) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Generierung eines cytotoxischen Milieus durch Zugabe CD3/CD28 aktivierter/unstimulierter T Zellen zu epidermalen in vitro Haut-Modellen. Die Ko-Kultur erfolgte nach 14-tägiger Kultivierung an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche durch systemische Zugabe der 72 h pre-stimulierten T Zs für 48 h. (II) Analyse der metabolischen Aktivität der in vitro Modelle. Via MTT-Assays wurde nach 48-stündiger Ko-Kultur die Viabilität des Testsystems bestimmt. Diese wurde aus jeweils technischen Triplikaten bestimmt und auf unbehandelte Kontrollen normalisiert. (III) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von epidermalen gesunden Hautäquivalenten und Hautmodellen eines pathologischen Phänotyps. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, M = Membran. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. (B) Epidermale Haut- und Melanom-Modelle mit großen Poren. (I) Schematische Darstellung der Modell-Generierung von OS-REp und mOS-REp basierend auf Membranen mit großen Poren, welche ein Einwandern der T Zs erlauben sollen. Für die in vitro RHE-Modelle wurden die Poren der Polycarbonat-Membran-Inserts von einer Porengröße von 8,0 µm an Tag 0 zunächst durch Auftragen von Kollagen I Gel verschlossen. Anschließend wurden hEK oder hEK und Melanomzellen in Einzelsuspension in definierten Mischverhältnissen ausgesät. Am Tag 1 wurden die Modelle an die Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche (Air-Liquid-Interface, ALI) gesetzt und bis Tag 21 kultiviert. (II) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung eines Querschnitts von einem epidermalen gesunden Hautäquivalenten aufgebaut auf einer Membran mit großen Poren (OS-Rep^{große Poren}). SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, C = Kollagen I Gel, M = Membran. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. 107

Abbildung 4-25: Strategien zur Integration von T Zellen (T Z) in dermal-epidermale Gewebe-Äquivalente.

(A) Immun-kompetentes mFTSE. (I) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. Injektion der T Zs nach 19-tägiger Kultivierung an der Luft-Flüssigkeits-Grenzfläche und Kultivierung für 48 h. (II) Bestimmung der IFN γ -Konzentration mittels ELISA. Diese wurde im Überstand 48 h nach Ko-Kultur bestimmt (n=1). (III)

Immunfluoreszenzfärbung. Das Gewebe-Äquivalent wurde mit dem T Zell-Marker CD3 (rot) gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. (IV) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten eines dermal-epidermalen mFTSE und in die Dermis injizierter T Zs. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, D = Dermis. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. (B) Immun-kompetentes mFTSE^{PA6}. (I) Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus. T Zs wurden auf 2 Wochen alte dermale Komponenten ausgesät und für 48 h unter ein 19 Tage altes mFTSE^{PA6} gespannt. (II) Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten eines dermal-epidermalen immun-kompetenten mFTSE^{PA6} mit in der Dermis integrierter T Zs. SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, D = Dermis. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. 109

Abbildung 5-1: Portfolio humaner 3D organotypischer in vitro Modelle des malignen Melanoms. *Hämatoxylin- und Eosin-Färbung von Querschnitten von epidermalen gesunden Hautäquivalenten (OS-REp) und Melanom-Hautmodellen (mOS-Rep) beider Tumorstadien (obere Reihe), sowie von dermal-epidermalen gesunden Hautäquivalenten (FTSE) und Melanom-Vollhautmodellen (mFTSE) beider Tumorstadien (untere Reihe). SC = Stratum Corneum, SG = Stratum Granulosum, SS = Stratum Spinosum, SB = Stratum Basale, D = Dermis, M = Membran. Melanomnester sind durch Pfeilspitzen gekennzeichnet. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm. 110*

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Liste verwendeter Chemikalien inklusive Herstellerangabe.....</i>	<i>17</i>
<i>Tabelle 2: Zusammensetzung verwendeter Puffer und Lösungen für Zellkultur und Histologie.</i>	<i>19</i>
<i>Tabelle 3: Zusammensetzung verwendeter Medien und Supplemente in der Zellkultur.....</i>	<i>21</i>
<i>Tabelle 4: Aufzählung der verwendeten Antikörper.</i>	<i>22</i>
<i>Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Laborgeräte und deren Hersteller.....</i>	<i>24</i>
<i>Tabelle 6: Verwendete Ausstattung und deren Hersteller.</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 7: Übersicht über verwendete Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller.</i>	<i>26</i>
<i>Tabelle 8: Name, Version und Entwickler der verwendeten Software.</i>	<i>28</i>
<i>Tabelle 9: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Donoren für die Isolation humaner epidermaler Keratinozyten (heKs) und humaner dermaler Fibroblasten (hdFs).</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 10: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und ihrer Charakteristika.</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 11: Paraffin-Infiltrationsprotokoll der Einbettstation.</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 12: Absteigende Alkoholreihe zur Entparaffinierung und Rehydrierung.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabelle 13: Aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydrierung.</i>	<i>46</i>
<i>Tabelle 14: HE-Färbeprozess.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 15: Prozess der IHC.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabelle 16: Prozedur der IF.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 17: Prozess der TUNEL-Färbung.....</i>	<i>49</i>
<i>Tabelle 4-1: Strategien zur Generierung immun-kompetenter organotypischer in vitro Modelle des malignen Melanoms.....</i>	<i>105</i>

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „*Humane organotypische 3D Modelle des Malignen Melanoms als in vitro Testsystem für die Bewertung der Wirksamkeit von anti-Tumor Therapeutika*“ eigenständig, d.h. insbesondere selbständig 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.

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “*Human organotypic 3D models of malignant melanoma as an in vitro test system to evaluate the efficacy of anti-tumor therapeutics*” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and/or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Publikationen und Konferenzbeiträge

Publikationen

2022 **Maximiliane Wußmann**, Florian Kai Groeber-Becker, Sabrina Riedl, Dina Alihodzic, Daniel Padaric, Lisa Gerlitz, Alexander Stallinger, Bernadette Liegl-Atzwanger, Dagmar Zweytick, and Beate Rinner. 2022. "In Model, In Vitro and In Vivo Killing Efficacy of Antitumor Peptide RDP22 on MUG-Mel2, a Patient Derived Cell Line of an Aggressive Melanoma Metastasis" *Biomedicines* 10, no. 11: 2961. DOI:10.3390/biomedicines10112961

Anna Leikeim*, **Maximiliane Wußmann***, Freia F. Schmidt*, Nuno G. B. Neto, Franziska Benz, Kendra Tiltmann, Corinna Junger, Michael G. Monaghan, Bastian Schilling, and Florian K. Groeber-Becker. 2022. "A preclinical model of cutaneous melanoma based on reconstructed human epidermis" *Scientific Reports* 12, no. 1: 16269. DOI:10.1038/s41598-022-19307-0

**geteilte Erstautorenschaft*

Tobias Weigel, Christoph Malkmus, Verena Weigel, **Maximiliane Wußmann**, Constantin Berger, Julian Brennecke, Florian Groeber-Becker, and Jan Hansmann. 2022. "Fully Synthetic 3D Fibrous Scaffolds for Stromal Tissues - Replacement of Animal-Derived Scaffold Materials Demonstrated by Multilayered Skin" *Advanced Materials* 34, no. 10: 2106780. DOI: 10.1002/adma.202106780

2019 Franziska Karl, **Maximiliane Wußmann**, Luisa Kreß, Tobias Malzacher, Phillip Fey, Florian Groeber-Becker, and Nurcan Üceyler. 2019. "Patient-derived in vitro skin models for investigation of small fiber pathology" *Annals of Clinical and Translational Neurology* 6, no. 9: DOI:10.1002/acn3.50871

Antje Kremer, **Maximiliane Wußmann**, Marietta Herrmann, Michael Raghunath, and Heike Walles. 2019. "Ciclopirox olamine promotes the angiogenic response of endothelial cells and mesenchymal stem cells" *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 73, no 1-12: 6626 DOI:10.3233/CH-190559

Konferenzbeiträge

- 2022 **SMR Oktober 2022**; *19th International Congress of the Society for Melanoma Research (in Person)*, Edinburgh, UK-SCT; Poster: Human immuno-competent 3D model of Malignant Melanoma: Towards preclinical assessment of checkpoint inhibitors in vitro
- 2021 **ESDR September 2021**; *50th European Society for Dermatological Research Annual Meeting (online)*; Poster: Human immuno-competent 3D model of Malignant Melanoma: preclinical efficacy assessment of checkpoint inhibitors
- 2020 **TERMIS-EU Mai 2020**; *Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society European Chapter Meeting 2020 (in Person geplant, kurzfristig corona-bedingt abgesagt)*, Manchester, UK; Poster: Human immuno-competent organotypic model of Malignant Melanoma: An innovative in-vitro tool for the preclinical efficacy assessment of immunotherapies
- 2019 **EUSAAT August 2019**; *19th Annual Congress of the European Society for Alternatives to Animal Testing (in Person)*, Linz (AT); Vortrag: Human-based T cell-skin models for graft-versus-host disease

Curriculum Vitae

Danksagung

Herzlich bedanken möchte ich mich besonders bei ...

... **Prof. Dr. Gerhard Sextl**

Besonderer Dank richtet sich an sie für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Dissertation am Fraunhofer-Institut für Silicatforschung (ISC), die Gestaltung und den Input während des Doktorandenseminars und ihre Begeisterung bzw. Unterstützung für mein Thema bzw. generell das Translationszentrum für Regenerative Therapien (TLZ-RT).

Während meiner Zeit als Doktorandin am ISC konnte ich methodisch viel Neues lernen; insbesondere auch Einblick in Methoden erlangen, die ich so an anderen Instituten nicht bekommen hätte. Zudem konnte ich zahlreiche wertvolle Erfahrungen sammeln.

... **PD Dr. Marco Metzger und Dr. Joachim Nickel**

Danke euch beiden dafür, dass ich meine Dissertation am TLZ-RT anfertigen durfte und die herzliche Aufnahme in die TERM/TLZ-Familie, eure (in)direkte Unterstützung und Input, das Mitsprache- und Mitgestaltungsrecht als Doktoranden-Sprecherin und euren Beitrag zu meiner wissenschaftlichen Entwicklung.

Ich war und bin immer gerne ein Teil eures Teams gewesen.

... **Dr. Florian Groeber-Becker**

Danke für deine stetige und außerordentliche Unterstützung (insbesondere im letzten Jahr), deinen unerschütterlichen Glauben in mich und meine Fähigkeiten, deine motivierende Art und positive Sichtweise auf die Dinge, deine Fähigkeit, stets die richtigen Worte zu finden.

Danke dir zudem für dein stetiges Fördern und Fordern, dein Laufen lassen und Türen für mich Öffnen (mich manchmal auch einfach durchschubben) und irgendwo auch deine unermüdlichen Versuche meine Grenzen der Bereitschaft zur Spontanität zu erweitern.

All das hat dazu beigetragen, mich zu der Wissenschaftlerin werden zu lassen, die ich heute bin.

Danke fürs Vorbild sein und Nachahmen wollen, den wissenschaftlichen Austausch bzw. gegenseitig Sparringpartner sein und stets eine offene Türe haben.

Ohne dich wäre ich heute nicht dort, wo ich heute bin. Danke, dass du mich in deine Gruppe geholt und dafür damals alle Hebel in Bewegung gesetzt hast, ich mein Wunschprojekt bearbeiten durfte und du mich auch jetzt – nach Abschluss der Doktorarbeit - weiterhin in deinem Team hältst und mir stets das Gefühl gibst, ein geschätztes und wichtiges Mitglied davon zu sein, dessen Meinung Gewicht hat und Gehör findet. Eine eigene Gruppe aufbauen

und leiten zu dürfen, direkt von Doktorandin in Gruppenleiterin übergehen zu dürfen, ehrt mich sehr.

Ich hätte mir keinen anderen oder gar besseren Doktor-Papa, oder Chef, als dich vorstellen bzw. wünschen können!

... **PD Dr. med. Niklas Beyersdorf**

Danke dir für die Betreuung meiner Arbeit als Zweitgutachter. Vielen Dank für deine fachkundigen Ratschläge bei der Umsetzung meiner Arbeit, das mich teilhaben lassen an deinem umfangreichen Immunologie-Wissen, deinen Input und Unterstützung.

Die Zusammenarbeit mit dir war und ist stets sehr angenehm und habe ich immer sehr geschätzt, deine Meinung war und ist mir stets sehr wichtig. Mögen noch viele weitere erfolgreiche gemeinsame Projekte folgen.

... **Prof. Dr. med. Bastian Schilling** und AG Schilling

Danke für die Betreuung meiner Dissertation als Drittgutachter, für deine fachkundigen Anregungen und deine Unterstützung.

Ich habe immer sehr gerne mit dir und deinem Team zusammengearbeitet und deinen Input sehr geschätzt. Mögen unsere Gruppen auch zukünftig verbunden bleiben.

Marion Berthold, dir Danke für die T Zellen und das Teilen deiner Expertise.

Claudia Siedel, dir Danke für das Anfertigen der Färbungen mit klinisch relevanten Melanom-assoziierten Markern.

... **Prof. Dr. Svenja Meierjohann**

Danke dir für das Übernehmen der Viertgutachterinnen-Stelle, deinen geschätzten fachkundigen Rat und Unterstützung während der Bearbeitung meines Dissertationsprojektes.

Die Zusammenarbeit mit dir und deinem Team an diesem und weiteren Projekten war stets sehr angenehm. Mögen diesen noch viele weitere Zusammenarbeiten folgen.

... **Prof. Dr. Christian Janzen**

Danke für ihre Übernahme des Vorsitzes meines Promotionskomitees.

... **Jonas und Nada**

Danke euch beiden für das zusammen Doktoranden sein und gemeinsam „groß“ bzw. Doktor werden, das sich gegenseitig unterstützen und motivieren, unsere Treffen fernab des Labor-Alltags.

... **Corinna Junger, Franziska Benz und Alina Riedel**

Vielen Dank euch Dreien für eure äußerst engagierten und großartigen Abschlussarbeiten, die z.T. Einzug in diese Arbeit fanden. Es war mir eine Freude, euch betreut, auf eurem Weg begleitet und wachsen sehen haben zu dürfen.

... **Christa und Babsi**

Danke euch beiden, dass ihr für reibungslose Abläufe im Labor gesorgt habt und dass man sich stets auf euch und euer (Methoden-)Wissen verlassen kann.

... **TERM/TLZ-Familie und AG Groeber-Becker**

Daneben ein großer Dank an das komplette TERM/TLZ-Team und die Haut-Gruppe für eine angenehme und kollegiale, fast familiäre, Arbeits-Atmosphäre, den Zusammenhalt und das Miteinander. Zudem sei jedem gedankt, der mir bei Fragen/Problemen jeglicher Art hilfsbereit zur Seite stand.

... **Özlem und Anna Kristina**

Danke euch beiden, dass ihr den Laden vor und hinter den Kulissen schmeißt; dass ihr mit eurer Art Arbeit weniger wie Arbeit sein lasst und ihr Teil des TLZ seid.

... meinen **Kooperationspartnern**

Vielen Dank für die großartige Zusammenarbeit in spannenden Kooperationsprojekten

- Medizinische Universität Graz, insbesondere *Dr. Beate Rinner und Dr. Dagmar Zweytsch*
- Center of Device Development, insbesondere *Dr. Andreas Diegeler, Dr. Johannes Sorg und Gabriele Maas-Diegeler*
- Trinity College Dublin, insbesondere *Dr. Michael Monaghan und Nuno Neto*
- Fraunhofer IKTS, insbesondere *Dr. Jörg Opitz und Luise Schreiber*

... **Dr. Tobias Weigel** und Biomaterialien-Gruppe

Danke für die Bereitstellung der elektrogesponnen Fasern und unsere tolle Zusammenarbeit, nicht nur in diesem Projekt. #StRoMa³

... **Graduate school of Life Sciences**

Danke für das strukturierte Promotionsprogramm und das umfangreiche begleitende Angebot an Kursen und Qualifizierungsseminaren.

... **Bundesministerium für Bildung und Forschung**

Danke für die finanzielle Unterstützung, welche die Durchführung meines Dissertationsprojektes erst ermöglicht hat.

... allen **Freunden** (innerhalb und außerhalb der Wissenschaftler-Welt)

Ein herzliches Dankeschön sei auch an euch gerichtet: für u.a. Tee-Kränzchen, Mittag-/Abendessen, Aktivitäten und lustige Stunden außerhalb des Labors, den fachlichen und auch privaten Austausch, das einen gerne zur Arbeit kommen lassen.

Insbesondere Danke den Nicht-Wissenschaftlern dafür stets ein offenes Ohr zu haben, andere Blickwinkel auf Problemstellungen zu eröffnen, das Mitfiebern und Interesse und den Ausgleich zum teils stressigen Wissenschaftler-Alltag zu gewährleisten.

So schön, dass es euch alle gibt!

... meiner **Familie**

Das allergrößte Dankeschön geht an euch. Für die Unterstützung in den letzten Jahren, das immer an mich glauben, das Mitfiebern bei jedem einzelnen Versuch und die Mitfreude über Erfolge jeglicher Art, das Verständnis und die Rücksicht besonders in der Endphase dieser Arbeit.

Ohne euch hätte ich das nicht geschafft!

