

Sensitivierung des Malignen Melanoms gegenüber TRAIL in einem organotypischen Tumor-Testsystem

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der
Universität Stuttgart zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Hanna Vörsmann

aus Braunschweig

Hauptberichter: Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier
Mitberichter: PD Dr. Dagmar Kulms

Tag der mündlichen Prüfung: 28. September 2012

Institut für Zellbiologie und Immunologie

Universität Stuttgart

2012

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Dissertation:

"Sensitivierung des Malignen Melanoms gegenüber TRAIL in einem organotypischen Tumor-Testsystem"

ohne Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Diese Arbeit hat in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Ort, Datum

Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|-----------|
| Abkürzungsverzeichnis | 7 |
| Zusammenfassung | 11 |
| Abstract | 12 |
| 1. Einleitung | 13 |
| 1.1 Aufbau und Funktion der Haut | 13 |
| 1.1.1 Die Epidermis (Oberhaut)..... | 14 |
| 1.1.2 Die Dermis (Korium, Lederhaut)..... | 16 |
| 1.2 Das Maligne Melanom | 17 |
| 1.2.1 Therapie des Malignen Melanoms | 20 |
| 1.3 Dreidimensionale <i>in vitro</i> Testsysteme | 21 |
| 1.3.1 Tumorsphäroide | 22 |
| 1.3.2 Organotypische Haut..... | 23 |
| 1.4 Der programmierte Zelltod – Apoptose | 25 |
| 1.5 TRAIL – gezielte Krebstherapie | 26 |
| 1.6 Zielsetzung der Arbeit | 31 |
| 2. Material | 32 |
| 2.1 Material für zellbiologische Arbeiten | 32 |
| 2.1.1 Melanomzelllinien | 32 |
| 2.1.2 Primäre Hautzellen | 32 |
| 2.1.3 Standard-Zellkulturmedien | 32 |
| 2.1.4 <i>EGM</i> und <i>MM</i> zur Kultivierung von Hautmodellen | 33 |
| 2.1.5 Zusätze für Zellkulturmedien | 33 |
| 2.1.6 Enzyme..... | 33 |
| 2.1.7 Reagenzien zur Stimulation von Melanomzellen und Tumorsphäroiden | 33 |
| 2.1.8 Substanzen zum Nachweis nekrotischer und apoptotischer Zellen | 34 |
| 2.1.9 Chemikalien und Substanzen für zellbiologische Arbeiten..... | 34 |
| 2.1.10 Puffer und Lösungen für zellbiologische Arbeiten | 35 |
| 2.1.11 Geräte für zellbiologische Arbeiten | 35 |
| 2.1.12 Plastikwaren | 36 |
| 2.1.13 Zubehör für zellbiologische Arbeiten | 36 |

| | |
|--|-----------|
| 2.2 Material für histologische Arbeiten | 37 |
| 2.2.1 Primäre Hautschnitte | 37 |
| 2.2.2 Chemikalien und Substanzen für histologische Arbeiten | 37 |
| 2.2.3 Lösungen und Puffer für histologische Arbeiten | 38 |
| 2.2.4 Mikroskope | 38 |
| 2.2.5 Geräte für histologische Arbeiten | 39 |
| 2.2.6 Zubehör für histologische Arbeiten | 39 |
| 2.2.7 Primärantikörper für immunhistologische Färbungen | 40 |
| 2.2.8 Sekundärantikörper für immunhistologische Färbungen | 40 |
| 2.2.9 Substanzen und Kit zum Nachweis von Apoptose im Gewebe | 41 |
| 2.2.10 Eindeckmedien für histologische Präparate | 41 |
| 2.3 Material für biochemische Arbeiten | 41 |
| 2.3.1 Kit zur quantitativen Bestimmung von Apoptose | 41 |
| 2.3.2 Proteinmarker | 41 |
| 2.3.3 Primär- und Sekundärantikörper zum Nachweis von Proteinen auf einer Nitrocellulosemembran | 42 |
| 2.3.4 Geräte für biochemische Arbeiten | 42 |
| 2.3.5 Zubehör für biochemische Arbeiten | 43 |
| 2.3.6 Chemikalien und Substanzen für biochemische Arbeiten | 43 |
| 2.3.7 Puffer und Lösungen für biochemische Arbeiten | 44 |
| 3. Methoden | 45 |
| 3.1 Zellbiologische Methoden | 45 |
| 3.1.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen | 45 |
| 3.1.2 Kultivierung von Melanomzelllinien | 45 |
| 3.1.3 Isolierung und Kultivierung primärer Keratinozyten | 46 |
| 3.1.4 Isolierung und Kultivierung primärer Fibroblasten | 48 |
| 3.1.5 Isolierung und Kultivierung primärer Melanozyten | 49 |
| 3.1.6 Zellzahlbestimmung und Vitaltest mittels Trypanblau-Färbung | 50 |
| 3.1.7 Automatisierte Zellzahlbestimmung mittels Casy® | 51 |
| 3.1.8 Stimulation von Melanomzelllinien und primären Hautzellen | 51 |
| 3.1.9 Herstellung dreidimensionaler Tumorsphäroide | 52 |
| 3.1.10 Stimulation von Tumorsphäroiden | 53 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1.11 Färbung von Tumorsphäroiden zum Nachweis apoptotischer und nekrotischer Zellen | 54 |
| 3.1.12 Herstellung organotypischer Vollhautmodelle | 55 |
| 3.1.13 Integration von Melanomzelllinien ins Hautmodell | 58 |
| 3.1.14 Integration von Tumorsphäroiden ins Hautmodell..... | 59 |
| 3.1.15 Stimulation von Hautmodellen..... | 60 |
| 3.2 Histologische Methoden | 60 |
| 3.2.1 Immersionsfixierung von Hautmodellen mit Roti [®] -Histofix | 60 |
| 3.2.2 Einbetten von Hautmodellen in Paraffin | 60 |
| 3.2.3 Herstellung von Paraffinblöcken..... | 61 |
| 3.2.4 Herstellung von Schnittpräparaten mittels Rotationsmikrotom..... | 62 |
| 3.2.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Schnittpräparaten..... | 63 |
| 3.2.6 Immunhistochemische Färbung von Hautmodellen | 64 |
| 3.2.7 Nachweis von Apoptose mittels TUNEL im Gewebe..... | 66 |
| 3.2.8 Elektronenmikroskopische Analyse von Tumorsphäroiden..... | 67 |
| 3.3 Biochemische Methoden | 70 |
| 3.3.1 Nachweis von Apoptose in kultivierten Zellen | 70 |
| 3.3.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Melanomzellen | 71 |
| 3.3.3 Herstellung von Proteinextrakten aus Tumorsphäroiden | 71 |
| 3.3.4 SDS-PAGE | 71 |
| 3.3.5 Western Blot..... | 72 |
| 3.3.6 Nachweis von Proteinen auf einer Nitrocellulosemembran | 73 |
| 4. Ergebnisse..... | 74 |
| 4.1 Sensitivierung von Melanomzelllinien gegenüber TRAIL durch Kostimulation mit TRAIL und Cisplan bzw. UVB | 74 |
| 4.2 Herstellung von Tumorsphäroiden aus Melanomzellen..... | 76 |
| 4.3 Sensitivierung von Tumorsphäroiden gegenüber TRAIL..... | 77 |
| 4.4 Die Sensitivierung von Tumorsphäroiden gegenüber TRAIL korreliert mit NF κ B-Aktivierung, XIAP-Depletion und vollständiger Caspase 3-Prozessierung | 79 |
| 4.5 Die Sensitivierung von Melanomzelllinien gegenüber TRAIL mit subletalen Dosen UVB oder Cisplatin ist tumorselektiv | 81 |
| 4.6 Aufbau eines funktionalen Vollhautmodells | 83 |

| | |
|--|------------|
| 4.7 Die erfolgreiche Integration von Melanomzelllinien ins Vollhautmodell ist Abhängig von der Zelllinie und korreliert mit dem Tumorprogressionsstadium..... | 85 |
| 4.8 Die Behandlung mit TRAIL in Kombination mit Cisplatin oder UVB führt zur Reduktion der Melanomnestgröße im Vollhautmodell..... | 86 |
| 4.9 Die Dezimierung von Melanomnestern im Vollhautmodell erfolgt durch Induktion von Apoptose | 88 |
| 4.10 Integration von Tumorsphäroiden ins Vollhautmodell simuliert die <i>in vivo</i> Situation eines soliden Tumors – Etablierung eines neuartigen Tumor Testsystems | 90 |
| 4.11 Behandlung von Tumorsphäroiden im Vollhautmodell mit TRAIL in Kombination mit Cisplatin führt zur reduzierten Proliferation und erhöhten Apoptose..... | 94 |
| 4.12 Nachweis von ABCB5-positiven Zellen deutet auf eine mögliche Langzeitresistenz hin und unterstreicht die <i>in vivo</i> Relevanz des neuartigen Tumor-Testsystems | 97 |
| 5. Diskussion | 99 |
| Abbildungsverzeichnis | 111 |
| Tabellenverzeichnis | 112 |
| Literaturverzeichnis | 114 |
| Veröffentlichungen..... | 133 |
| Danksagung..... | 134 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-----------------|---|
| ABCB5 | <i>ATP-binding cassette sub-family B member 5</i> |
| Apaf-1 | <i>apoptotic protease activating factor-1</i> |
| APS | Ammoniumpersulfat |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| Bak | <i>Bcl-2 antagonist killer</i> |
| Bax | <i>Bcl-2 associated protein X</i> |
| Bcl-xL | <i>B-cell lymphoma-2 extra large</i> |
| Bcl-2 | <i>B-cell lymphoma-2</i> |
| bFGF | <i>basic fibroblast growth factor</i> |
| BH | <i>Bcl-2 homology domains</i> |
| Bid | <i>Bcl-2 homology domain 3 interacting domain death agonist</i> |
| BRAF V600E | B-Raf Protoonkogen, Austausch von Valin zu Glutamat |
| BSA | Bovines Serumalbumin |
| CD | <i>cluster of differentiation</i> |
| cFLIP | <i>cellular FLICE inhibitory protein</i> |
| cm ² | Quadratcentimeter |
| CO ₂ | Kohlenstoffdioxid |
| CPD | Cyclobutan-Dimere |
| CTLA-4 | <i>cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4</i> |
| Cy3 | <i>cyanine 3</i> |
| DNA | <i>desoxyribonucleic acid</i> |
| ECM | <i>extracellular matrix</i> |
| ELISA | <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> |
| DAB | 3,3'-Diaminobenzidine |
| DAPI | 4',6-diamidino-2-phenylindole |
| DcR | <i>decoy receptor</i> |
| DD | <i>death domain</i> |

| | |
|---------------------------------------|--|
| dH ₂ O, ddH ₂ O | destilliertes Wasser, doppelt destilliertes Wasser |
| <i>DED</i> | <i>death effector domain</i> |
| <i>DISC</i> | <i>death inducing signaling complex</i> |
| DMEM | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| ECL | <i>enhanced chemiluminescens reaction</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| engl. | englisch |
| EGM | <i>Epidermal growth medium</i> |
| et al. | <i>et alii</i> (und andere) |
| EtOH | Ethanol |
| EU | Europäische Union |
| FACS | <i>Fluorescence activated cell sorting</i> |
| FADD | <i>Fas associated protein with death domain</i> |
| FCS | <i>Fetal calf serum</i> |
| FDA (Farbstoff) | <i>Fluorescein diacetate</i> |
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| FFPE | <i>formalin fixed paraffin embedded</i> |
| FITC | Fluorescein-5-isothiocyanat |
| FKBP51 | <i>FK506 binding protein 51</i> |
| g | Gravitationskonstante |
| g, mg, µg | Gramm, Milligramm, Mikrogramm |
| GNL | Gelneutralisationslösung |
| gr. | griechisch |
| h | <i>hour</i> (Stunde) |
| HE-Färbung | Hämatoxylin-Eosin-Färbung |
| HeLa Zellen | Zervixkarzinomzellen der Patientin Henriette Lacks |
| HIF | <i>hypoxia-inducible factor</i> |

| | |
|---------------------------------------|--|
| HRP | <i>Horseradish peroxidase</i> |
| H ₂ O ₂ -Lösung | Wasserstoffperoxid-Lösung |
| IGF-1 | <i>Insulin-like growth factor-1</i> |
| IgG | Immunglobulin G |
| I κ B α | <i>Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha</i> |
| izTRAIL | Isoleuzin-Zipper-TRAIL |
| kDa | Kilodalton |
| IL2 | Interleukin 2 |
| J | Joule |
| L, ml, μ l | Liter, Milliliter, Mikroliter |
| lat. | lateinisch |
| M, mM, μ M | Molar, Millimolar, Mikromolar |
| mA | Milliampere |
| MAPK | <i>mitogen-activated protein (MAP) kinase</i> |
| Mcl-1 | <i>myeloid cell leukemia 1 protein</i> |
| MCTS | <i>multicellular tumor spheroids</i> |
| min | Minute |
| mm, μ m | Millimeter, Mikrometer |
| MM | <i>metastatic melanoma</i> |
| MM (Medium) | <i>Maintenance medium</i> |
| MMP | <i>matrix metalloproteinases</i> |
| NF κ B | <i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells</i> |
| NMF | <i>natural moisturizing factor</i> |
| PBS | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PDGF | <i>platelet-derived growth factor</i> |
| PI | Propidiumiodid |
| POD | Peroxidase |

| | |
|-----------------------|--|
| P/S | Penicilin / Streptomycin |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| REACH | <i>Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals</i> |
| <i>RGP</i> | <i>radial growth phase</i> |
| ROS | <i>reactive oxygen species</i> |
| rpm | <i>rounds per minute</i> |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS-PAGE | <i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| Smac/DIABLO | <i>second mitochondria-derived activator of caspases / direct IAP binding protein with low PI</i> |
| S100B | <i>S100 calcium binding protein B</i> |
| T 175 cm ² | <i>Zellkulturflasche mit einer Fläche von 175 cm²</i> |
| TEM | Transmissionselektronenmikroskop |
| TGF-β1 | <i>transforming growth factor-β1</i> |
| TNF | <i>tumor necrosis factor</i> |
| TRAIL | <i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i> |
| TRAIL-R | <i>TRAIL-receptor</i> |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TUNEL | <i>terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT]-mediated deoxyuridinetriphosphat [dUTP] nick end-labeling</i> |
| U | Unit, Einheit für Enzymaktivität |
| VE-Wassers | vollentsalztes Wasser |
| UV-Strahlung | Ultraviolett-Strahlung, (UVB,UVA, UVC) |
| v/v, w/v | <i>volume per volume, weight per volume</i> |
| <i>VGP</i> | <i>vertical growth phase</i> |
| XIAP | <i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i> |

Zusammenfassung

Das Maligne Melanom, der schwarze Hautkrebs, ist die aggressivste und tödlichste Form von Hautkrebs mit einer weltweit stark steigenden Inzidenz. Insbesondere für Patienten mit metastatischen Stadien bleibt das Maligne Melanom bis heute auf Grund einer hohen Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapien bis auf wenige Ausnahmefälle unheilbar. Die Suche nach neuen, spezifischen Therapien nimmt folglich einen großen Stellenwert in der aktuellen Melanomforschung ein. In diesem Zusammenhang hat der Todesligand TRAIL zunehmend an Interesse und Bedeutung gewonnen, da er selektiv Apoptose in Tumorzellen induzieren kann ohne dabei normale, gesunde Zellen zu schädigen. Trotz der apoptotischen Wirkungsweise von TRAIL sind viele Melanomzelllinien und das primäre Melanom resistent gegenüber diesem Todesliganden.

Erstmals konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich TRAIL-resistente Melanomzellen nicht nur in der 2D-Zellkultur, sondern auch unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen, nämlich in dreidimensionalen Tumorsphäroiden und organotypischen Hautmodellen, tumorselektiv gegenüber TRAIL sensitivieren lassen, indem sie mit TRAIL und UVB oder Cisplatin kostimuliert werden. Die Sensitivierung geht dabei mit der Degradation von $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und somit indikativ mit der Aktivierung von $\text{NF}\kappa\text{B}$, der Depletion des anti-apoptotischen Proteins XIAP und der Aktivierung von Caspase 3 einher. Die in dieser Arbeit hergestellten Tumorsphäroide und Vollhautmodelle mit integrierten Melanomzellen simulierten in hohem Maße das Milieu und die Histomorphologie eines *in vivo* Tumors. Daraus resultierend konnte also gezeigt werden, dass die Behandlung des Malignen Melanoms mit TRAIL in Kombination mit UVB oder Cisplatin nicht nur eine *in vitro*, sondern auch eine *in vivo* Relevanz besitzt.

Weiterhin konnte in dieser Arbeit durch die Integration von Tumorsphäroiden spezifischer Größe in funktionelle Vollhautmodelle ein neuartiges, organotypisches Tumor-Testsystem mit hoher klinischer Relevanz etabliert werden. Dieses simulierte nicht nur die dreidimensionale Struktur und die Zellheterogenität eines soliden, avaskulären kutanen Malignen Melanoms, sondern auch dessen mögliche Mechanismen der Langzeitresistenz. Dieses neu entwickelte humane und *in vivo* ähnliche Tumor-Testsystem bietet sich also zur präklinischen Evaluierung und Selektion von Substanzen oder Therapien für das Maligne Melanom an.

Abstract

Malignant Melanoma also called „black skin cancer“ is the most aggressive and deadliest form of skin cancer with an increasing incidence worldwide. In particular patients with metastatic melanoma are generally considered incurable since advanced stages of melanoma are highly resistant to radio- and chemotherapy. Therefore, there is the great effort in ongoing melanoma research to find new and specific treatment options for this disease. In this regard the death ligand TRAIL has gained considerable interest and relevance as a potential anticancer agent, given its ability to induce apoptosis in transformed cells without doing harm to normal, healthy cells. However treatment with this tumor-selective death ligand is confined by the fact that many melanoma cell lines and primary melanoma are resistant against TRAIL-induced apoptosis.

In the context of this work it could be shown for the first time that TRAIL-resistant melanoma cells could be highly sensitised to TRAIL-induced apoptosis not only in 2D-cell culture but also under *in vivo* like conditions, namely in tumor spheroids and organotypic skin models by stimulating the melanoma cells with TRAIL in combination with UVB or cisplatin. Sensitization correlates with the degradation of $I\kappa B\alpha$ and thus indicatively with the activation of $NF\kappa B$, the depletion of the anti-apoptotic protein XIAP and the activation of caspase 3. Produced tumor spheroids and full skin models with integrated melanoma cells highly simulated the milieu and the histomorphology of a native tumor. Resulting from this it could be demonstrated that treating malignant melanoma with TRAIL in combination with UVB or cisplatin not only has an *in vitro* but also an *in vivo* relevance.

Furthermore, an innovative organotypic tumor test system of high clinical relevance was developed by integrating tumor spheroids of a specific size in functional full skin models. This test system not only mimicked the three-dimensional structure and the cellular heterogeneity of a solid, avascularized cutaneous malignant melanoma but also its possible mechanisms of long-term resistance. Therefore, this newly developed human and *in vivo* like tumor test system might serve for the preclinical evaluation and selection of drugs and therapies for malignant melanoma.

1. Einleitung

1.1 Aufbau und Funktion der Haut

Die Haut oder Kutis (lat. *cutis*, gr. *derma*) stellt die äußere Grenze des menschlichen Körpers zur Umwelt dar. Mit einem Gewicht von 3,5-10 kg macht sie nicht nur 7-8 % der Gesamtkörpermasse aus, sie ist auch mit einer Fläche von 1,5-2 m² das größte Organ des Menschen [1]. Die Haut übernimmt vielseitige und wichtige Funktionen. So nimmt sie als größtes Sinnesorgan mittels Mechano-, Thermo- und Nozirezeptoren entsprechend Berührung, Hitze bzw. Kälte und Schmerz wahr [2]. Zudem bietet die Haut durch ihre hohe Elastizität und Verformbarkeit Schutz vor mechanischen Einwirkungen. Gleichzeitig bildet sie eine stabile Barriere, wodurch sowohl der transepidermale Verlust von Wasser reguliert als auch der Schutz vor chemischen, physikalischen und biologischen Einwirkungen gewährleistet wird [3]. Die Haut reguliert die Körpertemperatur und übernimmt wichtige immunologische Funktionen bei der Abwehr von Mikroorganismen [4]. In der Haut befindliche Zellen wie z.B. Keratinozyten, Fibroblasten, Melanozyten, Immunzellen und Endothelzellen sorgen für die volle Funktionsfähigkeit der Haut [5].

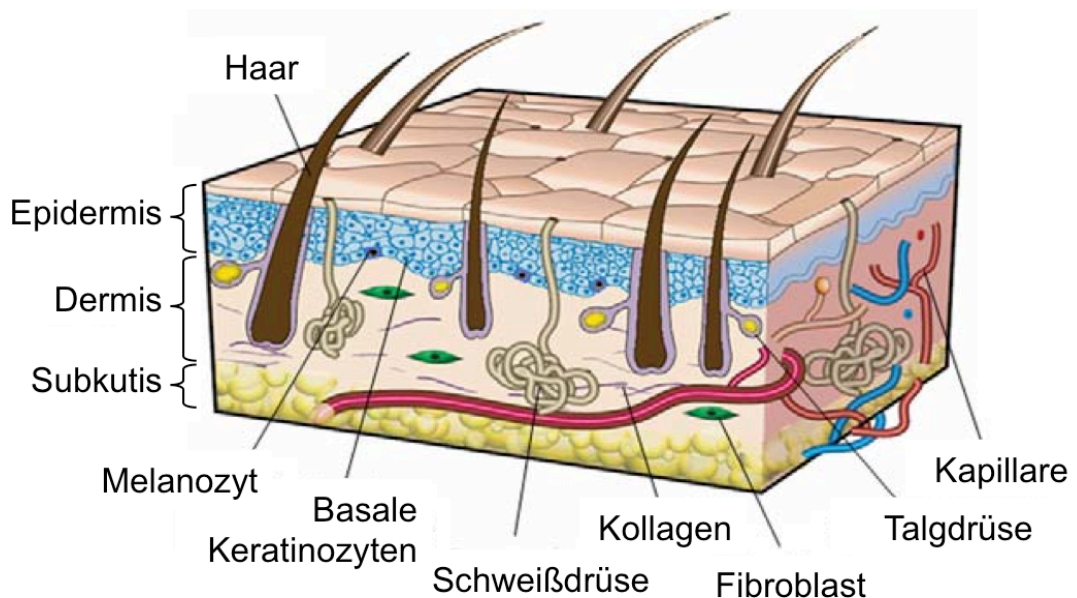


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der humanen Haut. Verändert nach Böttcher-Haberzeth *et al.* 2010 [5].

Die Haut besteht aus 3 Schichten: der Epidermis (Oberhaut), der Dermis (Korium, Lederhaut) und der Subkutis (Unterhaut), wobei die Dermis von der Epidermis durch die Basalmembran getrennt wird [6]. Integrale Bestandteile der Haut sind die Hautanhangsgebilde (Adnexe), zu denen Haare, Hautdrüsen und Nägel zählen [3] (siehe Abbildung 1).

1.1.1 Die Epidermis (Oberhaut)

Die Epidermis stellt die äußerste Schicht der Haut dar und ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel, das zu über 90-95 % aus Keratinozyten besteht [6], die unter anderem über Desmosomen miteinander in Kontakt stehen [7]. Als weitere Zelltypen kommen die pigmentbildenden und somit vor UV-Strahlung schützenden Melanozyten, sowie die Langerhans-Zellen (Dendritische Zellen) und die neuroendokrinen Merkel-Zellen (Mechanorezeptoren) vor. Die Keratinozyten unterliegen einem ständigen vierwöchigen Differenzierungsprozess, wodurch eine kontinuierliche Erneuerung der Epidermis gewährleistet wird [8]. Durch diesen Differenzierungsprozess entstehen verschiedene Zellschichten mit unterschiedlichen morphologischen und biochemischen Charakteristika: das *Stratum basale* (Basalschicht), das *Stratum spinosum* (Stachelzellschicht), das *Stratum granulosum* (Körnerzellschicht) und das *Stratum corneum* (Hornschicht) (siehe Abbildung 2).

Das *Stratum basale* ist die unterste, einzellige Schicht der Epidermis. Die interfollikulären Stammzellen dieser Schicht machen zwar weniger als 1 % der Basalzellen aus, sorgen jedoch für eine stetige Regeneration der Epidermis [9]. Aus den Stammzellen der Basalschicht werden unter anderem die sogenannten transitorischen Zellen erzeugt, welche sich noch wenige Male teilen, bevor aus ihnen die post-mitotischen Zellen hervorgehen [10, 11]. Letztere lösen sich aus dem *Stratum basale* und durchlaufen die Differenzierungsstadien der suprabasalen Schichten, beginnend mit dem *Stratum spinosum* [10]. Letzteres besteht aus mehreren Zellschichten mit großen, polygonalen Zellen, die spitze Ausstülpungen aufweisen. Daher auch der Name „Stachelzelle“. In der Stachelzellschicht werden die basalen Zytokeratine 5 und 14 durch die suprabasalen Zytokeratine 1 und 10 ersetzt [12]. Das dem *Stratum spinosum* folgende 1-3schichtige *Stratum granulosum* ist durch abgeflachte und parallel zur Hautoberfläche orientierte Zellen mit Keratohyalinkörperchen gekennzeichnet. Im letzten Differenzierungs-

schritt kommt es zur Ausbildung des *Stratum corneums*. Die großen, starren, hexagonalen Zellen dieser Schicht sind fest und kompakt miteinander verknüpft und bilden die äußerste Grenze zur Umwelt. Beim Übergang vom *Stratum granulosum* zum *Stratum corneum* finden eine Reihe von Differenzierungsprozessen statt, die mit dem Verschwinden des Zellkerns, der Dehydrierung, sowie der Abflachung der Zellen einhergehen. Des Weiteren kommt es unter der Wirkung von Ca^{2+} -abhängigen Transglutaminasen zur Bildung einer Protein-Lipidbarriere (engl. *cornified envelope*). Diese besteht aus einer Vielzahl an quervernetzten Proteinen (z.B. Periplakin, Envoplakin, Involucrin, Loricrin, *small proline rich proteins*) und Lipiden, die im Falle von ω -OH-Ceramiden an das Proteingerüst gebunden vorliegen und die Plasmamembran ersetzen [13] oder in Form von parallel gerichteten Lipidlamellen im Interzellularraum angelagert werden [12, 14, 15]. Die Lipide des *cornified envelope* sind Inhalt der sogenannten Odland-Körperchen, welche beim Übergang vom *Stratum granulosum* zum *Stratum corneum* mit der Plasmamembran fusionieren und ihre Bestandteile in den Interzellularraum entleeren. Zur Gewährleistung einer effektiven Barrierefunktion der Haut werden neben der Protein-Lipidbarriere hochmolekulare Filaggrin-Keratin-Aggregate gebildet. Dabei wird Profilaggrin, ein Bestandteil der Keratohyalinkörperchen, beim Übergang zum *Stratum corneum* in Filaggrin umgewandelt, welches dann mit Keratin aggregiert [8, 16]. Im terminalen Verlauf der Differenzierung wird Filaggrin durch Proteasen, wie z.B. Caspase 14, abgebaut. Die dabei entstehenden freien Aminosäuren und Derivate (z.B. Urocain-säure, Pyroglutaminsäure) tragen als Bestandteile des NMF (engl. *natural moisturizing factor*) zur Wasserretention und zur natürlichen Photoprotektion bei [17–19].

Die Basalzellen der Epidermis sind über Adhäsionskomplexe, unter anderem so genannte Hemidesmosomen, mit der Basalmembran verbunden. Diese stellt die dermale-epidermale Junctionszone dar und besteht hauptsächlich aus Kollagen IV, Lamininen (z.B. Laminin 5), Nidogen (Entactin) und dem Heparansulfat Proteoglycan Perlekan [20]. Die Verbindung der Basalmembran zur Dermis erfolgt unter anderem durch die Bindung von Laminin 5 und Kollagen IV an das Verankerungsfilament Kollagen VII, welches wiederum mit Kollagen I und III in der Dermis interagiert [21–23]. Die dermale-epidermale-Junctionszone verbindet nicht nur strukturell die Epidermis mit der Dermis, sondern sie reguliert gleichzeitig als

Grenzschicht auch den Austausch von Stoffen und Zellen und spielt eine Rolle bei der Wundheilung, der epidermalen Regeneration sowie der Tumordinvasion- und metastasierung.

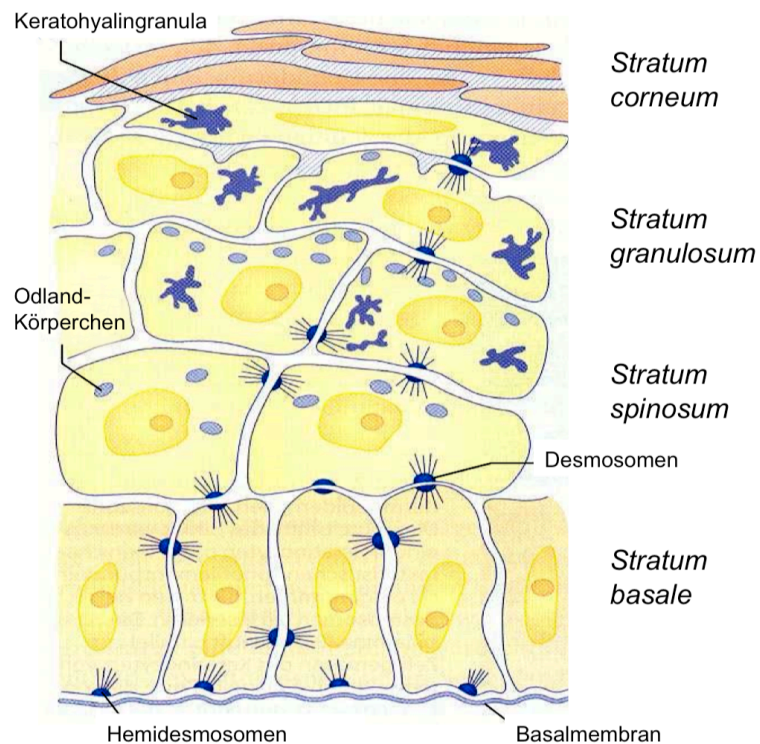


Abbildung 2: Aufbau der humanen Epidermis mit den unterschiedlichen Schichten: *Stratum basale*, *Stratum spinosum*, *Stratum granulosum* und *Stratum corneum*. Die Keratinozyten sind über Desmosomen miteinander und mittels Hemidesmosomen mit der Basalmembran verbunden. Zum Schutz wird eine Protein-Lipidbarriere (engl. *cornified envelope*) und hochmolekulare Filaggrin-Keratin-Aggregate gebildet. Dabei sind Vesikel, die sogenannten Odland-Körperchen, und Keratohyalin granula beteiligt. Abbildung verändert nach Fritsch 2004 [8].

1.1.2 Die Dermis (Korium, Lederhaut)

Die reißfeste und elastische Dermis ist Träger und Versorger der Epidermis. Sie besteht aus zahlreichen Bindegewebsfasern (Kollagen- und elastische Fasern), Glykoproteinen (z.B. Fibronectin), Glykosaminoglykanen (z.B. Chondroitin-4-sulfat, Chondroitin-6-sulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat, Hyaluronsäure) und Proteoglykanen (z.B. Perlecan, Decorin), welche zusammen die extrazelluläre Matrix ausmachen [24, 25]. In diese sind verschiedene Zellen, insbesondere spindelförmige Fibroblasten eingebettet, die maßgeblich an der Produktion der extrazellulären Matrix beteiligt sind [26, 27]. Die Dermis dient als wichtiger Ort der

Sinneswahrnehmung. So werden Druck, Temperatur und Schmerz über verschiedene Sinnesrezeptoren (z.B. Ruffini-Körperchen, Meissner-Tastkörperchen, Vater-Paccini Körperchen) oder freie Nervenendigungen wahrgenommen.

Die Dermis gliedert sich in das *Stratum papillare* und das *Stratum reticulare*. Das *Stratum papillare* liegt unterhalb der Epidermis und enthält jene Kollagenfibrillen, welche die Basalmembran mit der Dermis verankern. Das vorherrschende, lockere Bindegewebe in dieser Schicht ist reich an extrazellulärer Matrix, Zellen (Makrophagen, Lymphozyten, Mastzellen, Fibroblasten) und elastischen Fasern, welche für die Dehnbarkeit und Elastizität sorgen [3]. Im Vergleich zum *Stratum reticulare* sind die Kollagenfasern des Typs I und III lockerer gewebt, sie sind dünner und es liegt ein höheres Verhältnis von Kollagen III zu Kollagen I vor [26,28]. Da in der Epidermis keine Blutgefäße vorliegen, übernimmt die papillare Dermis die Nährstoffversorgung der Epidermis, wobei zur Erhöhung der Kontaktfläche epidermale Reteleisten in die Dermis und dermale Papillen in die Epidermis ragen [3]. Der Stoffaustausch verläuft dabei diffusionsvermittelt über Kapillarschlingen, welche ihren Ursprung im subpapillaren Gefäßplexus haben und bis in die Papillen hineinreichen. Der subpapillare Gefäßplexus grenzt das *Stratum papillare* vom *Stratum reticulare* ab. Das *Stratum reticulare* besteht aus sogenanntem straffen Bindegewebe, welches reich an festen Kollagenfasern, primär Kollagen I, ist. Außerdem befinden sich in dieser Schicht Haarfollikel, Talgdrüsen und Schweißdrüsen, die in der Epidermis ihren Ausgang finden [3]. Über den Gefäßplexus *rete subcutaneum* erfolgt die Abgrenzung zur Subkutis [26]. Letztere dient mit einem hohen Fettanteil als Kälteschutz, Energiereserve und Druckpolster.

1.2 Das Maligne Melanom

Das Maligne Melanom, der schwarze Hautkrebs, wurde erstmals im Jahre 1806 als solcher von René Laennec beschrieben. Er war es auch, der den Begriff Melanoma bzw. Melanosis (gr. *schwarz*) prägte [29]. Das Maligne Melanom entsteht durch maligne Transformation der pigmentbildenden Zellen, den Melanozyten, und tritt überwiegend in der Haut auf (siehe Abbildung 3). Andere klinische Varianten, die selten vorkommen und nur etwa 5 % aller Melanome ausmachen, sind das amelanotische Melanom, Schleimhautmelanom, Aderhaut-

melanom und meningeales Melanom [3]. Obwohl das Maligne Melanom nur 4 % aller dermatologischen Krebsarten ausmacht [30], stellt es die aggressivste Form aller Hautkrebsarten dar und ist für ca. 90 % der Todesfälle verantwortlich [31]. Die Gründe dafür liegen zum einen in der hohen Resistenz gegen Radio- und Chemotherapien und zum anderen in der Neigung, in einem sehr frühen Stadium bereits Metastasen über das Lymph- und Blutsystem zu streuen. Das Maligne Melanom weist weltweit eine deutlich steigende Inzidenz auf und erreicht die höchsten Werte in Australien und Neuseeland [32]. In Deutschland haben sich seit den 1980er-Jahren die altersstandardisierten Erkrankungsraten von Frauen und Männern mehr als verdreifacht [33].

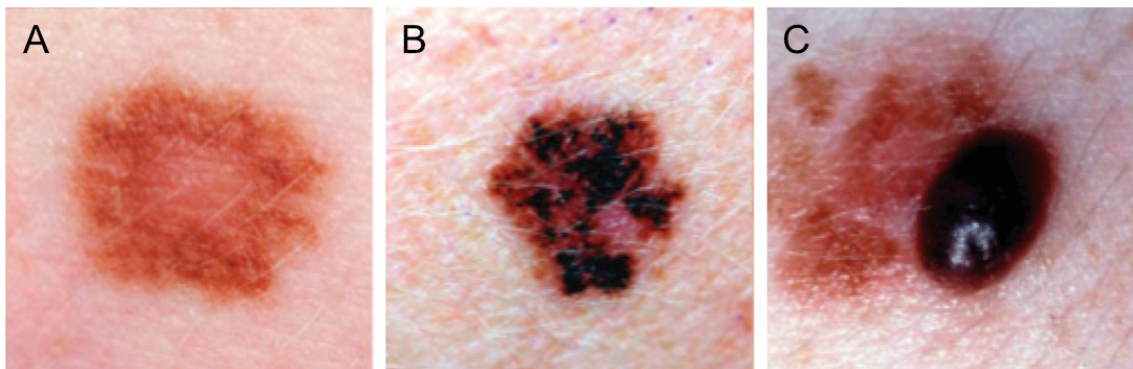


Abbildung 3: Kutaner Melanom. A) Benigner Nävus B) Frühes Stadium des Malignen Melanoms C) Spätes Stadium des Malignen Melanoms. Bilder aus Riegel *et al.* 2010 [34]

Die Ursachen bzw. Risikofaktoren des Malignen Melanoms sind multifaktoriell und beinhalten sowohl Einflüsse aus der Umwelt als auch genetische Dispositionen. Als Risikofaktoren gelten eine erhöhte Anzahl an erworbenen melanozytären oder dysplastischen Nävi, ein Melanom in der eigenen Krankheitsgeschichte, Melanom in der Familie, sowie persönliche Merkmale (helle Haut, blonde oder rote Haare und blaue Augen). Als wichtigster ätiologischer Faktor gilt die Belastung mit UV-Strahlung und damit verbundene Sonnenbrände, insbesondere in der Kindheit [35, 36]. Dabei dringen UVB- (290-320 nm) und UVA-Strahlung (320-400 nm) entsprechend in die Epidermis bzw. in die Dermis der Haut ein und verursachen nicht nur die Pigmentierung der Haut durch von Melanozyten sezerniertem Melanin, sondern auch die Schädigung derer DNA. Dabei bewirkt UVB besonders die Bildung von Cyclobutan-Dimeren (CPD) bzw. 6-4-Photoprodukten, während

UVA primär durch Bildung von reaktiven Sauerstoffverbindungen (engl. *reactive oxygen species, ROS*) indirekt die DNA schädigt. Im Gegensatz zur UVC-Strahlung (100-280 nm), welche durch die Ozonschicht der Atmosphäre absorbiert wird, tragen UVB- und UVA-Strahlung also zur genomischen Instabilität bzw. zur Generierung von Mutationen und somit zur Bildung von Hautkrebs bei [37–39].

In Anlehnung an ein von Clark postuliertes Model kann die Tumorentwicklung des schwarzen Hautkrebses in unterschiedliche Stadien eingeteilt werden (siehe Abbildung 4), welche von verschiedenen genetischen, morphologischen und histologischen Veränderungen gekennzeichnet sind [40–42]. Dabei stellt der angeborene (kongenitale) oder erworbene Nävus die erste Stufe dar. Hierbei handelt es sich um benigne Neoplasien, die durch eine lokale Proliferation von Melanozyten entstehen. Als Vorläuferläsion des Melanoms können aus jenen gutartigen Nävi strukturell veränderte dysplastische Nävi mit atypischen Zellen entstehen [43]. Es folgt das erste maligne Stadium, die sogenannte radiale Wachstumsphase (engl. *radial growth phase, RGP*). Diese ist durch radial wachsende Zellen in der Epidermis bzw. lokal invasive Zellen in der papillären Dermis gekennzeichnet. In diesem Stadium des Malignen Melanoms weisen die Zellen noch keine Kapazität zum schnellen Wachstum oder zur Metastasierung auf. In der folgenden aggressiven vertikalen Wachstumsphase (engl. *vertical growth phase, VGP*) durchbrechen die Zellen die Basalmembran und filtrieren tief in die Dermis bzw. ins subkutane Gewebe und besitzen die Fähigkeit zur Metastasierung [44]. Das metastasierende Melanom (engl. *metastatic melanoma, MM*) stellt den letzten Schritt der Tumorgenese dar, wobei sich Metastasen sowohl über die Lymph- als auch Blutbahnen ausbreiten und entfernte Organe, wie Leber, Lunge, Gehirn und Knochen, befallen.

Bei dem traditionellen Modell von Clark zur stufenweisen Entwicklung des Malignen Melanoms sollte beachtet werden, dass es sich dabei nur um ein vereinfachtes Modell handelt. So konnte von Bevona *et al.* in 2003 gezeigt werden, dass nur 26 % aller Melanome aus Nävi und davon 43 % aus dysplastischen Nävi entstehen [45]. Wie in jedem neoplastischen System können einzelne Schritte der Tumorentwicklung übersprungen werden oder der Krebs aus Vorläuferzellen [41] bzw. aus tumorinitiierenden Zellen entstehen [46].

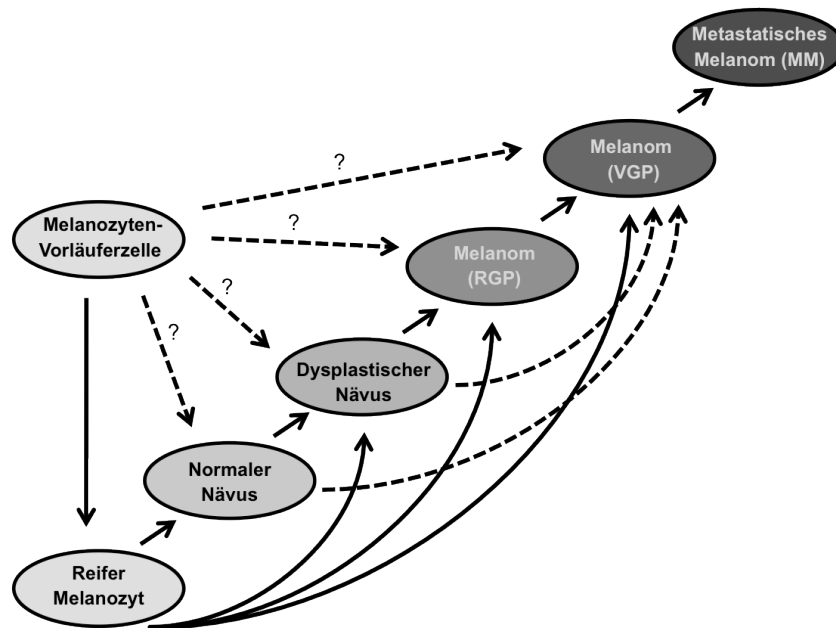


Abbildung 4: Entwicklungsstadien des Malignen Melanoms. In Anlehnung an ein von Clark postuliertes Model. **1)** Reifer Melanozyt **2)** Normaler Nävus **3)** Dysplastischer Nävus **4)** Melanom, radiale Wachstumsphase (RGP) **5)** Melanom, vertikale Wachstumsphase (VGP) **6)** Metastatisches Melanom (MM). Es ist möglich, dass einzelne Schritte übersprungen werden oder der Krebs aus Melanozyten-Vorläuferzellen entsteht. Abbildung verändert nach Haass und Herlyn 2005 [47].

1.2.1 Therapie des Malignen Melanoms

Bereits im Jahre 1840 machte Samuel Cooper die Aussage, dass das Maligne Melanom nur durch eine frühe Entfernung des Tumors therapierbar sei [48]. Bis heute ist die frühe Diagnose, gefolgt von der chirurgischen Entfernung eines Malignen Melanoms die einzig effektive Therapie. Dabei werden 90 % aller Melanome als Primärtumor ohne Anzeichen auf Metastasen diagnostiziert, wobei die 10-Jahres-Überlebensrate bei ca. 75-85 % liegt [31]. Hingegen besitzen Patienten mit fortgeschrittenen Stadien nur sehr schlechte bzw. infauste Prognosen [49]. So liegt die Überlebenszeit beim fernmetastasierenden Melanom nur bei 9-12 Monaten [50]. Trotz vieler klinisch-wissenschaftlicher Bemühungen in den letzten Jahren, waren für das metastatische Melanom vor 2011 lediglich zwei therapeutische Ansätze, nämlich Dacarbazin und hochdosiertes IL2 von der FDA (engl. *Food and Drug Administration*) zugelassen, beide mit Ansprechraten von 10-20 % [51]. Andere zahlreiche Therapieformen, wie Operationen, Strahlen-, Chemo-, Immuntherapie oder auch Kombinationstherapien führten nicht zum gewünschten Therapieerfolg bzw. zur Verbesserung gegenüber Einzeltherapien mit Dacarbazin bzw. dienten nur zu palliativen Zwecken [52, 53]. Neue molekulare

Erkenntnisse führten jedoch in jüngster Zeit zur Entwicklung zweier neuer Präparate zur systemischen Behandlung des metastatischen Melanoms: Vemurafenib (Zelboraf[®] Roche/Genentech/Plexxikon), welches die mutierte Serin-Threonin-Kinase BRAF V600E des MAPK-Signalwegs inhibiert [54] und Ipilimumab (Yervoy[®], Bristol-Myers Squibb), ein monoklonaler Antikörper, der an CTLA-4 (engl. *cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen-4*) auf cytotoxischen T-Zellen bindet und somit immunmodulatorisch wirkt [55]. Beide zeigten erstmals verbesserte und hoffnungsvolle Therapieerfolge [56–58] und wurden 2011 von der FDA zugelassen. Trotz neuer Substanzen sind die derzeit zur Verfügung stehenden Behandlungsmöglichkeiten für das fortgeschrittene Maligne Melanom in ihrer Wirksamkeit begrenzt, weshalb die Suche nach neuen Therapieansätzen unerlässlich ist.

1.3 Dreidimensionale *in vitro* Testsysteme

Die dauerhafte Kultivierung humaner Zervixkarzinomzellen (HeLa Zellen) im Jahre 1951 [59] war ein Durchbruch in der Zellkulturforschung. Seitdem trägt die klassische 2D-Zellkultur zu wichtigen Erkenntnissen und Fortschritten in der Biologie bzw. Medizin bei und ist heutzutage aus der zellbiologischen Forschung nicht mehr wegzudenken. Trotzdem wird immer deutlicher, dass diese Art der Zellkultur die physiologische Umgebung einer Zelle nur bedingt simuliert. Im Vergleich zur 2D-Zellkultur (*monolayer*-Kultur) formen die Zellen im Gewebeverband eine dreidimensionale gewebspezifische Architektur, in der die Zellen in eine extrazelluläre Matrix eingebettet sind. Diese dient dabei nicht nur als mechanische Stütze, sondern vermittelt auch biochemische Signale, kommuniziert mit Zellen und kann z.B. Tumorwachstum und -resistenz gegenüber Therapien vermitteln oder sogar fördern, wie z.B. für das Maligne Melanom gezeigt wurde [60]. In der 2D-Zellkultur gehen die natürlichen zellphysiologischen Eigenschaften von Zellen verloren, wodurch sich verschiedenste Eigenschaften wie z.B. die Genexpression, die Adhäsion, die Migration und Invasion der Zellen, sowie die Radio- und Chemoresistenz ändern können. Im Gegensatz dazu ahmen dreidimensionale Kulturen unterschiedlicher Komplexität wie z.B. Tumorsphäroide und organotypische Hautmodelle, den natürlichen Gewebeverband mit unterschiedlichen Zellpopulationen und deren physiologischen Funktionen nach. Zudem

erlauben sie experimentelle Interventionen und die Reduktion von teuren, zeitintensiven und ethisch problematischen Tierversuchen. Aus diesen Gründen nimmt die dreidimensionale Zellkultur, als wertvolles Bindeglied zwischen der 2D-Zellkultur und der *in vivo* Situation, einen immer größer werdenden Stellenwert in der grundlegenden- und pharmakologischen Tumorforschung ein. So tragen dreidimensionale Tumormodelle nicht nur zur Aufklärung tumorrelevanter Mechanismen, sondern auch zur Akquirierung verlässlicher biomedizinischer Daten bei. Dadurch können im Vergleich zur 2D-Zellkultur neuartige Medikamente sowie Therapiemodalitäten besser auf ihre Wirksamkeit und Sicherheit überprüft und selektioniert werden [61–65].

1.3.1 Tumorsphäroide

Multizelluläre Tumorsphäroide (engl. *multicellular tumor spheroids*, *MCTS*), oder auch einfach Tumorsphäroide genannt, beschreiben kugelförmige, kompakte Zellaggregate, die avaskuläre Tumorknoten, Mikrometastasen oder interkapilläre Mikroregionen eines soliden Tumors imitieren [66–69].

Dabei simulieren Tumorsphäroide in verschiedener Hinsicht das native Tumorgewebe. So kommt es bei beiden zur Ausbildung einer extrazellulären Matrix [70–73] und zur differentiellen Genexpression im Vergleich zur 2D-Zellkultur [74–76]. Des Weiteren entsteht im Tumorsphäroid wie auch im nativen Tumor eine zelluläre Heterogenität, die auf der unterschiedlichen Distribution von Sauerstoff, Nährstoffen und Abfallprodukten beruht [77]. In diesem Zusammenhang führt eine gute Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen zur Entstehung einer proliferierenden Zellpopulation am äußersten Rand der Sphäroide bzw. nahe der Gefäße im Tumorgewebe. Mit zunehmender Entfernung zur Nährstoff- und Sauerstoffquelle und gleichzeitiger Akkumulation von Abfallprodukten steigt die Anzahl ruhender Zellen, die schließlich durch Apoptose bzw. Nekrose im Zentrum sterben [66, 69, 78] (siehe Abbildung 5). In diesem Kontext stellt die Größe des Tumorsphäroids ein entscheidendes Kriterium dar. Da Tumorsphäroide bis zu einem Durchmesser von ca. 150-200 μm noch gut durch Diffusion versorgt werden können, bildet sich erst ab einer Größe von ca. 500 μm der für avaskuläres Tumorgewebe typische, nekrotische Kern [69, 77, 79]. Als Konsequenz der beschriebenen pathophysiologischen Gradienten ergibt sich für

Tumorsphäroide eine Wachstumskinetik ähnlich derer für solide Tumore. Diese beginnt mit einer exponentiellen Wachstumsphase, in der alle Tumorzellen proliferieren, gefolgt von Phasen des linearen und des eingeschränkten Wachstums, in der sich entsprechend Regionen mit ruhenden Zellen und das nekrotische Zentrum bilden [77, 78, 80, 81].

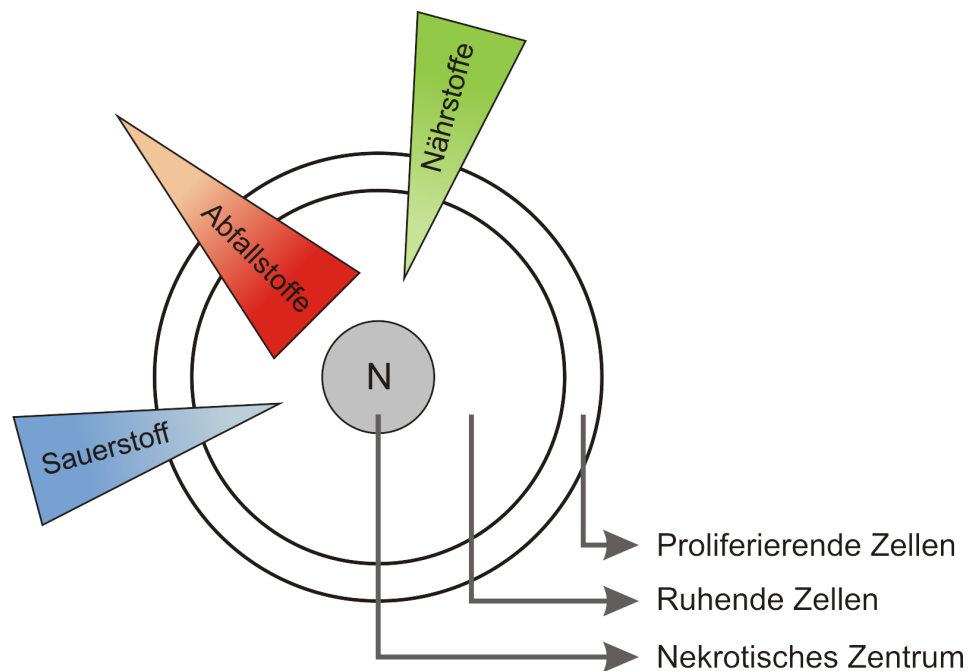


Abbildung 5: Zelluläre Heterogenität eines Tumorsphäroids. Nahe der Nährstoff- und Sauerstoffquelle befinden sich proliferierende Zellen. Mit abnehmender Versorgung und erhöhter Akkumulation von Abfallprodukten steigt die Zahl ruhender Zellen, die schließlich im Zentrum sterben (N=Nekrotisches Zentrum).

1.3.2 Organotypische Haut

Organotypische Haut bzw. Hautäquivalente können, im Gegensatz zu den derzeit verwendeten 2D-Zellkultursystemen, die strukturelle, funktionelle und physiologische Komplexität der natürlichen Haut in hohem Maße rekapitulieren. Um die dreidimensionale Struktur der Haut herzustellen, werden Keratinozyten auf ein dermales Äquivalent mit Fibroblasten aufgebracht und anschließend so kultiviert, dass es zur Ausbildung einer vollständig differenzierten Epidermis kommt.

Auf Grund ihrer hohen Ähnlichkeit zur nativen Haut werden *in vitro* gezüchtete Hautäquivalente in Form von dermalen, epidermalen oder dermalen/epidermalen Hautmodellen nicht nur in der Klinik als Transplantate für chronische Wunden,

schwere Verbrennungen oder andere chirurgische Interventionen eingesetzt [5, 82, 83], sondern sie übernehmen auch wichtige Funktionen als *in vitro* Testsystem in der Grundlagen- und pharmakologischen Forschung [84]. So werden Hautmodelle insbesondere auf dem Gebiet der Tumorbilogie und der Evaluierung neuer Therapiemodalitäten, sowie bei der Überprüfung von Chemikalien, Substanzen und Kosmetika auf deren Sicherheit und potenziell reizenden, toxischen oder ätzenden Eigenschaften [85, 86] und ihre Permeation in die Haut [87-89] verwendet.



Abbildung 6: Humane und murine Haut, sowie Vollhautmodelle im Vergleich. Vollhautmodelle simulieren in hohem Maße die native Haut des Menschen. Murine Haut unterscheidet sich sowohl morphologisch als auch physiologisch.

Die Bedeutung und der Bedarf an organotypischen Hautsystemen nehmen stetig zu. Dies hat mehrere Gründe. Laut einer 2007 in Kraft getretenen EU Verordnung zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung von Chemikalien, kurz REACH (engl. **Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals**) [90], muss die Wirkung von Chemikalien, auch ca. 30.000 Altchemikalien, auf die menschliche Gesundheit untersucht werden. Damit in diesem Zusammenhang die Zahl der Tierversuche nicht unnötig steigt, sieht die Verordnung ausdrücklich alternative *in vitro* Testsysteme vor. Tierversuche werden zwar für dermatologische Studien, wie zur Untersuchung des Malignen Melanoms eingesetzt [91], resultierende Erkenntnisse sind jedoch nur bedingt auf die humane Situation übertragbar, da sich murine und humane Haut sowohl in der Architektur als auch in der Physiologie unterscheiden [92]. So ist die murine Haut dicht besiedelt mit Haarfollikeln, die des Menschen nicht. Die Epidermis der Maus besteht ca. nur aus 3 Zellschichten während die des Menschen aus ca. 6-10 Schichten besteht [93] (siehe Abbildung 6). Vor allem die Lokalisation der

Melanozyten unterscheidet sich dadurch, dass sie in der Maus in den Haarfollikeln angesiedelt sind, während sie beim Menschen der epidermalen Seite der Basalmembran aufliegen [94]. Auch aus ethischen Gründen nimmt die Bedeutung von Tierversuchen ab, während die von Hautmodellen steigt. Unterstrichen wird dies z.B. durch die 7. Änderung der Kosmetikrichtlinie der EU [95], welche ein Verkaufsverbot von an Tieren getesteten Kosmetikprodukten und -rohstoffen bis 2009 bzw. 2013 vorsieht.

Des Weiteren können Hautmodelle auf Grund vorhandener Zell-Zell und Zell-ECM Interaktionen wichtige Einblicke in komplexe Zusammenhänge wie z.B. Gewebsdifferenzierung [96–98], Regeneration [99, 100], Infektion der Haut mit verschiedenen Pathogenen [101], Immunreaktionen [102], Wundheilung [103–105], Hautalterung [106, 107], Angiogenese [108–110], Karzinogenese und andere Hauterkrankungen wie z.B. Psoriasis [111–113] geben. Besonders im Hinblick auf das Maligne Melanom können Hautmodelle mit integrierten Melanozyten und Melanomzellen verwendet werden, um grundlegende Mechanismen, wie z.B. die Transformation, das Wachstum, die Progression und die Invasion besser verstehen, sowie neue Therapiemodalitäten testen zu können. Dabei korreliert im Hautmodell das Invasionspotenzial mit der Aggressivität der jeweilig integrierten Zelllinie, wodurch klinische Progressionsstadien des Malignen Melanoms wiedergegeben werden können [92, 114, 115]. Zellen der radialen Wachstumsphase verbleiben in der Epidermis, während hochaggressive Zellen der vertikalen Wachstumsphase bzw. des metastatischen Stadiums die Basalmembran des Hautmodells durchbrechen und die Dermis invadieren [116, 117].

1.4 Der programmierte Zelltod – Apoptose

Apoptose ist eine Form des programmierten Zelltods und beschreibt einen geregelten, aktiven Prozess, der mit charakteristischen biochemischen und morphologischen Veränderungen einhergeht [118]. So kommt es zur Schrumpfung der Zelle, zur Bildung blasenförmiger Ausbuchtungen an der Zelloberfläche mit Abschnürung der Apoptosekörperchen (engl. *apoptotic bodies*) und zur Bildung eines pyknotischen Kerns mit kondensierter DNA. Diese wird im weiteren Verlauf spezifisch zwischen den Nukleosomen gespalten und somit degradiert. Weiterhin kommt es zur Exposition des Phospholipids Phosphatidylserin, welches während

der Apoptose von der Innenseite auf die Außenseite der Zellmembran transloziert und dort als „eat me“ Signal für phagozytierende Makrophagen dient. Dadurch bleibt eine Entzündungsreaktion im Gewebe aus. Bei der Nekrose kommt es hingegen zur Zerstörung der Zellmembran und somit zur unkontrollierten Freisetzung der Zellinhalte in die Umgebung was eine Entzündungsreaktion hervorruft [119]. Apoptose und Proliferation von Zellen stehen in einem empfindlichen Gleichgewicht, welches für eine intakte Gewebshomöostase unerlässlich ist. Kommt es zu einer Störung in diesem Gleichgewicht, wie der Dysregulation der Apoptose, kann es zu schwerwiegenden Krankheiten kommen [120]. So sind z.B. Tumore häufig apoptoseresistent und sprechen nicht auf onkologische Therapien an. Ein Eingreifen in diese Resistenzmechanismen und die spezifische Induktion der Apoptose in transformierten Krebszellen stellt also einen vielversprechenden Ansatz in der Tumorthherapie dar. So werden zu der Bekämpfung des Malignen Melanoms verstärkt die konstitutiv aktiven Akt- und MAPK-Signalwege kombinatorisch, auch in Kombination mit DNA-schädigenden Agenzien wie Cisplatin, inhibiert und Apoptose induziert [121–125]. Eine weitere Alternative, die in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung gewonnen hat, ist der Todesligand TRAIL, da dieser insbesondere selektiv Apoptose in Tumorzellen induzieren kann.

1.5 TRAIL – gezielte Krebstherapie

TRAIL (engl. *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand*), auch APO2L, CD253, TL2 oder TNFSF10 genannt, gehört zur TNF-Superfamilie (engl. *tumor necrosis factor, TNF*) und wurde auf Grund der hohen Sequenzhomologie zu FasL/Apo1L und TNF identifiziert [126, 127]. TRAIL kann sowohl in voller Länge als Typ II Transmembranprotein aber auch durch eine proteolytische Spaltung als löslicher, homotrimerer Ligand vorliegen.

TRAIL hat in den letzten Jahren zunehmend an Interesse in der modernen, gezielten Krebstherapie gewonnen. So befinden sich rekombinantes TRAIL und agonistische Antikörper gegen die apoptosevermittelnden TRAIL-Rezeptoren in zahlreichen klinischen Studien der Phase I und II [128, 129]. Dies hat verschiedene Gründe. Zum einen besitzt TRAIL wichtige physiologische Funktionen in der Immunantwort gegen virale Infektionen, Tumore und Metastasen [130], zum

anderen konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu TNF und FasL, TRAIL in der Lage ist, selektiv Apoptose in einer Vielzahl von Tumorzellen auszulösen ohne dabei normale Zellen zu schädigen [131–134].

Um Apoptose in transformierten Zellen auszulösen, muss TRAIL in seiner löslichen oder membrangebundenen Form an die Todesrezeptoren TRAIL-R1 (DR4) bzw. TRAIL-R2 (DR5, APO2, TRICK2) binden (siehe Abbildung 7). Beide verfügen über charakteristische intrazelluläre Todesdomänen (engl. *death domain*, *DD*) und können somit den programmierten Zelltod auslösen. Nach der Bindung des Liganden an den Rezeptor und der folgenden Rezeptoroligomerisierung kommt es intrazellulär zur Bildung des sogenannten Todesrezeptorkomplexes (engl. *death inducing signaling complex*, *DISC*) [135]. Hierbei kommt es mittels homophiler Interaktionen zwischen Todesdomänen bzw. Todes-Effektor-Domänen (engl. *death effector domain*, *DED*) zur Rekrutierung des Adapterproteins FADD (engl. *Fas associated protein with death domain*) und der Initiatorcaspase 8 bzw. 10. Nach der autokatalytischen Spaltung und der Bildung aktiver Heterotetramere von Caspase 8, sowie dessen Freisetzung aus dem *DISC*, kann Apoptose über den sogenannten extrinsischen [136] oder zusätzlich über den intrinsischen Signalweg [137] induziert werden. In diesem Zusammenhang unterscheidet man entsprechend zwischen Typ I und Typ II Zellen. In ersteren kommt es mittels aktiver Caspase 8 direkt zur weiteren Prozessierung und Aktivierung von Effektorcaspasen, insbesondere Caspase 3. Diese spaltet relevante Apoptose-Substrate, wodurch es endgültig zur Ausführung des programmierten Zelltods kommt. In Typ II Zellen muss hingegen zur effektiven Induktion der Apoptose das am Rezeptor generierte Signal über die Mitochondrien verstärkt werden. Dies geschieht über die von Caspase 8 / 10 vermittelte Spaltung des Proteins Bid (engl. *Bcl-2 homology domain 3 interacting domain death agonist*) zur trunkierten Form tBid [138]. Letzteres antagonisiert anti-apoptotische Proteine der Bcl-2 Familie, wodurch die pro-apoptotischen Proteine Bax (engl. *Bcl-2 associated protein X*) und Bak (engl. *Bcl-2 antagonist killer*) aktiviert werden. Dadurch kommt es zur Porenbildung in der äußeren Mitochondrienmembran und zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials. Dies resultiert in der Freisetzung von pro-apoptotischen Faktoren wie Cytochrom C, Apaf-1 (engl. *apoptotic protease activating factor-1*) und Smac/DIABLO (engl. *second mitochondria-derived activator of caspases / direct IAP binding protein with low PI*). Apaf-1 bildet unter

ATP-Verbrauch zusammen mit Cytochrom C und Pro-Caspase 9 einen Multi-proteinkomplex, das sogenannte Apoptosom, in welchem es zur Aktivierung von Caspase 9 kommt [139, 140]. Aktive Caspase 9 kann dann wiederum Effektor-caspasen wie Caspase 3 aktivieren und somit Apoptose induzieren [139]. Der intrinsische Signalweg kann jedoch nicht nur rezeptorvermittelt, sondern auch durch verschiedene Stressfaktoren, wie z.B. DNA-Schäden infolge von UV-Strahlung, Chemotherapeutika und oxidativem Stress, induziert werden. Dabei vermittelt der Transkriptionsfaktor p53 zunächst einen Zellzyklusarrest und die Reparatur der DNA. Ist der Schaden allerdings zu groß, kommt es zur Induktion von Apoptose [141, 142].

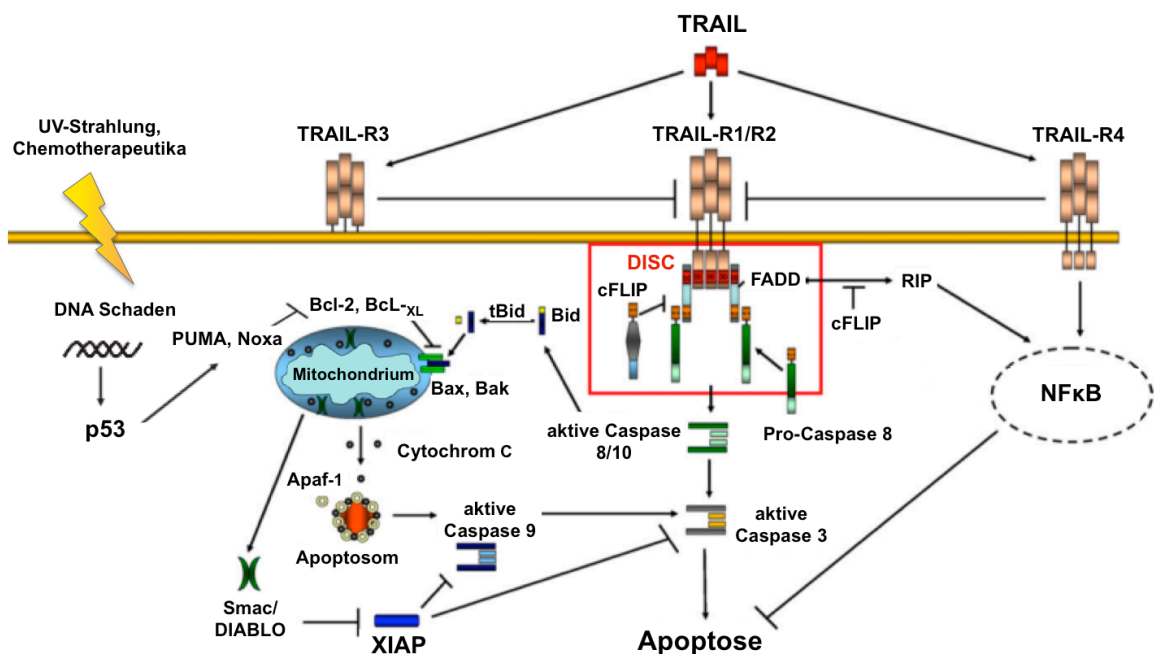


Abbildung 7: Schema des TRAIL-Signalwegs. TRAIL induziert über die Todesrezeptoren TRAIL-R1/R2 Apoptose. Dabei kommt es zur Rekrutierung von Adapterproteinen und zur Ausbildung des *DISC*, in welchem Caspase 8 aktiviert wird. Diese aktiviert im extrinsischen Signalweg direkt Caspase 3. Letztere spaltet Apoptose-Proteine wodurch Apoptose induziert wird. Der intrinsische Signalweg über das Mitochondrium wird z.B. durch DNA-Schaden und Aktivierung von p53 oder durch eine Spaltung von Bid zu tBid durch Caspase 8 vermittelt. Im weiteren Verlauf kommt es zur Porenbildung in der Mitochondrienmembran durch Bax und Bak und zur Freisetzung von Apaf-1 und Cytochrom C ins Cytoplasma. Beide bilden zusammen unter ATP-Verbrauch das Apoptosom, in welchem Caspase 9 aktiviert wird. Diese kann wiederum Caspase 3 aktivieren. Apoptose kann durch anti-apoptotische Proteine wie XIAP, cFLIP, Bcl-2, Bcl-XL inhibiert werden. Anti-apoptotische Wirkungen von TRAIL werden durch die rezeptorvermittelte Aktivierung von NFκB und durch die Bindung an die „Köderrezeptoren“ TRAIL-R3/R4 vermittelt. Abbildung verändert nach Falschlehner *et al.* 2007 [143].

Trotz der apoptotischen Wirkungsweise von TRAIL, konnte für viele primäre Tumore und Krebszellen eine TRAIL-Resistenz nachgewiesen werden, wodurch sie einer Behandlung mit TRAIL als Einzeltherapeutikum nicht zugänglich sind [144–146]. Die TRAIL-Resistenz kann durch verschiedene Mechanismen vermittelt sein, die im Einzelnen tumorspezifisch identifiziert werden müssen. So könnte z.B. die Bindung von TRAIL an die sogenannten „Köderrezeptoren“ (engl. *decoy receptor*), insbesondere DcR1 (TRAIL-R3) und DcR2 (TRAIL-R4, TRUNDD) zur Resistenz beitragen. Jene Rezeptoren besitzen entsprechend keine bzw. nur eine trunke cytoplasmatische Domäne, wodurch sie nicht in der Lage sind, apoptotische Signale weiterzuleiten. Eine direkte Korrelation zwischen der Expression von „Köderrezeptoren“ und der TRAIL-Resistenz wird jedoch kontrovers diskutiert und ist evt. gewebespezifisch [146].

Wahrscheinlicher ist eine Resistenzvermittlung gegenüber TRAIL durch differenzielle Regulierung verschiedener anti-apoptotischer Proteine, welche die apoptotischen Signalkaskaden inhibieren. Zu diesen Faktoren zählen z.B. cFLIP (engl. *cellular FLICE inhibitory protein*), XIAP (engl. *X-linked inhibitor of apoptosis protein*), Bcl_{-XL} (engl. *B-cell lymphoma-2 extra large*), Bcl-2 (engl. *B-cell lymphoma-2*) und Mcl-1 (engl. *myeloid cell leukemia 1 protein*) [146, 147]. Dabei inhibiert FLIP die Aktivierung der Capase 8 im DISC [148] und XIAP die Aktivierung der Caspasen 3, 7 und 9 [149–151]. Bcl_{-XL} und Bcl-2 antagonisieren hingegen die pro-apoptotischen Proteine Bax und Bak und inhibieren somit den intrinsischen Signalweg [152, 153]. Mcl-1 kann an *BH3-only*-Proteine, wie Bid binden und somit Apoptose in Typ II Zellen inhibieren [154]. Die genannten anti-apoptotischen Proteine werden unter anderem durch die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B aufreguliert. NF κ B kann wiederum durch die Bindung von TRAIL an die Todesrezeptoren und den Decoy-Rezeptor DCR1 aktiviert werden und somit zur TRAIL-Resistenz beitragen [143, 155–157] (siehe Abbildung 7).

Auf Grund der Tatsache, dass viele Tumore nicht in der Lage sind, unter alleiniger Gabe von TRAIL Apoptose zu induzieren, rücken zunehmend Therapien in den Mittelpunkt, welche TRAIL mit Chemotherapeutika, Bestrahlung oder spezifischen Apoptose-Inhibitoren kombinieren [158–160]. Über verschiedene Mechanismen wird dabei die Induktion des programmierten Zelltods durch den extrinsischen

bzw. intrinsischen Signalweg forciert und Tumorzellen für die Behandlung mit TRAIL sensitiviert. Dabei muss in präklinischen Studien sichergestellt werden, dass trotz erhöhter Sensitivität die Kombinationstherapien tumorselektiv bleiben und normale Zellen nicht beschädigt werden.

Auch im Falle des radio- und chemoresistenten Malignen Melanoms kommt TRAIL als mögliches Therapeutikum in Frage. Jedoch konnte für eine Vielzahl von Melanomzelllinien und das primäre Melanom gezeigt werden, dass sie resistent gegenüber TRAIL sind [161, 183]. Dabei ist die TRAIL-Resistenz unabhängig vom Progressionsstadium, korreliert aber mit der Inhibition von Caspase 3 durch XIAP. XIAP inhibiert die Prozessierung und somit Aktivierung der Caspase 3 von der 33 kDa-Proform über ein inaktives 21 kDa-Intermediat in das katalytisch aktive 17 kDa-Fragment (siehe Abbildung 8).

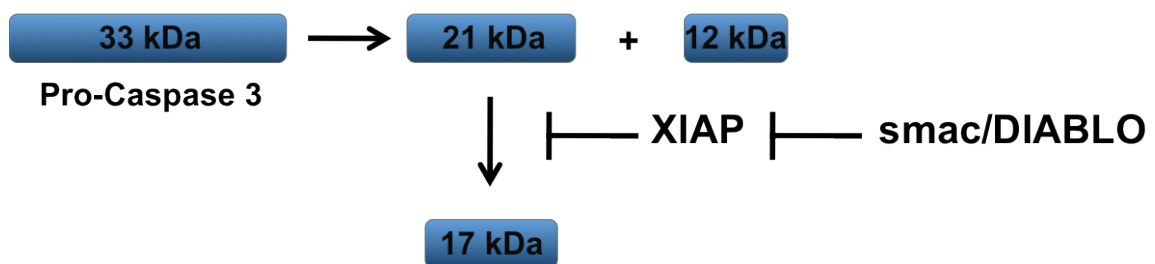


Abbildung 8: Aktivierung und Inhibierung der Caspase 3. Zur Aktivierung wird Caspase 3 von der 33 kDa Proform über ein 21 kDa- Intermediat in ein 17 kDa- Fragment gespalten, welches dann das katalytisch aktive Heterotetramer bilden kann. Die Prozessierung vom 21 kDa- zum 17 kDa-Fragment wird durch das anti-apoptotische Protein XIAP gehemmt. Letzteres wird wiederum durch smac/DIABLO antagonisiert.

Studien der eigenen Arbeitsgruppe konnten jedoch zeigen, dass eine Ko-stimulation von TRAIL-resistenten Melanomzelllinien mit einer subletalen Dosis UVB oder Cisplatin zu einer synergistischen Sensitivierung dieser Zellen führte, ohne gleichzeitig primäre Melanozyten zu schädigen. Dabei ging die Sensitivierung mit der Depletion des anti-apoptotischen Proteins XIAP und der vollständigen Prozessierung und Aktivierung der Caspase 3 einher, wodurch effizient Apoptose induziert wurde [161, 162]. Eine Kombination von TRAIL mit Chemotherapeutika oder Bestrahlung kann also zu einer Resensitivierung von TRAIL-resistenten Melanomzellen führen, indem verstärkt apoptotische Signal-

wege induziert werden, ohne dabei normale Zellen zu schädigen. Insbesondere UVB kann also im Falle des Malignen Melanoms nicht nur als Risikofaktor, sondern auch in subletalen Dosen als mögliches Therapeutikum in Betracht gezogen werden.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob sich TRAIL-resistente Melanomzellen nicht nur in der 2D-Zellkultur, sondern auch unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen gegenüber TRAIL sensitivieren lassen, indem sie zusätzlich mit einer subletalen Dosis UVB oder Cisplatin kostimuliert werden. Dazu sollten verschiedene dreidimensionale Tumorsysteme mit unterschiedlicher Komplexität, nämlich Tumorsphäroide und organotypische Vollhautmodelle mit integrierten Melanomzellen hergestellt werden. Beide Systeme sollten vor der Behandlung auf ihre Ähnlichkeit zum nativen Tumor bzw. zur nativen Haut überprüft werden.

Schließlich sollte ein organotypisches Tumor-Testsystem etabliert werden, welches nicht nur kleine Tumornester, sondern eine avaskuläre, solide Form des Malignen Melanoms mit dessen differenzieller Nährstoffversorgung und daraus resultierender Zellheterogenität simuliert. Mit diesem Testsystem sollte die dreidimensionale Struktur der Haut und des Tumors imitiert werden und eine Kommunikation zwischen beiden ermöglicht werden. Der integrierte Tumor sollte zudem eine spezifische Größe besitzen, um nicht nur das Auswachsen von Tumorzellen, sondern auch die Reduktion eines Tumors analysieren zu können. Insgesamt sollte also ein innovatives 3D-Tumor-Testsystem des Malignen Melanoms entwickelt werden, welches eventuell in der Zukunft verwendet werden kann, um neue Substanzen oder Therapien für diesen bösartigen Krebs auf ihre Wirksamkeit zu evaluieren.

2. Material

2.1 Material für zellbiologische Arbeiten

2.1.1 Melanomzelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Melanomzelllinien WM115 (*VGP*), SBCL2 (*RGP*) und 451-LU (*MM*) wurden freundlicherweise von Dr. Friedegund Meier der Universitäts-Hautklinik Tübingen zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Primäre Hautzellen

Zur Isolation primärer Fibroblasten und Keratinozyten wurde juvenile Vorhaut verwendet. Die Biopsate wurden vom Olga-Krankenhaus, Stuttgart, von Dr. Yurttas und Dr. Tartar, ebenfalls aus Stuttgart, sowie vom Klinikum Ludwigsburg und Klinikum Sindelfingen zur Verfügung gestellt. Zur Isolation primärer Melanozyten wurde adulte Haut verwendet, die von der Klinik Charlottenhaus in Stuttgart zur Verfügung gestellt wurde.

2.1.3 Standard-Zellkulturmedien

Tabelle 1: Benötigte Medien zur Kultivierung primärer Hautzellen und Melanomzelllinien

| Zellen | Medium | Firma |
|-------------------|---|---------------------------|
| Melanomzelllinien | RPMI 1640 [+] L-Glutamin mit Phenolrot | Gibco® life technologies™ |
| Fibroblasten | DMEM [+] 4,5 g/l Glucose [+] L-Glutamin [-] L-Pyruvate | Gibco® life technologies™ |
| Melanozyten | <i>Melanocyte Growth Medium M2, ready to use</i> | PromoCell |
| Keratinozyten | <i>Keratinocyte Growth Medium 2 Kit</i> | PromoCell |

2.1.4 EGM und MM zur Kultivierung von Hautmodellen

Die Medien *EGM* und *MM* zur Kultivierung von Hautmodellen wurden laut Meier *et al.* 2000 [114], Chen *et al.* 1995 [163] und Satyamoorthy *et al.* 1999 [164] mit Modifikationen hergestellt.

2.1.5 Zusätze für Zellkulturmedien

Tabelle 2: Zusätze für Standard-Zellkulturmedien und die Zellkulturmedien *EGM* und *MM* zur Herstellung von Hautmodellen

| Zusatz | Firma, Typbezeichnung |
|--------------------------|---|
| FCS | Hyclone [®] (Thermo Scientific) |
| Penicilin / Streptomycin | Gibco [®] life technologies [™] , Pen Strep [+] 10,000 U/ml Penicilin [+] 10,000 µg/ml Streptomycin |
| Gentamycin | Gibco [®] life technologies [™] , Gentamycin 10 mg/ml |

2.1.6 Enzyme

Tabelle 3: Enzyme für zellbiologische Arbeiten

| Enzym | Firma, Typbezeichnung |
|----------------------|---|
| Trypsin-EDTA | Gibco [®] life technologies [™] , 10x Trypsin-EDTA 0,5 %, 1:10 in 1x Versene |
| Dispase 2 U/ml | Gibco [®] life technologies [™] , in PBS gelöst |
| Kollagenase 500 U/ml | Serva, NB4, in PBS ⁺ gelöst |

2.1.7 Reagenzien zur Stimulation von Melanomzellen und Tumorsphäroiden

Tabelle 4: Substanzen zur Stimulation von Melanomzelllinien und Tumorsphäroiden

| Reagenz | Konzentration | Beziehungsquelle |
|-----------|---------------|---------------------|
| izTRAIL | 100 ng/ml | Dr. Henning Walczak |
| Cisplatin | 1 mg/ml | Jörg Buddenkotte |

2.1.8 Substanzen zum Nachweis nekrotischer und apoptotischer Zellen

Tabelle 5: Farbstoffe bzw. flourophorgekoppelte Substanzen zur Färbung von Zellen zum Nachweis von apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen

| Substanz, Farbstoff | Konzentration | Firma |
|---------------------|---------------|----------------|
| Hoechst 33342 | 1 mg/ml | Sigma-Aldrich® |
| Annexin V-FITC | 0,15 mg/ml | MBL® |
| PI | 100 µg/ml | Sigma-Aldrich® |
| FDA | 0,5 mg/ml | Sigma-Aldrich® |

2.1.9 Chemikalien und Substanzen für zellbiologische Arbeiten

Tabelle 6: Chemikalien und Substanzen für zellbiologische Arbeiten

| Substanz | Firma |
|---|---|
| Trypanblau | Sigma-Aldrich® |
| Rapamycin | Cell Signaling Technology® |
| BSA | Sigma-Aldrich® |
| Paraformaldehyd 4 % (w/v) | Electron Microscopy Sciences |
| Saponin | Sigma-Aldrich® |
| DMEM-Pulver | Gibco® life technologies™, DMEM, Powder, High Glucose |
| Chondroitin-4-Sulfat <i>bovine trachea</i> | Sigma-Aldrich® |
| Chondroitin-6-Sulfat <i>shark cartilage</i> | Sigma-Aldrich® |
| EDTA-Na ₂ -Salz-2 H ₂ O | Sigma-Aldrich® |
| HEPES | Sigma-Aldrich® |
| Natriumchlorid (NaCl) | Carl Roth® |
| Kaliumchlorid (KCl) | Merck Chemicals |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | Merck Chemicals |
| di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat (Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O) | Merck Chemicals |
| Magnesiumchlorid-6-hydrat (MgCl ₂ x 6 H ₂ O) | Carl Roth® |
| Calciumchlorid-dihydrat (CaCl ₂ x 2 H ₂ O) | Carl Roth® |
| Natriumhydrogencarbonat (NHCO ₃) | Carl Roth®, <i>extra pure</i> |

2.1.10 Puffer und Lösungen für zellbiologische Arbeiten

Tabelle 7: Benötigte Puffer und Lösungen für die Zellkultur

| Lösung, Puffer | Zusammensetzung |
|-----------------------------|--|
| PBS (pH 7,2) | 140 mM NaCl 2 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,5 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O |
| PBS ⁺ (pH 7,2) | PBS 0,5 mM MgCl ₂ x 6 H ₂ O 0,9 mM CaCl ₂ x 2 H ₂ O |
| PBS-EDTA | 140 mM NaCl 2 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,5 mM Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O 0,6 mM EDTA |
| Chondroitin-4-Sulfat-Lösung | 25 mg/5 ml PBS ⁺ |
| Chondroitin-6-Sulfat-Lösung | 25 mg/5 ml PBS ⁺ |
| 2x DMEM | 6,65 g DMEM-Pulver 1,85 g NHCO ₃ in 250 ml ddH ₂ O |
| Gelneutralisationslösung | 322,5 ml 2x DMEM 7,5 ml HEPES 3 M 1,25 ml Chondroitin-4-Sulfat 1,25 ml Chondroitin-6-Sulfat 7,5 ml FCS |
| FACS-Puffer (pH 7,4) | 10 mM HEPES 140 mM NaCl 2,5 mM CaCl ₂ |
| Trypanblau 0,5 % (w/v) | 0,5 g Trypanblau + 0,9 g NaCl in 100 ml dH ₂ O |

2.1.11 Geräte für zellbiologische Arbeiten

Tabelle 8: Benötigte Geräte für zellbiologische Arbeiten

| Gerät | Firma, Typbezeichnung |
|---|---|
| Sterilbänke | Thermo Scientific, MSC-Advantage Variolab, Mobilien W 90 |
| Brutschränke 37 °C, 5 % CO ₂ , 100 % Luftfeuchtigkeit | Heraeus, BBD 6220, Varolab [®] , VaroCell |
| Wasserbad / Heizspirale 37 °C | Lauda, 006T / Julabo |
| Zentrifuge | Heraeus, Multifuge 3 S-R bzw. L-R |
| UVB-Lampe | Philips, UVB TL 20 W / 12 RS |
| Casy [®] | Schärfe System, Casy [®] 1 |

2.1.12 Plastikwaren

Tabelle 9: Benötigte Plastikwaren für zellbiologische Arbeiten

| Plastikware | Firma, Typbezeichnung |
|--|---|
| Kryoröhrchen | Greiner bio-one, CRYO.S™ |
| Zellkulturflaschen | Greiner bio-one, CELLSTAR® |
| Zellkulturflaschen für Keratinozyten | TPP® |
| Multiwellplatten und Petrischalen | Greiner bio-one, CELLSTAR® |
| Mikrobiologische Petrischalen, unbeschichtet | Greiner bio-one |
| Petrischale mit Glasboden | Greiner bio-one, CELLview™, 35 x 10 mm mit Glasboden (Dicke 175 µm), 1 Kompartiment |
| Reaktionsgefäße | Eppendorf |
| Falcons | Greiner bio-one, CELLSTAR® |
| Serologische Plastikpipetten | Greiner bio-one, CELLSTAR® |
| Plastikbecher zum Transport von Haut | Greiner bio-one, Mehrzweckbecher 100 ml, 60 x 71 mm |
| Zellsieb 100 µm Nylon | BD Falcon™ |
| Filter zum Sterilfiltrieren 0,2 µm | SARSTEDT, Filtropur S 0.2 |
| 24-Well Inserts für Hautmodelle | Nunc, Nunclon TM Δ Beschichtung, Porengröße 8 µm |

2.1.13 Zubehör für zellbiologische Arbeiten

Tabelle 10: Benötigte Utensilien für zellbiologische Arbeiten

| Zubehör | Firma, Typbezeichnung |
|--|---|
| Kryobehälter „Mr. Frosty“ | Nalgene |
| Pipetten | Gilson bzw. Eppendorf, <i>Research</i> |
| Multistep Pipette zum Ansatz von Tumorsphäroiden | Eppendorf, Multipipette® pro |
| Aufsatz für Multistep Pipetten | Eppendorf, Combitips® PLUS 2,5 ml |
| Multistep Pipette | Eppendorf, Multipipette® plus |
| Pipettierhilfe | IBS Integra Biosciences, PIPETBOYacu |
| Pinzetten | Hammacher Instrumente, z.B. HWC 115-10, HWC 132-14 |
| Neubauer Zählkammer | Optik Labor |
| Deckglas Neubauer Zählkammer | Menzel (Thermo Scientific), 24 x 24 mm, für Haemocytometer optisch plan geschliffen |
| Pasteurpipetten | Hirschmann® Laborgeräte |
| Glaswaren | SCHOTT |

2.2 Material für histologische Arbeiten

2.2.1 Primäre Hautschnitte

Paraffinschnitte von primären Nävi und primären Melanommetastasen wurden freundlicherweise von Prof. Beisert der Hautklinik Dresden und Prof. Schwarz der Hautklinik Kiel zur Verfügung gestellt.

2.2.2 Chemikalien und Substanzen für histologische Arbeiten

Tabelle 11: Chemikalien und Substanzen für histologische Arbeiten

| Lösung, Substanz | Firma, Typbezeichnung |
|---|---|
| Paraffin | LABOnord, Q path Paraffin |
| Roti [®] -Histofix 4 % | Carl Roth [®] |
| Roticlear [®] | Carl Roth [®] |
| Mayers Hämalaun | Merck Chemicals |
| Eosin B | Sigma-Aldrich [®] |
| Isopropanol | Brenntag group |
| Xylol | Carl Roth [®] |
| Ethanol 96 % (v/v) | Alkoholvertrieb Süd |
| Tris-HCl | Carl Roth [®] |
| Tris-Base | Sigma-Aldrich [®] , Trizma [®] |
| Calciumchlorid-dihydrat (CaCl ₂ x 2 H ₂ O) | Carl Roth [®] |
| Glutaraldehyd 25 % (v/v) | Sigma-Aldrich [®] |
| Osmiumtetroxid 4 % (w/v) | ChemPur [®] |
| Azeton | Carl Roth [®] |
| Spurr-Polymerharz | PolyScience |
| Pioloform (w/v) | Plano GmbH, Wetzlar |
| Uranylacetat 1% (w/v) | Serva Electrophoresis, in ddH ₂ O gelöst |
| Bleicitratlösung | Serva Electrophoresis |
| Entwickler | Kodak, D19 Entwickler |
| Fixierer | Tetanal, Superfix |

2.2.3 Lösungen und Puffer für histologische Arbeiten

Tabelle 12: Lösungen und Puffer für histologische Arbeiten

| Lösung, Substanz | Zusammensetzung, Firma |
|---|---|
| Differenzierungsalkohol für Hämalan | HCL 1 M 0,25 % (v/v) in EtOH 50 % (v/v) |
| Eosinlösung 1 % (v/v) | Eosin B mit dH ₂ O verdünnen, 200 ml mit 4 Tropfen konzentrierter Essigsäure ansäuern |
| Waschpuffer Lösung A (pH 7,5) | 65,3 g Tris-HCl 11,8 g Tris-Base ad 500 ml mit ddH ₂ O |
| Waschpuffer Lösung B | 146,1 g NaCl ad 500 ml mit dH ₂ O |
| 1 M Calciumchloridlösung | 7,35 g CaCl ₂ x 2 H ₂ O ad 50 ml mit dH ₂ O |
| Waschpuffer für immunhistologische Färbungen, ca. 4 Wochen bei 4 °C haltbar | 100 ml Waschpuffer Lösung A 30 ml Waschpuffer Lösung B 1 g BSA 2 ml 1 M Calciumchloridlösung ad 1000 ml mit dH ₂ O |
| Gebrauchslösung zur Verdünnung von Antikörpern | Dako, <i>Antibody Diluent with Background reducing Components</i> , S3022 |
| Citratlösung (pH 6) | DakoCytomation, <i>Target Retrieval Solution, Citrate pH 6</i> , 10 x, S 2369 |
| Citratlösung (pH 9) | DakoCytomation, <i>Target Retrieval Solution, Citrate pH 9</i> , 10 x, S 2369 |
| Gebrauchsfertige Citratlösung (pH 6 / pH 9) | DakoCytomation Citratlösung pH 6 / pH 9 1:10 mit dH ₂ O verdünnen |
| DAB Substrat | Dako, <i>Liquid DAB + Substrate Chromogen System</i> , K3468 |
| Gebrauchsfertige DAB Substratlösung | 1 Tropfen DAB auf 1 ml Puffer |
| Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 3 % (v/v) | Merck Chemicals, H ₂ O ₂ 30%ig, 1:10 mit ddH ₂ O verdünnen |

2.2.4 Mikroskope

Tabelle 13: Verwendete Mikroskope

| Mikroskop | Firma, Typbezeichnung |
|---|-----------------------------------|
| Konfokalmikroskop / Software | Zeiss, LSM 710 / Zeiss, ZEN 2009 |
| Fluoreszenzmikroskop mit Hellfeldeinheit | Zeiss, Axiovert 200M, AxioCam HRc |
| Software Fluoreszenzmikroskop | Zeiss, Axio vision rel. 4.8. |
| Lichtmikroskope Zellkultur | Nikon, TMS / Olympus, CKX 41 |
| Transmissionselektronenmikroskop | Zeiss, EM10 |

2.2.5 Geräte für histologische Arbeiten

Tabelle 14: Benötigte Geräte für histologische Arbeiten

| Gerät | Firma, Typbezeichnung |
|--|---|
| Einbettautomat | Shandon (Thermo Scientific), Citadel 1000 |
| Abzug Einbettautomat | Shandon, Hyperclean |
| Wärmeschrank 60 °C | Heraeus |
| Heizplatte 60 °C zur Herstellung von Paraffinblöcken | Snijders, thermal stirrer 34553 |
| Paraffintopf 60 °C | Medax |
| Mikrotom | Leica, RM 2145 |
| Streckbad 38 °C | Medax |
| Kühlplatte | Bavimed |
| Heizplatte 42 °C zum Trocknen von Objektträgern | Medax |
| Dampfgarer | Braun, Multi Gourmet |
| Abzug | Waldner |
| Ultramikrotom | Leica, Ultramikrotom UCT |
| Glasbrechgerät | Leica, KMR2 |

2.2.6 Zubehör für histologische Arbeiten

Tabelle 15: Benötigtes Zubehör für histologische Arbeiten

| Zubehör | Firma, Typbezeichnung |
|--|--|
| Einbettkassetten / Filterpapiere | LABOnord |
| Metallförmchen zur Herstellung von Paraffinblöcken | LABOnord |
| Skalpelle und Skalpellhalter | Bayha [®] GmbH, <i>sterile surgical Blade</i> |
| Objektträger, sialynisiert | Menzel GmbH, <i>Polysine[®] Slides</i> |
| Objektträger, unbeschichtet | LABOnord, Objektträger mit Mattrand |
| Deckgläser | Carl Roth [®] , 24 x 60 mm |
| Glasküvetten | LABOnord |
| Fettstift | Dako, Dako Pen, S2002 |
| Feuchteammer | Tissue Gnostics |
| Gummiformen zur Flacheinbettung | Agarscientific |
| Glasstäbe | Reichert Labtech |
| Metallklebefolie | Plano GmbH, Wetzlar |
| Kupfernetze, 100 mesh | Plano GmbH, Wetzlar, G2100C |
| Filme für TEM | Kodak, EM 4489 |

2.2.7 Primärantikörper für immunhistologische Färbungen

Tabelle 16: Primärantikörper für immunhistologische Färbungen

| Antikörper | Spezies | Verdünnung | Citratlösung | Firma |
|----------------|-----------|------------|--------------|---|
| Caspase 3 | Kaninchen | 1:100 | pH 6 | Cell Signaling Technology [®] , 9664 |
| S100B | Maus | 1:200 | pH 6 | Cell Marque, 330M-15 |
| ABCB5 | Kaninchen | 1:1500 | pH 6 | Sigma [®] Prestige Antibodies [®] |
| Ki 67 | Maus | 1:50 | pH 9 | Dako, clone MIB-1 |
| Zytokeratin 10 | Maus | 1:50 | pH 6 | Dako |
| Zytokeratin 14 | Maus | 1:200 | pH 6 | Santa Cruz [®] |
| Laminin 5 | Maus | 1:50 | pH 6 | Santa Cruz [®] |
| Filaggrin | Maus | 1:50 | pH 6 | Biomeda |
| Involucrin | Maus | 1:50 | pH 6 | Acris Antibodies |

2.2.8 Sekundärantikörper für immunhistologische Färbungen

Tabelle 17: Sekundärantikörper für immunhistologische Färbungen

| Sekundärantikörper | Verdünnung | Firma, Typbezeichnung |
|--|-----------------------|---|
| Envision [™] Sekundärantikörper, Anti-Maus | 2-3 Tropfen / Schnitt | Dako, EnVision [™] <i>Detection Systems Peroxidase/ DAB, Rabbit/Mouse,</i> K5007 |
| Envision [™] Sekundärantikörper, Anti-Kaninchen | 2-3 Tropfen / Schnitt | Dako, EnVision [™] + <i>System-HRP labelled Polymer Anti-Rabbit,</i> K4003 |
| Anti-Maus FITC | 1:50 | Dako, <i>Polyclonal Goat anti-mouse IgG-FITC</i> |
| Anti-Maus Cy3 | 1:1000 | Jackson ImmunoResearch, <i>Cy3 Goat anti-mouse IgG (H+L)</i> |

2.2.9 Substanzen und Kit zum Nachweis von Apoptose im Gewebe

Tabelle 18: Benötigte Substanzen und Kit zum Nachweis von Apoptose im Gewebe

| Kit, Substanz | Firma, Bemerkung |
|-------------------------|--|
| TUNEL Kit | Roche, <i>In Situ Cell Death Detection Kit, POD</i> |
| DNase I 10 U/µl | Roche, <i>DNase I, RNase free</i> |
| Puffer DNase I (pH 7,5) | 50 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 1 mg/ml BSA |
| DNase I 1500 U/ml | 15 µl DNase I in 100 µl Puffer |

2.2.10 Eindeckmedien für histologische Präparate

Tabelle 19: Eindeckmedien für histologische Präparate

| Eindeckmedium | Firma, Typbezeichnung |
|---|---|
| Isomount | LABOnord, Isomount 2000 |
| ProLong [®] Gold ohne / mit DAPI | MolecularProbes [®] life technologies [™] , <i>ProLong[®] Gold antifade reagent / with DAPI</i> |

2.3 Material für biochemische Arbeiten

2.3.1 Kit zur quantitativen Bestimmung von Apoptose

Tabelle 20: Kit zum quantitativen Nachweis von Apoptose in kultivierten Zellen

| Funktion des Kits | Firma, Typbezeichnung |
|--|---|
| Nachweis von Apoptose in kultivierten Zellen | Roche, <i>Cell Death Detection ELISA^{PLUS}</i> |

2.3.2 Proteinmarker

Tabelle 21: Proteinmarker

| Marker | Firma, Typbezeichnung |
|---------------|--|
| Proteinmarker | Fermentas, <i>PageRuler[™] Prestained Protein Ladder</i> |

2.3.3 Primär- und Sekundärantikörper zum Nachweis von Proteinen auf einer Nitrocellulosemembran

Tabelle 22: Primär- und Sekundärantikörper zum Nachweis von Proteinen auf einer Nitrocellulosemembran

| Antikörper | Spezies | Verdünnung | Firma, Artikelnummer |
|--|--------------|------------|--|
| Caspase 3 | Kaninchen | 1:1000 | Cell Signaling Technology [®] , 9662S |
| β-Aktin | Maus (AC-40) | 1:2000 | Sigma-Aldrich [®] |
| IκBα (L35A5) | Maus | 1:1000 | Cell Signaling Technology [®] , 4814 |
| XIAP | Maus | 1:1000 | BD Biosciences, 610717 |
| ECL [™] anti-Kaninchen IgG, HRP linked species specific | Esel | 1:3000 | Amersham, NA934 |
| ECL [™] anti-Maus IgG, HRP linked species specific | Schaf | 1:3000 | Amersham, NA931 |

2.3.4 Geräte für biochemische Arbeiten

Tabelle 23: Benötigte Geräte für biochemische Arbeiten

| Gerät | Firma, Typbezeichnung |
|-------------------------------------|---|
| Western Blot Kammer | PHASE |
| Schüttler | GFL, 3015 |
| Tischzentrifugen | Eppendorf, Centrifuge 5415 R / 5417C |
| Vortexer | LMS [®] , Mixer UZUSIO VTX-3000L |
| Heizblock für Reaktionsgefäße 96 °C | HCL |
| Netzgerät I | Bio Rad, PowerPac Basic |
| Netzgerät II | Consort, E455 |
| Photometer | TECAN, infinite M200 |
| Software Photometer | TECAN, i-control 1.5 |
| Entwickler | AGFA, CURIX 60 |
| Sonifizierer | Bandelin, SONOPULS HD 200 |
| Feinwaage | OHAUS, Adventurer |
| Waage | OHAUS, Precision Standard |

2.3.5 Zubehör für biochemische Arbeiten

Tabelle 24: Benötigtes Zubehör für biochemische Arbeiten

| Zubehör | Firma, Typbezeichnung |
|--|---|
| SDS-PAGE Gelgießkammer | Bio Rad, Mini PROTEAN [®] system, <i>Casting stand</i> |
| SDS-PAGE Dichtung Gelgießkammer | Bio Rad, Mini PROTEAN [®] system, <i>Gaskets</i> |
| SDS-PAGE Glasplatte / mit Abstandshalter | Bio Rad, Mini PROTEAN [®] system, <i>Glass plates / Outer glass plate 3 / 1 mm 5, M-P3</i> |
| SDS-PAGE Taschen | Bio Rad, <i>Ready gel, Loading guide, 10-W</i> |
| Gelschaber | Bio Rad, Mini PROTEAN [®] 3 system, <i>Gel releaser</i> |
| SDS-PAGE Elektrophoresekammer | Bio Rad, Mini PROTEAN [®] 3 system, <i>Cell</i> |
| Nitrocellulose | Whatman [®] (A. Hartenstein), PROTRAN [®] , <i>Nitrocellulose Transfer Membrane</i> |
| Blottingpapier | Whatman [®] (A. Hartenstein), <i>Chromatography Paper, 3 MM Chr, 46 x 57 cm</i> |
| Filme | CEA, <i>RP New, Medical x-ray screen film blue sensitive, 18 x 24, 100 NIF</i> |

2.3.6 Chemikalien und Substanzen für biochemische Arbeiten

Tabelle 25: Chemikalien und Substanzen für biochemische Arbeiten

| Substanz | Firma |
|---------------------------|----------------------------|
| Tris | Carl Roth [®] |
| SDS | Carl Roth [®] |
| Glycerin | Carl Roth [®] |
| β-Mercaptoethanol | Carl Roth [®] |
| Bromphenolblau | Merck Chemicals |
| <i>Blocking Reagent</i> | Roche |
| Maleinsäure | Carl Roth [®] |
| Glycin | Carl Roth [®] |
| Methanol | Carl Roth [®] |
| Tween [®] | Carl Roth [®] |
| Luminol | Sigma-Aldrich [®] |
| para-Hydroxycoumarinsäure | Sigma-Aldrich [®] |
| Ponceau-S | Carl Roth [®] |

2.3.7 Puffer und Lösungen für biochemische Arbeiten

Tabelle 26: Puffer und Lösungen für biochemische Arbeiten

| Puffer, Lösung | Zusammensetzung |
|--|---|
| 2x Lämmli-puffer | 125 mM Tris pH 6,8 SDS 4 % (w/v) Glycerol 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol 10 % (v/v) Bromphenolblau 0,02 % (w/v) |
| Blockierungslösung 10 % (w/v) | <i>Blocking Reagent</i> 10 % (w/v) in Maleinsäurepuffer |
| Maleinsäurepuffer (pH 7,5) | 100 mM Maleinsäure 150 mM NaCl |
| Blockierungs- lösung 1 % (v/v) bzw. 2 % (v/v) | Blockierungslösung 10 % (w/v) verdünnen in TBS-Puffer Tween® 0,05 % (v/v) |
| SDS Elektrophoresepuffer (pH 8,3) | 25 mM Tris 192 mM Glycin SDS 0,1 % (v/v) |
| 5x Tris / Glycin | 125 mM Tris 960 mM Glycin |
| SDS-PAGE Sammelgelpuffer (pH 6,8) | 0,5 M Tris 0,015 M SDS |
| SDS-PAGE Trenngelpuffer (pH 8,8) | 1,5 M Tris 0,015 M SDS |
| Western Blot-Puffer (pH 8,3) | 25 mM Tris 192 mM Glycin Methanol 20 % (v/v) |
| 10x TBS-Puffer (pH 7,5) | 500 mM NaCl 20 mM Tris |
| 1x TBS-Puffer (pH 7,5) | 10x TBS-Puffer 1:10 mit VE-Wasser |
| Waschpuffer | 1x TBS-Puffer Tween® 0,05 % (v/v) |
| ECL-Lösung A | 50 mg Luminol in 200 ml 0,1 M Tris (pH 8,6) |
| ECL-Lösung B | 11 mg para-Hydroxycoumarinsäure in 10 ml DMSO |
| ECL H ₂ O ₂ 35 % (v/v) | Carl Roth®, ROTIPURAN® |
| ECL-Gebrauchslösung | 0,3 µl ECL H ₂ O ₂ 35 % (v/v) 100 µl ECL Lösung B ad 1 ml Lösung A |
| Dura | Thermo Scientific, <i>SuperSignal</i> ®, <i>West Dura Extended Duration Substrate</i> |
| Ponceau-S Gebrauchslösung | Ponceau-S 0,2 % (w/v) Trichloressigsäure 3 % (v/v) |

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Die in den Versuchen der vorliegenden Arbeit verwendeten Melanomzelllinien, sowie die primären Fibroblasten wurden zur Kryokonservierung zunächst geerntet (siehe 3.1.2) und anschließend in FCS mit DMSO 10 % (v/v) resuspendiert (ca. $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml). Primäre Melanozyten wurden hingegen in Melanozytenmedium mit FCS 40 % (v/v) und DMSO 10 % (v/v) resuspendiert. Die Zellsuspensionen wurden in 1,5 ml-Kryoröhrchen bis zum Eichstrich aliquotiert, die befüllten Kryoröhrchen in einen Gefrierbehälter („Mr. Frosty“, Nalgene) überführt und über Nacht bei -80 °C gelagert. Zur langfristigen Lagerung wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen verwendeter Zellen wurden die bei -80 °C bzw. in flüssigem Stickstoff gelagerten Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C erwärmt und die eisfreie Zellsuspension zügig in vorgelegtes, warmes Medium überführt. Nach Zentrifugation der Zellen bei 1000 rpm ($200 \times g$) für 5 min wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellen kultiviert.

3.1.2 Kultivierung von Melanomzelllinien

Die Kultivierung adhärenter Melanomzelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37 °C , 5 % CO_2 und 100 % Luftfeuchtigkeit. Als Medium wurde RPMI 1640 [+] L-Glutamin mit FCS 10 % (v/v) und P/S 1 % (v/v) verwendet. Abhängig von der Wachstumsgeschwindigkeit der jeweiligen Melanomzelllinie erfolgte eine Subkultivierung. In der Regel wurden die Zellen alle 2-4 Tage oder spätestens bei einer Konfluenz von ca. 80 % passagiert (siehe Tabelle 27). Dafür wurden zunächst kalzium- und magnesiumfreies PBS, Trypsin-EDTA und oben genanntes Medium im Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Anschließend wurde das alte Medium mittels Pasteurpipette abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit dem vorgewärmten Trypsin-EDTA überschichtet (ca. 5 ml/T 175 cm^2) und die Flasche zur gleichmäßigen Verteilung des Enzyms geschwenkt. Nach ca. 3 min

bei 37 °C im Brutschrank erfolgte eine optische Kontrolle, ob sich die Zellen abgelöst hatten. Durch Klopfen der Zellkulturflasche konnte der Ablösevorgang beschleunigt werden. Anschließend wurde die Enzymreaktion durch die Zugabe serumhaltigen Mediums abgestoppt und noch haftende Zellen abgespült. Es folgte die Überführung der Zellen in ein Falcon und eine Zentrifugation für 5 min bei 200 x g. Schließlich wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in einem definierten Volumen Medium resuspendiert und ein Teil der Zellsuspension in einer neuen Zellkulturflasche mit frischem Medium (ca. 30 ml/T 175 cm²) weiter kultiviert.

Tabelle 27: Subkultivierung von Melanomzelllinien. Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80 % bzw. nach entsprechender Kultivierungsdauer passagiert.

| Melanomzelllinie | Verdünnung | Entsprechende Kultivierungsdauer |
|------------------|---------------|----------------------------------|
| 451-LU | ca. 1:4 - 1:9 | ca. 2 - 4 Tage |
| SBCL2 | ca. 1:4 | ca. 2 Tage |
| WM115 | ca. 1:3 | ca. 2 Tage |

3.1.3 Isolierung und Kultivierung primärer Keratinozyten

Primäre Keratinozyten und Fibroblasten wurden aus juveniler Vorhaut (lat. *Praeputium*) gewonnen. Die Biopsate wurden vom Olga-Krankenhaus, Dr. Yurttas und Dr. Tartar in Stuttgart, sowie vom Klinikum Ludwigsburg und Klinikum Sindelfingen zur Verfügung gestellt. Der Transport erfolgte in einem Transportbecher gefüllt mit DMEM [+] 4,5 g/l Glucose, [+] L-Glutamin, [-] L-Pyruvat, Gentamycin 1 % (v/v). Nach der Operation erfolgte die Isolierung der Zellen so schnell wie möglich. Dabei wurden die Vorhäute für maximal 3 Tage bei 4 °C gelagert.

Zur Isolierung primärer Keratinozyten wurde zunächst die Vorhaut in eine Petrischale mit nicht adhäsiver Oberfläche überführt, mit einem Skalpell aufgeschnitten und zweimal mit magnesium- und kalziumhaltigen PBS (PBS⁺) gewaschen. Generell wurde darauf geachtet, dass die Haut während der Zellisolation nicht trocken gefallen ist. Nachdem sorgfältig mit Hilfe einer Pinzette und einem Skalpell alle überschüssigen Gewebereste und Fett entfernt wurden, wurde die Haut in ca. 3 x 5 mm große Stücke geschnitten. Für die folgende

Dispasereaktion wurden die Hautstückchen mit PBS gewaschen, in eine unbeschichtete, nicht adhäsive Petrischale (6 cm Durchmesser) überführt und mit ca. 5-7 ml Dispase-Lösung (2 U/ml) vollständig bedeckt. Die Petrischale wurde mit Parafilm M[®] umschlossen und für ca. 16 h bei 4 °C gelagert. Zusätzlich wurden 3 ml des Transportmediums in eine Zellkulturflasche (T 25 cm²) überführt und im Brutschrank bei 37 °C kultiviert. So konnte am nächsten Tag die Sterilität der Probe kontrolliert werden. Zeigte sich keine Kontamination, konnte mit der Isolierung fortgefahren werden. Dafür wurden die Hautstücke mit einer Pinzette festgehalten und mit einer zweiten Pinzette die Epidermis von der Dermis abgezogen. Dermis und Epidermis wurden jeweils getrennt in Petrischalen, gefüllt mit PBS⁺, gesammelt.

Zur Isolierung primärer Keratinozyten wurde die Epidermis weiterverarbeitet. Das PBS⁺ wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette und einer Pipettierhilfe (keine Benutzung der Absaugpumpe) entfernt und die Epidermis einmal mit PBS gewaschen. Um die Keratinozyten aus den Epidermisstücken zu lösen, wurden diese zunächst in noch kleinere Stücke geschnitten (nicht hacken!), in ein Falcon mittels Skalpell überführt und anschließend in 10 ml Trypsin-EDTA (vortemperiert auf 37 °C) für 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Dabei wurde alle 2 min kurz gevortext. Nach abgelaufener Zeit wurde die Enzymreaktion sofort mit 1 ml FCS abgestoppt und die Suspension für 4 min mit Hilfe einer Pipettierhilfe und einer 10 ml Plastikpipette gründlich resuspendiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass wenig Luftblasen und Schaum produziert wurden. Um gewonnene Zellen abzutrennen, wurde die Suspension über ein Sieb (Porengröße 100 µm) filtriert und dreimal mit jeweils 5 ml PBS nachgespült. Dann wurden die Zellen bei 1000 rpm (200 x g) für 5 min zentrifugiert und das Pellet in ca. 2-6 ml Keratinozytenmedium (KBM) mit Gentamycin 1 % (v/v) aufgenommen. Am Ende der Isolation wurde die Zellzahl mittels Casy[®] (siehe 3.1.7) und Trypanblau-Färbung bestimmt, 6×10^5 lebende Zellen/T 75 cm² (TPP[®]) ausgesät und die Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

Primäre Keratinozyten wurden spätestens bei einer Konfluenz von 50-70 % geerntet. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Kulturflasche mit PBS-EDTA bedeckt (5 ml/T 75 cm²) und für 10 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Es folgte eine optische Kontrolle unter dem Mikroskop. Waren die Zellen noch nicht

abgekugelt, so wurde erneut mit frischem PBS-EDTA für 10 min inkubiert. Sobald sich die Zellen abgekugelt hatten, wurden 5 ml Trypsin-EDTA zugegeben und die Zellen für 1-3 min im Brutschrank inkubiert. Die Enzymreaktion wurde mit 1 ml FCS abgestoppt und die Flaschen gründlich mit PBS nachgespült. Nach dem Pelletieren der Zellen (Zentrifugation bei 200 x g für 5 min) konnte die Zellzahl mittels Casy[®] bzw. Trypanblau-Färbung bestimmt werden.

3.1.4 Isolierung und Kultivierung primärer Fibroblasten

Die während der Keratinozyten-Isolierung verbliebene Dermis konnte für die Gewinnung primärer Fibroblasten verwendet werden. Dafür wurde zunächst die in PBS⁺ gelagerte Dermis mittels Skalpell in kleine Stücke geschnitten und gehackt. Um anschließend den Gewebeverband zu lösen, wurden die Dermisstückchen in ein Falcon mit 10 ml Kollagenase-Lösung (500 U/ml) überführt. Es folgte eine 45minütige Inkubation im Brutschrank bei 37 °C. Anschließend wurde zweimal mit DMEM [+] 4,5 g/l Glucose, [+] L-Glutamin, [-] L-Pyruvat gewaschen. Dafür wurde für 5 min bei 200 x g zentrifugiert und der Überstand mittels Pasteurpipette und Pipettierhilfe vorsichtig abgenommen. Damit die Fibroblasten aus den Dermisstückchen auswandern konnten, mussten die Dermisstücke an der Oberfläche der Zellkulturflasche adhären. Um dies zu garantieren, wurden diese lediglich in 2 ml DMEM mit Gentamycin 1% (v/v) in einer Zellkulturflasche (T 75 cm²) über Nacht bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurden weitere 6 ml DMEM mit Gentamycin 1% (v/v) hinzugegeben. Nach 2-3 Tagen wurde erneut das Medium gewechselt. Dabei wurde Gentamycin 1% (v/v) durch P/S 1% (v/v) ersetzt.

Fibroblasten wurden bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Medium wurde DMEM [+] 4,5 g/l Glucose, [+] L-Glutamin, [-] L-Pyruvat verwendet. Zum Passagieren wurden die Zellen geerntet (siehe 3.1.2) und im Casy[®] gezählt. Je nach Bedarf wurden die Fibroblasten ausgesät, wobei 6 x 10⁵ Zellen/T 175 cm² nach ca. 1 Woche wieder konfluent waren.

3.1.5 Isolierung und Kultivierung primärer Melanozyten

Primäre Melanozyten wurden aus adulter Haut isoliert. Diese wurde von der Klinik Charlottenhaus in Stuttgart zur Verfügung gestellt. Auch hier erfolgte der Transport im zuvor genannten DMEM mit Gentamycin 1 % (v/v). Der Hautbedarf betrug ca. 30 cm². Um die Sterilität der Probe zu kontrollieren, wurden 3 ml des Transportmediums in eine Zellkulturflasche überführt und am nächsten Tag auf mögliche Kontaminationen überprüft. Für die Isolation wurde die Haut in eine Petrischale mit nicht adhäsiver Oberfläche überführt und dreimal mit je 10 ml PBS⁺ gewaschen. Generell wurde während der gesamten Prozedur darauf geachtet, dass die Haut nicht trocken gefallen ist. Das Fett sowie überschüssiges Gewebe wurden dann mit Hilfe eines Skalpells und einer Pinzette entfernt. Anschließend wurde die Haut in ca. 2 mm dünne Streifen geschnitten und mit PBS gewaschen. Für die anschließende Dispasereaktion wurden die Hautstreifen in 4 ml Dispaselösung (50 ml Falcon, waagerechte Haltung) im Brutschrank bei 37 °C für 3 h inkubiert. Die Hautstreifen wurden hinterher in eine nicht adhäsive Petrischale überführt, die Dispaselösung vorsichtig abgenommen und die Haut zweimal mit je 10 ml PBS⁺ gewaschen. Durch die Reaktion mit Dispase konnte im Anschluss die Dermis von der Epidermis mittels Pinzetten getrennt werden. Beide wurden jeweils in ca. 5 ml PBS⁺ in nicht adhäsiven Petrischalen gesammelt. Zur Isolierung von Melanozyten wurde mit der Epidermis weiter gearbeitet. Dazu wurden die Epidermisstückchen in 10 ml vorgewärmtes Trypsin-EDTA überführt, kurz gevortext und anschließend für 5 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde sofort mit 1 ml FCS gestoppt. Nach Zugabe von 10 ml PBS⁺ wurde einige Mal kräftig geschüttelt, die Zellsuspension durch ein Sieb (Porengröße 100 µm) filtriert und zweimal mit je 5 ml PBS⁺ nachgespült. Nach einer Zentrifugation bei 200 x g für 10 min wurde das Pellet in 1 ml Melanozytenmedium mit Gentamycin 1 % (v/v) resuspendiert und die Zellzahl mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Zu Beginn der Kultivierung wurden 5 x 10⁴ lebende Zellen/cm²/0,08 ml (6 ml/T 75 cm²) ausgesät. Nach 24 h erfolgte der erste Mediumwechsel.

Die Kultivierung primärer Melanozyten verlief bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. Dabei erfolgte ein Medienwechsel in der Regel alle 4 Tage, wobei in der ersten Woche das Melanozytenmedium mit Gentamycin 1 % (v/v) versetzt wurde. Melanozyten wurden passagiert, wenn die Anzahl der noch vorhandenen

Keratinocyten überhand nahm oder bei einer Konfluenz von ca. 80 %. Dafür wurde das Medium abgesaugt, die Zellen einmal mit PBS gespült und für ca. 3 min bei 37 °C im Brutschrank mit 4 ml Trypsin-EDTA/T 175 cm² inkubiert. Die Reaktion wurde mit FCS abgestoppt und die Zellen pelletiert (Zentrifugation für 10 min, 200 x g). Beim Ablösen der Melanozyten wurde darauf geachtet, dass der zeitliche Ablauf der Trypsinierung eingehalten wurde. So konnten Keratinocyten von Melanozyten getrennt werden. Während sich Melanozyten bereits ablösten, befanden sich Keratinocyten noch abgegukelt an der Oberfläche der Zellkulturflasche. Als wichtiger Hinweis ist noch zu erwähnen, dass zu dicht gewachsene Melanozyten Aggregate bilden und als Kugeln abschwimmen. Die noch lebenden Zellen in diesen Aggregaten können jedoch durch einen 5minütigen Trypsinverdau zurückgewonnen werden. Schließlich erfolgte die Bestimmung der Zellzahl mittels Casy[®]. Nachfolgend wurden 1 x 10⁴ Zellen/cm² ausgesät.

3.1.6 Zellzahlbestimmung und Vitaltest mittels Trypanblau-Färbung

Trypanblau gehört zur Gruppe der Azofarbstoffe, dessen Anion an Proteine bindet. Auf Grund seiner Größe wird Trypanblau nicht von lebenden Zellen mit intakter Zellmembran aufgenommen, sondern nur von toten Zellen, deren Membran durchlässig geworden ist. Lebende Zellen erscheinen im Mikroskop hell leuchtend, während tote Zellen tief blau angefärbt werden. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde ein Aliquot der Zellsuspension 1:1 mit 0,5 %iger (w/v) Trypanblau-Lösung verdünnt und anschließend die Zellen unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer gezählt. Bei letzterer handelt es sich um einen speziellen Objektträger, in welchen Quadrate mit definierter Fläche eingätzt sind. Der Abstand zwischen Deckglas und Objektträger beträgt 0,1 mm und die Fläche eines Quadrates 1 mm². Es ergibt sich somit ein Volumen von 0,1 µl/Quadrat. Die Zellzahl berechnet sich also wie folgt:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{gezählte Zellzahl}}{\text{Anzahl Quadrate}} \times \text{Verdünnung} \times 10^4$$

3.1.7 Automatisierte Zellzahlbestimmung mittels Casy®

Für die automatisierte Zellzählung wurde das Gerät Casy® der Firma Schärfe System verwendet. In der Regel wurden 100 µl der Zellsuspension mit 10 ml Casyton (Elektrolytlösung) verdünnt und nach Vorschrift des Herstellers vermessen. Das Prinzip des Systems beruht auf einer Widerstandsmessung bzw. auf dem Stromausschlussverfahren kombiniert mit einer Pulsflächenanalyse. Dafür werden die in Casyton befindlichen Zellen durch eine Kapillare gesaugt, an die eine Spannung angelegt ist. Durchströmt eine Zelle die Kapillare, so kommt es zu einer Änderung des Widerstandes und ein elektrischer Impuls wird ausgelöst. Dabei entspricht die Anzahl der Impulse 1:1 der Zellzahl. Des Weiteren führt eine vitale, intakte Zelle, welche als elektrischer Isolator angesehen werden kann, zu einem höheren Widerstand als eine tote Zelle, die mit defekter Zellmembran leitfähig wird und bei der nur der Widerstand des Zellkerns gemessen wird. Über die Signalauswertung mittels Pulsflächenanalyse, bei welcher die Pulsfläche proportional zum Zellvolumen ist, wird die Größenverteilungen der Zellen auf einem Display angezeigt und tote Zellen können von lebenden Zellen unterschieden werden.

3.1.8 Stimulation von Melanomzelllinien und primären Hautzellen

Zur Stimulation von Melanom- bzw. primären Hautzellen wurden die Zellen zunächst geerntet und anschließend in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm in 2 ml des entsprechenden Mediums ausgesät. Die Zellzahl wurde dabei so eingestellt, dass am nächsten Tag zur Stimulation eine Konfluenz von ca. 80 % bestand (siehe Tabelle 28).

Für die Stimulation mit UVB (Hier 200 J/m²) wurde das Medium abgenommen und durch 1 ml PBS ersetzt, da das im Medium befindliche Phenolrot UVB absorbiert. Die anschließende Bestrahlung erfolgte dabei in einer Kammer mit 6 UVB Lampen des Typs Philips, UVB TL 20 W / 12 RS. Dabei entsprach eine Bestrahlungsdauer von 1 s einer Dosis von 10 J/m². Die weitere Kultivierung bzw. Stimulation mit izTRAIL (100 ng/ml) oder Cisplatin (20 µM) erfolgte in 1 ml des alten Mediums. Nach 16 h wurden die Zellen samt Überstand geerntet und Apoptose mittels *Cell*

Death Detection ELISA^{PLUS} bestimmt oder zur Gewinnung von Proteinextrakten lysiert (siehe 3.3.1 bzw. 3.3.3).

Tabelle 28: Aussaat von Melanomzelllinien bzw. primären Hautzellen in 3,5 cm Petrischalen zur Stimulation (16 h) bei einer Konfluenz von ca. 80 %.

| Zellen | Zellzahl / 3,5 cm |
|---------------|----------------------|
| Fibroblasten | 15 x 10 ⁴ |
| Keratinocyten | 47 x 10 ⁴ |
| Melanozyten | 47 x 10 ⁴ |
| 451-LU | 29 x 10 ⁴ |
| SBCL2 | 60 x 10 ⁴ |
| WM115 | 30 x 10 ⁴ |

3.1.9 Herstellung dreidimensionaler Tumorsphäroide

In dieser Arbeit wurde zur Herstellung von 451-LU-Tumorsphäroiden die Methode des hängenden Tropfens verwendet [165], bei welcher die Gravitationskraft zur Entstehung von Zellaggregaten führt, wobei eine nicht-adhäsive Oberfläche die Adhäsion der Zellen an die Oberfläche des Kulturgefäßes verhindert. Um eine ausreichende Luftfeuchtigkeit in der Kultur zu garantieren, wurden vorbereitend in 4 nicht adhäsive Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm jeweils 5 ml PBS pipettiert. Zur Herstellung der Tumorsphäroide wurden zunächst die Melanomzellen geerntet, das Zellpellet in RPMI 1640 [+] L-Glutamin mit FCS 10 % (v/v) und P/S 1% (v/v) resuspendiert und die Zellzahl mittels Casy[®] bestimmt. Die gewünschte Konzentration von 40.000 Zellen/4 ml wurde im 6-Well hergestellt und die Zellen mittels gleichmäßiger horizontaler und vertikaler Bewegung homogen verteilt (nicht resuspendieren!). Anschließend wurden in die Deckel oben genannter Petrischalen Tropfen mit einem Volumen von 25 µl der Zellsuspension pipettiert. Dafür wurde die elektrische Multipette[®] pro der Firma Eppendorf verwendet. Zu Beginn der Kultivierung ergibt sich also eine Konzentration von 250 Zellen/Tropfen. Die Deckel mit den Tropfen wurden mit einer gleichmäßigen Handbewegung auf den Boden der Schale gesetzt. Um genug Tumorsphäroide für Versuche zur Verfügung zu haben, wurden in der Regel insgesamt 4 Ansätze, also ca. 16 Petrischalen mit Tumorsphäroiden hergestellt. Dabei wurden die Ansätze nacheinander hergestellt. So wurde verhindert, dass die Zellen in der

Zwischenzeit an den Boden der 6-Well Platte adhärerten und sich somit die Zellkonzentration veränderte. Die Kultivierung hergestellter Tumorsphäroide erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. Nach 5 Tagen wurden pro Tropfen 8 µl frisches Medium hinzupipettiert. Nach 3 weiteren Tagen wurden bei jedem Tropfen 8 µl des verbrauchten Mediums abgenommen und 8 µl frisches Medium hinzugegeben. Dabei wurde darauf geachtet, dass bereits entstandene Zellaggregate nicht entfernt wurden. Die Tumorsphäroide wurden an Tag 12-15 geerntet und für Versuche verwendet.

3.1.10 Stimulation von Tumorsphäroiden

Für die Stimulation von 451-LU-Tumorsphäroiden wurden letztere zunächst geerntet und dafür in einer nicht adhäsiven Petrischale in RPMI 1640 [+] L-Glutamin mit FCS 10 % (v/v) und P/S 1 % (v/v) gesammelt. Um Scherkräfte und mögliche Zerstörung der Tumorsphäroide zu verhindern, wurden diese generell mit Hilfe einer 1 ml Pipette pipettiert. Um danach die Tumorsphäroide auf unterschiedliche Versuchsansätze zu verteilen, wurden jeweils 800 µl des oben genannten RPMI in einer nicht adhäsiven 3,5 cm Schale vorgelegt und ca. 20-30 Tumorsphäroide in 200 µl hinzugegeben. Es folgte die Stimulation mit 100 ng/ml izTRAIL oder 20 µM Cisplatin, welche ins Medium pipettiert wurden. Für die Stimulation mit 200 J/m² UVB wurden die Tumorsphäroide zunächst in so wenig Medium wie möglich in 1 ml PBS überführt und anschließend mit UVB bestrahlt. Um für die weitere Kultivierung den PBS Anteil so gering wie möglich zu halten, wurden jene UVB bestrahlten Tumorsphäroide nach der Stimulation in 100 µl PBS aufgenommen und zu 900 µl RPMI hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation aller Tumorsphäroide für 20 h bei 37 °C im Brutschrank. Um die Auswirkungen der Stimulation zu analysieren, erfolgte der Nachweis von Apoptose bzw. Nekrose (siehe 3.1.12), die Lyse zur Gewinnung von Proteinextrakten (siehe 3.3.3) oder die Evaluierung mittels Lichtmikroskopie (Zeiss, Axiovert 200M).

3.1.11 Färbung von Tumorsphäroiden zum Nachweis apoptotischer und nekrotischer Zellen

Für eine erste Überprüfung gezüchteter 451-LU-Tumorsphäroide auf tote Zellen wurden diese mittels FDA (engl. *Fluorescein diacetate*) und PI (Propidiumiodid) gefärbt. Dabei ist FDA membrangängig und wird von lebenden Zellen mittels Esterasen in das grün leuchtende Fluorescein umgewandelt. Das rot fluoreszierende PI hingegen kann nur in nekrotische Zellen mit durchlässiger Membran eindringen und mit der DNA interkalieren. Für die Färbung wurden die Tumorsphäroide mit 5 µg FDA und 45 µg PI/ml PBS für ca. 20 min inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels Konfokalmikroskopie (Zeiss, LSM 710).

Zum spezifischen Nachweis von apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen im Tumorsphäroid wurden letztere mit Annexin V-FITC, PI und Hoechst 33342 gefärbt. Dabei bindet Annexin V-FITC an Phosphatidylserin, welches während der Apoptose von der Innenseite auf die Außenseite der Zellmembran transloziert. Werden die Zellen jedoch sekundär nekrotisch und die Membranen durchlässig, so kann Annexin V-FITC auch in die Zellen eindringen und an der Innenseite der Membran binden. Um also Apoptose von Nekrose zu diskriminieren, wurden die Tumorsphäroide zusätzlich mit PI gefärbt. Zellkerne wurden mit dem DNA-bindenden und membrangängigen Fluoreszenzfarbstoff Hoechst 33342 gefärbt. Lebende Zellen zeigten also nur die typisch blaue Kernfärbung, apoptotische Zellen waren Annexin V-FITC positiv, nekrotische Zellen hingegen Annexin V-FITC und PI bzw. zum späteren Zeitpunkt der Nekrose nur noch PI positiv.

Für die Färbung wurden die Tumorsphäroide geerntet (siehe 3.1.10) und mittels 70 µl Medium in 430 µl FACS-Puffer überführt. Dabei erfolgte die Färbung im 24-Well. Es folgte zunächst die Färbung mit 3 µg/ml Hoechst für 30 min. Anschließend wurde mit 0,375 µg/ml Annexin V-FITC für 15 min und schließlich mit 0,6 µg/ml PI für 5 min gefärbt. Alle 3 Färbungen erfolgten im gleichen Well und im Dunkeln bei Raumtemperatur. Die gefärbten Tumorsphäroide wurden durch zweimaliges Überführen in jeweils 500 µl FACS-Puffer gewaschen.

Die Analyse der gefärbten Tumorsphäroide erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie (Zeiss, LSM 710). Dafür wurden die Tumorsphäroide mit Hilfe einer 1 ml Pipette in

einem Tropfen auf eine 3,5 cm Petrischale mit Glasboden (Greiner bio-one, CELLview™) überführt. Um eine dreidimensionale Darstellung zu erhalten und verschiedene Ebenen des Sphäroids zu mikroskopieren, wurden Z-Stapel aufgenommen. Dabei betrug der Abstand zwischen den Ebenen 5 µm. Für die Aufnahmen benötigte Einstellungen wurden mit dem sogenannten *smart setup* der Software (Zeiss, ZEN 2009) eingestellt. Die Fluoreszenzintensität wurde über die Verstärkung (engl. *gainmaster* und *digital gain*) sowie die Laserleistung eingestellt. Des Weiteren wurde die konfokale Blende auf 1 Airy Einheit eingestellt. Die Bildqualität wurde über die Scangeschwindigkeit und Anzahl der Bilder bestimmt. Dabei betrug die Auflösung in der Regel 1024 x 1024 Pixel. Schließlich wurde in der Regel das 20x-Objektiv und der Vergrößerungsfaktor von 1 verwendet.

3.1.12 Herstellung organotypischer Vollhautmodelle

Zur Herstellung organotypischer Hautmodelle wurde vorbereitend mindestens einen Tag zuvor Kollagen Typ I bei 4 °C aufgetaut. Dieses wurde im Vorfeld am Fraunhofer Institut für Grenzflächen und Bioverfahrenstechnik IGB Stuttgart aus Rattenschwänzen isoliert und bei -80 °C gelagert. Das aufgetaute Kollagen kann über einen sehr langen Zeitraum bei 4 °C aufbewahrt werden. Des Weiteren wurden Gelneutralisationslösung (GNL) und Kultivierungsmedien (*MM* und *EGM*) hergestellt.

Für die Herstellung des Vollhautmodells wurde zunächst der dermale Anteil des Äquivalents produziert (siehe Abbildung 9). Dafür wurde vorbereitend gekühltes Kollagen I nach Bedarf portioniert, kurz bei 200 x g für 2-5 min zentrifugiert und bis zum Gebrauch wieder bei 4 °C gelagert. Dadurch konnten Luftblasen aus dem Kollagen entfernt werden. Im Anschluss wurden primäre Fibroblasten geerntet und die erforderliche Zellzahl im benötigten Volumen GNL resuspendiert (siehe Tabelle 29). Die Zellsuspension wurde dann zügig und möglichst luftblasenfrei in kaltem Kollagen resuspendiert bzw. eingerührt. Dazu wurde in der Regel eine 10 ml bzw. 25 ml Plastikpipette verwendet. Dabei betrug das Verhältnis von Kollagen zu GNL entsprechend 3:1. Mit Hilfe einer Multistep Pipette (Eppendorf) wurde die zähflüssige Kollagensuspension auf 24-Well *Inserts* (Nunc) verteilt (500 µl/*Insert*). Da die Suspension schnell gelierte, wurde auch hier zügig gearbeitet. Nach dem Ausgelieren wurde der dermale Anteil des Hautmodells submers

in DMEM [+] 4,5 g/l Glucose, [+] L-Glutamin, [-] L-Pyruvat mit FCS 10% (v/v) und P/S 1 % (v/v) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Bei der Herstellung des dermalen Anteils ist zu beachten, dass immer ein Überschuss berechnet werden muss. Ein Volumen berechnet für 30 Gele reichte in der Praxis für ca. 24 Gele.

Am nächsten Tag erfolgte die Aussaat primärer Keratinozyten (siehe Abbildung 9 und Tabelle 29). Dafür wurden die Gele submers in *EGM* 1% P/S (v/v) für 2 h bei 37 °C im Brutschrank äquilibriert. Kurz vor der Aussaat primärer Keratinozyten wurde restliches Medium entfernt. Geerntete Keratinozyten wurden in ca. 1-4 ml *EGM* resuspendiert und mittels Casy[®] gezählt. Nach der Aussaat der Keratinozyten (siehe Tabelle 29) erfolgte eine Inkubation der Gele für 1½ h bei 37 °C im Brutschrank. Damit wurde eine ausreichende Adhäsion der Keratinozyten gewährleistet. Schließlich wurden die Gele vorsichtig mit *EGM*, P/S 1% (v/v) überschichtet und danach mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze vom Rand des *Inserts* gelöst. Die submers-Kultivierung der Hautmodelle erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit. An Tag 3 und 5 der Kultivierung erfolgte ein Mediumwechsel. Während der submers-Kultivierung war zu beobachten, dass auf Grund der Aktivität der Fibroblasten die Hautäquivalente schrumpften (siehe Abbildung 10).

An Tag 7 wurde auf die sogenannte *air-liquid*-Kultivierung umgestellt (siehe Abbildungen 9 und 10). Dies beschreibt die Kultivierung der Hautmodelle an der Luft-Flüssigkeitsgrenze. Dazu wurden die Hautmodelle mit einer sterilen Pinzette jeweils in ein 6-Well überführt und restliches *EGM* abgesaugt. Im Anschluss wurde der Spiegel des nun verwendeten *MM* Mediums mit P/S 1 % (v/v) so eingestellt, dass nur die Dermis von Medium versorgt wurde, während die Epidermis an der Luft exponiert war. Die Modelle wurden weiterhin bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Ein Medienwechsel erfolgte alle 2-3 Tage. Nach 10-17 Tagen wurden laufende Versuche abgebrochen und die Hautmodelle fixiert (siehe 3.2.1), in Paraffin eingebettet (siehe 3.2.2), Dünnschnitte (siehe 3.2.4) angefertigt und immunhistochemisch analysiert.

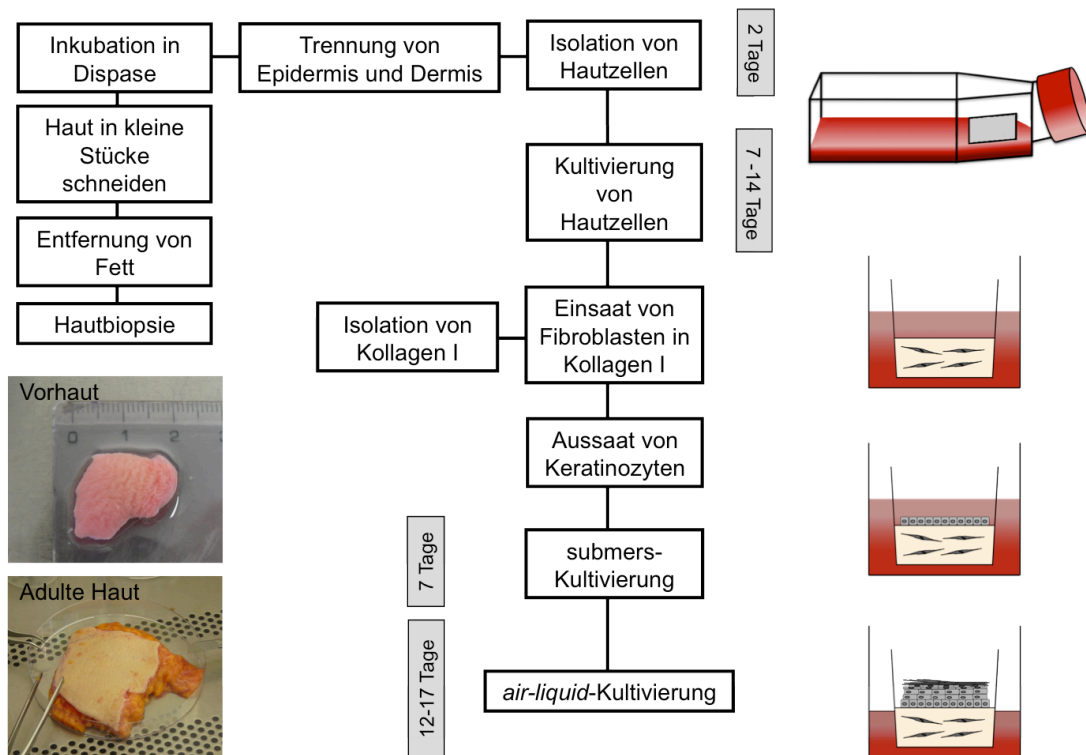


Abbildung 9: Schematische Darstellung zur Isolierung primärer Hautzellen sowie zur Herstellung eines organotypischen Hautmodells mit typischer Einsaat von Fibroblasten in Kollagen I und Aussaat von Keratinozyten. Letztere proliferieren und differenzieren entsprechend während der submers- und *air-liquid*-Kultivierung.

Tabelle 29: Zur Herstellung organotypischer Hautmodelle verwendete Zellen und ihre benötigte Zellzahl. Das Volumen des dermalen Anteils inklusive Fibroblasten +/- 451-LU-Zellen / Sphäroide betrug zum Zeitpunkt der Herstellung 500 μ l. Diese setzten sich entsprechend aus Kollagen I und GNL im Verhältnis 3:1 zusammen. Keratinozyten +/- SBCL2- bzw. WM115-Zellen wurden in einem Volumen von 100 μ l ausgesät.

| Zellen | Zellzahl/ml |
|----------------|--------------------|
| Fibroblasten | 10×10^4 |
| Keratinozyten | 20×10^4 |
| 451-LU | 2×10^4 |
| SBCL2 | $14,4 \times 10^4$ |
| WM115 | 20×10^4 |
| Tumorsphäroide | ca. 20 Stück |

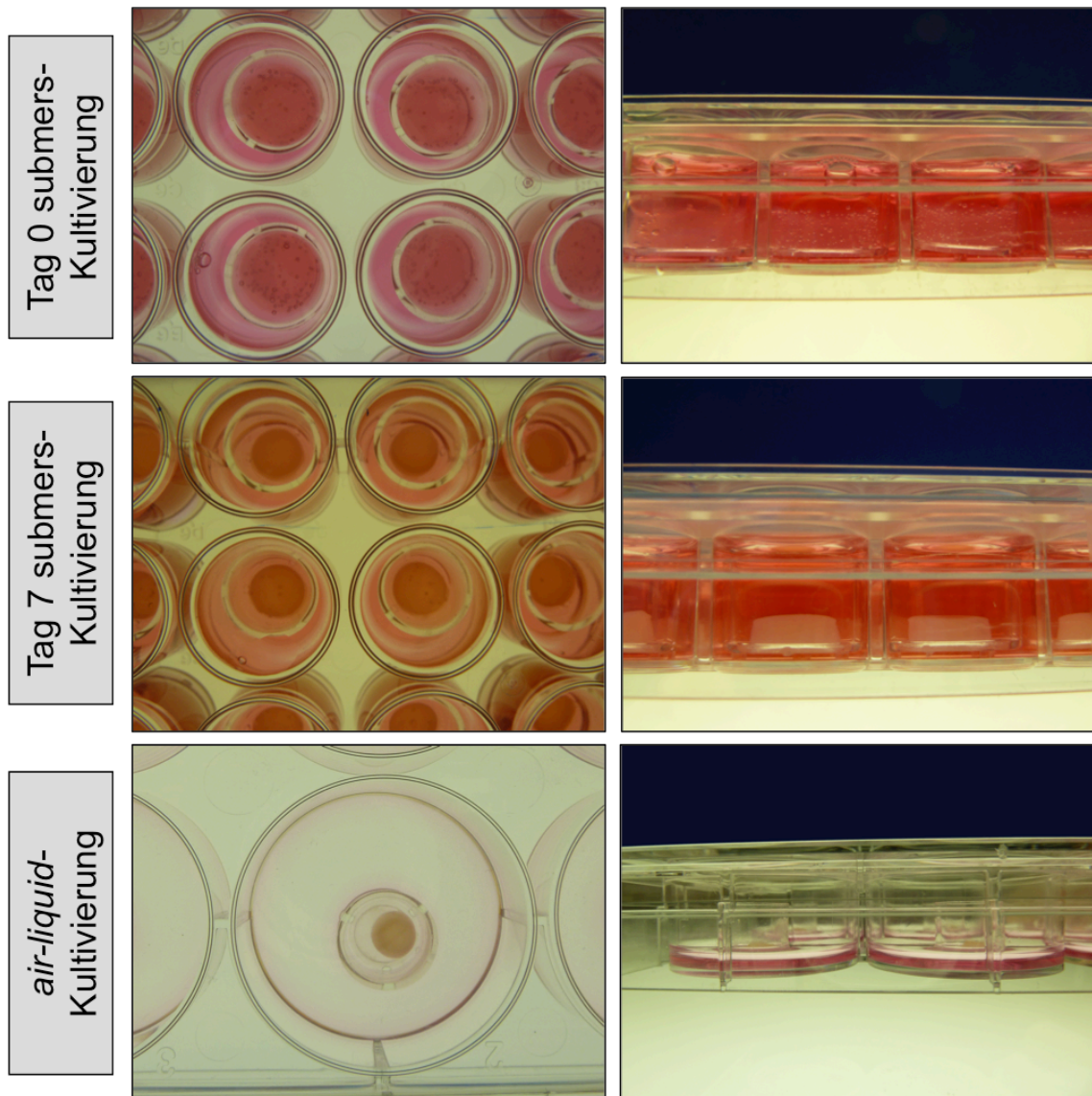


Abbildung 10: Herstellung eines organotypischen Hautmodells. An Tag 7 der submers-Kultivierung sind die Hautmodelle geschrumpft und luftblasenfrei. Die *air-liquid*-Kultivierung findet im 6-Well statt. Hierbei wird der Spiegel des Mediums so eingestellt, dass nur die Dermis von Medium versorgt wird, während die Epidermis an der Luft exponiert ist.

3.1.13 Integration von Melanomzelllinien ins Hautmodell

Die Herstellung von Hautmodellen mit integrierten Melanomzelllinien (WM115, SBCL2, 451-LU) erfolgte analog zu 3.1.12. Lediglich wurden zusätzlich SBCL2 und WM115 in die Epidermis und 451-LU in die Dermis eingesät. Für letzteres wurden 451-LU-Zellen in einem Verhältnis 1:5 mit Fibroblasten versetzt (siehe Tabelle 29), für 5 min bei 200 x g zentrifugiert und dann in GNL resuspendiert. SBCL2 bzw. WM115 wurden entsprechend 1:7 bzw. 1:5 mit Keratinozyten

gemischt, zentrifugiert, in 100 µl EGM resuspendiert und ausgesät (siehe Tabelle 29). Die Analyse der Tumornestgröße in fixierten und in Paraffin eingebetteten (*FFPE*, engl. *formalin fixed paraffin embedded*) Hautmodellen erfolgte mittels der frei zugänglichen Software ImageJ des *National Institutes of Health*.

3.1.14 Integration von Tumorsphäroiden ins Hautmodell

Zur Herstellung von Hautmodellen mit 451-LU Tumorsphäroiden wurden letztere in die Dermis integriert (siehe Tabelle 29 und Abbildung 11). Dazu wurden ca. 15 Tage alte Sphäroide geerntet, in einer nicht adhäsiven Petrischale gefüllt mit *EGM* 1% P/S (v/v) gesammelt und in wenig Medium mit einer 1 ml Pipette zu den bereits in GNL resuspendierten Fibroblasten hinzupipettiert. Für die Herstellung wurden ca. 8 Petrischalen mit Tumorsphäroiden (siehe 3.1.9) für 15 Hautgele verwendet. Auch hier wurde immer ein Überschuss berechnet. Aus 15 hergestellten Gelen mit Tumorsphäroiden wurden in der Praxis ca. 10 Stück für Versuche verwendet. Nachdem die Dermis gegossen wurde, wurde sofort kontrolliert, welche Gele Tumorsphäroide enthielten, da diese am Anfang noch als helle Aggregate zu erkennen waren (siehe Abbildung 11). So konnte die Qualität der Hautgele mit integrierten Tumorsphäroiden vor Versuchsbeginn sichergestellt werden.

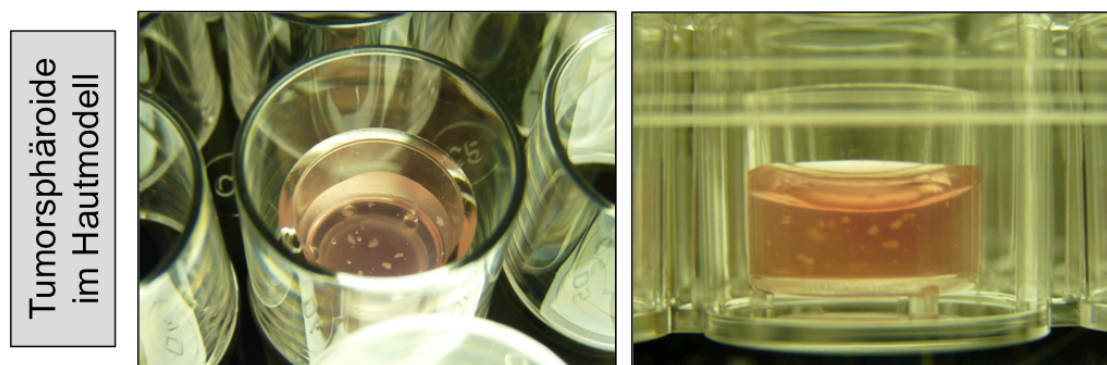


Abbildung 11: Herstellung von Hautmodellen mit 451-LU-Tumorsphäroiden. Tumorsphäroide wurden in den dermalen Teil des organotypischen Hautmodells integriert. Sie sind direkt nach der Herstellung noch als helle Aggregate innerhalb des Kollagen I zu erkennen.

3.1.15 Stimulation von Hautmodellen

Vollhautmodelle wurden zu verschiedenen Zeitpunkten und mit verschiedenen Dosen izTRAIL, Cisplatin und UVB stimuliert. Dabei wurde in der Regel zwischen einer Langzeitstimulation (Tag 7 - Tag 17 der *air-liquid*-Kultivierung, 250 ng/ml TRAIL, 2,5 μ M Cisplatin, 200 J/m² UVB) und einer Kurzzeitstimulation (Tag 10 - Tag 14 der *air-liquid*-Kultivierung, 250 ng/ml TRAIL, 20 μ M Cisplatin, 400 J/m² UVB bei Tumornestern und 500 ng/ml TRAIL, 40 μ M Cisplatin bei integrierten Tumorsphäroiden) unterschieden. In beiden Fällen korrelierte die Stimulation mit dem Mediumwechsel und erfolgte alle 2 bzw. 3 Tage. Dazu wurde altes *MM* abgesaugt und genau 1 ml neues Medium mit P/S 1% (v/v) hinzugegeben. IzTRAIL und Cisplatin wurden im Anschluss in das vorgelegte Medium pipettiert. Hingegen erfolgte die UVB-Bestrahlung nach dem Absaugen des alten Mediums und ohne PBS. Erst im Anschluss wurde hier neues Medium hinzugegeben.

3.2 Histologische Methoden

3.2.1 Immersionsfixierung von Hautmodellen mit Roti[®]-Histofix

Die Fixierung organotypischer Vollhautmodelle erfolgte mit säurefreier (pH 7), phosphatgepufferter 4 %iger Formaldehydlösung (Roti[®]-Histofix, Carl Roth[®]). Dafür wurde das entsprechende Kulturmedium abgesaugt und das Hautäquivalent submers im 24-Well für ca. 3 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C in Roti[®]-Histofix inkubiert. Nach erfolgter Fixierung wurde das Hautmodell vorsichtig mit einer gebogenen Pinzette aus dem *Insert* genommen und in eine mit Bleistift beschriftete Einbettkassette inklusive Filterpapier überführt. Anschließend wurde das Fixans mittels Leitungswasser im Einbettautomat wieder entfernt (siehe Tabelle 30). Das restliche Roti[®]-Histofix wurde in einem gesonderten Abfallbehälter entsorgt. Fixierungsarbeiten erfolgten generell unter dem Abzug.

3.2.2 Einbetten von Hautmodellen in Paraffin

Ziel der Paraffineinbettung ist, Hautmodelle in eine feste Konsistenz zu überführen, so dass sich dünne Schnitte davon anfertigen lassen. Da Paraffin nicht wasserlöslich ist, mussten die fixierten und gewässerten Hautmodelle aus

3.2.1. zunächst über eine Alkoholreihe entwässert werden. Zudem ist Paraffin nicht alkohollöslich, weshalb die Proben anschließend in dem organischen Lösungsmittel bzw. Intermediat Xylol getränkt wurden. Im letzten Schritt wurden die Kassetten in geschmolzenes Paraffin eingetaucht. Dabei verdampft das Xylol und wird durch flüssiges Paraffin ersetzt. Alle genannten Schritte erfolgten automatisch im Einbettautomaten (Shandon, Citadel 1000, Programm A, siehe Tabelle 30).

Tabelle 30: Entfernung des Fixans und Einbettung von Hautmodellen in Paraffin mittels Einbettautomat (Shandon, Citadel 1000, Programm A).

| Schritt | Zeit [h] |
|-------------------------|----------|
| Leitungswasser I | 1 |
| Leitungswasser II | 1 |
| Ethanol 70 % (v/v) | 1 |
| Ethanol 90 % (v/v) | 1 |
| Ethanol 96 % (v/v) | 1 |
| Isopropanol I | 1 |
| Isopropanol II | 1 |
| Isopropanol / Xylol 1:1 | 1 |
| Xylol I | 1 |
| Xylol II | 1 |
| Flüssiges Paraffin I | 3 |
| Flüssiges Paraffin II | 3 |

3.2.3 Herstellung von Paraffinblöcken

Damit die Hautmodelle mittels Mikrotom geschnitten werden konnten (siehe 3.2.4), mussten Paraffinblöcke hergestellt werden. Dazu wurden die Kassetten samt Hautmodellen aus dem Einbettautomat genommen, in eine mit flüssigem Paraffin gefüllte Glasküvette überführt und diese auf einer 60 °C heißen Heizplatte platziert. Auch das Arbeitswerkzeug (Metallförmchen, Pinzette, Skalpell und Einbettkassetten) wurden zum Arbeiten auf der Heizplatte erhitzt. So wurde garantiert, dass das Paraffin flüssig bzw. das Arbeitswerkzeug nicht am Hautmodell kleben blieb. Die Hautmodelle wurden mit einer Pinzette aus den Einbettkassetten entnommen und mit einem Skalpell in der Mitte durchgeschnitten. Ein Metallförmchen, gefüllt mit flüssigem Paraffin, wurde so auf einer Metallplatte bei RT platziert, dass das flüssige Paraffin am Boden des Förmchens

anfang zu erstarren. Das Hautmodell konnte mit der Schnittfläche nach unten auf dem erstarrten Paraffin platziert werden. Die beschrifteten Einbettkassetten bildeten den jeweiligen Blockträger. Der Paraffinblock wurde bei 4 °C abgekühlt, wodurch das Paraffin erstarrte und der Block aus der Form entnommen werden konnte. Überschüssiges Paraffin an den Rändern des Blocks wurde entfernt, wodurch der Block gleichmäßig ins Mikrotom eingespannt werden konnte.

3.2.4 Herstellung von Schnittpräparaten mittels Rotationsmikrotom

Um 3 µm dünne Schnitte von Hautmodellen herzustellen, wurde ein Rotationsmikrotom verwendet (Leica, RM 2145). Die Paraffinblöcke der Hautmodelle wurden auf einer Kühlplatte der Firma Bavimed platziert und der jeweilig gekühlte Paraffinblock in den Probenhalter eingespannt. Der Fingerschutz wurde entfernt, die Handradbremse entriegelt und mit dem groben Vortrieb die Klinge am Block positioniert. Durch eine gleichmäßige Bewegung des Handrades wurde der Paraffinblock an der Klinge vorbeigeführt. Zu Beginn wurde die Haut durch Trimmen (30 µm Schnitte) bis zu einer Tiefe offengelegt, in der ein repräsentativer Schnitt erzeugt werden konnte. Anschließend wurden entweder Einzelschnitte oder ein Schnittband mit aneinander hängenden Schnitten mit einer Dicke von 3 µm hergestellt. Dabei ist darauf zu achten, dass häufig die ersten Schnitte eine größere Schnittdicke aufweisen. Auch die Temperatur des Blockes und die Schneidegeschwindigkeit haben einen Einfluss auf die Dicke des Schnittes. War das Messer stumpf, so wurde die Position der Klinge verändert. Der Schneidewinkel betrug 2,5°. Die Schnitte wurden mit Hilfe einer Pinzette und einer streichenden Handbewegung auf die Oberfläche 38 °C warmen VE-Wassers überführt. Die gestreckten Schnitte wurden auf Objektträger gezogen und überschüssiges Wasser durch senkrecht Platzieren der Objektträger auf einem Papiertuch entfernt. Es wurde darauf geachtet, dass sich im Wasserbad keine Luftblasen oder Reste von Paraffin befanden. Für Hämatoxylin-Eosin-Färbungen wurden unbeschichtete Objektträger (LABOnord, Objektträger mit Mattrand) verwendet. Die Schnitte wurden für 1 h bei 42 °C auf einer Heizplatte getrocknet. Für immunhistochemische Färbungen wurden hingegen sialynisierte Objektträger (Menzel GmbH, Polysine®) verwendet und nur 2 Schnitte / Objektträger mit

genügend Abstand aufgezogen. Letztere Schnittpräparate wurden über Nacht bei 37 °C im Wärmeschrank getrocknet.

3.2.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Schnittpräparaten

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung, kurz HE-Färbung, ist eine Standardfärbung in der Histologie. Sie dient zur grundsätzlichen Beurteilung hergestellter Hautmodelle. Während der HE-Färbung färbt das kationische, basische Hämalaun alle sauren bzw. basophilen Strukturen blau. Dazu zählen der Zellkern mit der enthaltenen DNA und das raue Endoplasmatische Retikulum. Hämalaun wird aus dem im Blauholzbaum natürlich vorkommenden Hämatoxylin gewonnen [166]. Das anionische, saure Eosin färbt hingegen alle basischen bzw. acidophilen Strukturen rot, insbesondere Zellplasmaproteine.

Vor der eigentlichen Färbung wurden die Hautschnitte vom Paraffin befreit (Deparaffinierung). Dafür wurden die Objektträger mit den entsprechenden Präparatschnitten für ca. 30 min in den Wärmeschrank (60 °C) gestellt. Das geschmolzene Paraffin wurde dann mittels Roticlear® und einer absteigenden Alkoholreihe vollständig entfernt (siehe Tabelle 31). Nach Überführung der Schnitte in VE-Wasser erfolgte eine 8minütige Färbung in Mayers Hämalaun. Überschüssiger Farbstoff wurde danach unter schwach fließendem VE-Wasser ausgespült und die Färbung durch kurzes Eintauchen in eine HCL-Lösung differenziert. Anschließend wurden die Schnitte für 5 min in lauwarmem Leitungswasser inkubiert. Dabei vermittelt die Erhöhung des pH-Wertes einen Farbumschlag von rot-braun zum typischen blau-violett (Bläuen, siehe Tabelle 31). Es folgte die Zytoplasma-Färbung mittels Eosin für 1 min. Überschüssiges Eosin wurde durch VE-Wasser und kurzes Eintauchen in 70 %igen Ethanol entfernt. Es folgte eine aufsteigende Alkoholreihe bis hin zum reinen Isopropanol, wodurch den Schnitten das Wasser entzogen wurde. Zur Herstellung von Dauerpräparaten wurden die Schnitte schließlich in Isomount mit Hilfe eines Deckglases eingedeckt. Alle genannten Schritte wurden unter dem Abzug durchgeführt. Die gefärbten Schnitte wurden über Nacht unter dem Abzug getrocknet und konnten dann lichtmikroskopisch (Zeiss, Axiovert 200M) analysiert werden.

Tabelle 31: Deparaffinierung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Eindecken von Hautmodellen.

| Schritt | Zeit | Funktion |
|-----------------------------|-------------------------------------|------------------|
| Wärmeschrank 60 °C | 30 min | Deparaffinierung |
| Roticlear® I | 10 min | |
| Roticlear® II | 3 min | |
| Ethanol I 96 % (v/v) | 2 min | |
| Ethanol II 96 % (v/v) | 2 min | |
| Ethanol 70 % (v/v) | 2 min | |
| Ethanol 50 % (v/v) | 2 min | |
| VE-Wasser | bis Turbulenzen nicht mehr sichtbar | Hämalaun-Färbung |
| Mayers Hämalaun | 8 min | |
| VE-Wasser, schwach fließend | bis Hämalaun ausgespült | |
| HCL-Lösung | 2 x kurz eintauchen | |
| VE-Wasser | kurz | |
| Leitungswasser | 5 min | Bläuen |
| Eosin B 1% (v/v) | 1 min | Eosin-Färbung |
| VE-Wasser | kurz | |
| Ethanol 70 % (v/v) | 2 x kurz eintauchen | |
| Ethanol 96 % (v/v) | 2 min | Entwässern |
| Isopropanol I | 5 min | |
| Isopropanol II | 5 min | |
| Isomount | - | Eindecken |

3.2.6 Immunhistochemische Färbung von Hautmodellen

Zum Nachweis spezifischer Antigene in Hautmodellen wurden 3 µm dicke Schnitte (2 Schnitte / Objektträger) zunächst deparaffiniert und anschließend die Epitope in einem Dampfgarer demaskiert (siehe Tabelle 32). Für die Hitzedemaskierung wurde der Dampfgarer mit VE-Wasser bis zur Markierung befüllt und ein Plastikgefäß mit gebrauchsfertiger Citratlösung pH 9 oder pH 6 hineingestellt. Letztere wurde für 25 min vorgeheizt, bis schließlich die Schnitte für weitere 20 min in der entsprechenden Citratlösung gegart wurden (siehe Tabelle 32). Die Schnitte wurden für 15 min bei RT in der Citratlösung abgekühlt bis sie schließlich in Waschpuffer überführt wurden.

Tabelle 32: Deparaffinierung und Hitzedemaskierung von Schnittpräparaten für folgende immunhistochemische Färbungen.

| Schritt | Zeit | Funktion |
|--|-------------------------------------|--------------------------------|
| Wärmeschrank 60 °C | 15 min | Deparaffinierung |
| Roticlear® I | 15 min | |
| Roticlear® II | 15 min | |
| Ethanol I 96 % (v/v) | 2 min | |
| Ethanol II 96 % (v/v) | 2 min | |
| Ethanol 70 % (v/v) | 2 min | |
| Ethanol 50 % (v/v) | 2 min | |
| VE-Wasser | bis Turbulenzen nicht mehr sichtbar | |
| Dampfgarer (Citratlösung bereits 25 min vorgeheizt, nach Roticlear® I anstellen) | 20 min | Hitzedemaskierung der Antigene |
| Citratlösung | 15 min | Abkühlung der Schnitte bei RT |
| Waschpuffer | - | Waschen |

Die eigentliche immunhistochemische- bzw. Antikörperfärbung erfolgte dann in einer Feuchtekammer, welche mit Wasser durchtränkten Papiertüchern ausgekleidet wurde. Die Schnitte wurden mit einem Fettstift umrandet und sofort wieder mit Waschpuffer benetzt. Generell wurde darauf geachtet, dass während der gesamten Färbung die Schnitte nicht trocken gefallen sind. Um bei der Färbung störende Fettreste zu entfernen, wurden die Schnitte dreimal gewaschen. Dazu wurde der Waschpuffer mittels Pasteurpipette und Absaugpumpe entfernt und die Schnitte sofort wieder mit Waschpuffer bedeckt. Im Anschluss wurde der Waschpuffer durch einfaches Abklopfen auf Papiertüchern entfernt und die Schnitte zum Blocken endogener Peroxidasen mit 3 %iger H₂O₂-Lösung für ca. 5 min inkubiert. Nach erneutem Waschen (einfaches Abklopfen), erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4 °C über Nacht. Dafür wurde der Antikörper mit *Antigen Diluent* (Dako) entsprechend verdünnt (siehe Tabelle 16) und jeder Schnitt mit 100 µl der Antikörperverdünnung bedeckt. Damit eine gleichmäßige Färbung garantiert war, wurde die Position der Feuchtekammer mittels Wasserwaage kontrolliert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte erneut dreimal durch einfaches Abklopfen mit Waschpuffer gewaschen. Es folgte die Inkubation mit dem entsprechenden Sekundärantikörper. Dafür wurden pro Schnitt 2-3

Tropfen des anti-Maus bzw. anti-Kaninchen Antikörpers (Dako, EnVision™) verwendet. Es folgte eine Inkubation für 30 min bei RT. Nach erneutem 3maligen Waschen erfolgte die Umsetzung des Chromogens 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) durch die an den Sekundärantikörper gekoppelte HRP (engl. *Horseradish peroxidase*). Dadurch erhielten erkannte Antigene ihre typische Braunfärbung. Für die Substratumsetzung wurde 1 Tropfen DAB Substrat mit 1 ml Substratpuffer (Dako, *Liquid DAB + Substrate Chromogen System*) vermischt und 100 µl jener fertigen Substratlösung auf jeden Schnitt pipettiert. Die Umsetzung des DAB in einen braunen Farbstoff erfolgte binnen weniger Sekunden bis hin zu 10 min. Die Reaktion wurde durch Überführung der Schnitte in VE-Wasser gestoppt. Die Gegenfärbung mit Hämalaun erfolgte laut Tabelle 33. Schließlich wurden die Schnitte analog zur HE-Färbung in Isomount eingedeckt.

Tabelle 33: Gegenfärbung immunhistochemisch gefärbter Schnitte mit Mayers Hämalaun.

| Schritt | Zeit | Funktion |
|---------------------|-------------------------|------------------|
| Mayers Hämalaun | 2x kurz eintauchen!!! | Hämalaun-Färbung |
| VE-Wasser, fließend | bis Hämalaun ausgespült | |
| Leitungswasser | 2-3 min | Bläuen |
| Ethanol 96 % (v/v) | 2 min | Entwässern |
| Ethanol 99 % (v/v) | 2 min | |
| Isopropanol I | 5 min | |
| Isopropanol II | 5 min | |
| Isomount | - | Eindecken |

3.2.7 Nachweis von Apoptose mittels TUNEL im Gewebe

Im Gewebe kann Apoptose über die TUNEL-Färbung (engl. *terminal deoxynucleotidyl transferase [TdT]-mediated deoxyuridinetriphosphat [dUTP] nick end-labeling*) nachgewiesen werden [167]. Dabei macht man sich zu Nutze, dass während der Apoptose die DNA fragmentiert wird. Eine terminale Desoxynukleotidyltransferase markiert die freien 3'OH-Enden der DNA mit Fluoreszeinmarkierten dUTP-Molekülen, welche anschließend im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden können. In einem weiteren Schritt kann das Signal mit einem POD-gekoppelten anti-Fluoreszein-Antikörper für lichtmikroskopische

Untersuchungen sichtbar gemacht werden. Obwohl eine unspezifische Mitfärbung von vereinzelt Nekrosen bei massivem DNA-Abbau nicht ausgeschlossen werden kann, stellt die TUNEL-Färbung ein spezifisches Verfahren zum Nachweis von Apoptose dar.

In dieser Arbeit wurde das *In Situ Cell Death Detection Kit, POD* der Firma Roche verwendet und das produktspezifische Protokoll verwendet. Vor der eigentlichen TUNEL-Färbung wurden analog zur immunhistochemischen Färbung die Hautschnitte deparaffiniert, Epitope im Dampfgerar demaskiert (Citratlösung pH 6), die Schnitte mit einem Fettstift umrandet, gründlich gewaschen und endogene Peroxidasen geblockt. Auch hier erfolgte die Färbung in einer Feuchtekammer. Im weiteren Verlauf der TUNEL-Färbung wurde mit PBS anstatt mit Waschpuffer gearbeitet. Als Positiv-Kontrolle wurde ein Schnitt für 10 min bei RT mit DNase I (1500 U/ml, in 50 mM Tris-HCL pH 7,5 mit 10 mM MgCl₂ und 1 mg/ml BSA) inkubiert. Nach 2maligem Waschen wurden die Schnitte mit jeweils 50 µl Reaktionsmix bzw. als negativ Kontrolle mit *label-solution* des Kits für 1 h bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Hierbei wurde die Position der Feuchtekammer mit einer Wasserwaage überprüft. Nach 3maligem Waschen wurden die Schnitte mit *ProLong[®] Gold* ohne DAPI eingedeckt. Für eine anschließende Analyse mittels Lichtmikroskop wurden die Schnitte mit PBS bedeckt und zunächst mittels Fluoreszenzmikroskop analysiert. Im Anschluss wurden die Schnitte für 30 min bei RT mit dem im Kit befindlichen POD Antikörper inkubiert. Es folgte eine Chromogenumsetzung und Gegenfärbung mit Hämalaun.

3.2.8 Elektronenmikroskopische Analyse von Tumorsphäroiden

Zur elektronenmikroskopischen Analyse von 451-LU-Tumorsphäroiden wurde in dieser Arbeit die sogenannte Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), eine Betriebsart der Elektronenmikroskopie, verwendet. Dabei werden zur Abbildung anstatt Licht beschleunigte Elektronen verwendet. Da letztere, im Gegensatz zu Licht, eine viel kürzere Wellenlänge besitzen, kann eine deutlich höhere Auflösung erreicht werden als mit einem Lichtmikroskop. In einem Elektronenmikroskop werden in der sogenannten Elektronenkanone freie Elektronen erzeugt und in Richtung einer Anode beschleunigt. Um den Elektronenstrahl zu lenken und zu

bündeln, kommen magnetische Linsen zum Einsatz. Damit die Elektronen nicht auf ihrem Weg mit Gasmolekülen kollidieren, muss ein Vakuum angelegt werden. Da bei einem TEM die Elektronen das Objekt durchstrahlen, muss das Objekt entsprechend dünn sein.

Um 451-LU-Tumorsphäroide mittels TEM untersuchen zu können, mussten die Sphäroide zuvor aufbereitet werden. Dazu wurden diese fixiert, dehydriert, eingebettet und Ultradünnschnitte angefertigt.

Zunächst wurden die 451-LU-Tumorsphäroide mit Glutaraldehyd und anschließend mit Osmiumtetroxid (OsO_4) fixiert. OsO_4 kontrastiert gleichzeitig Lipide schwarz. Für die Fixierungen wurden zunächst die Tumorsphäroide in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß geerntet und das RPMI abgenommen. Anschließend wurden sie so mit einer 25 %igen Glutaraldehyd-Stammlösung und PBS gemischt, dass eine ca. 2,5 %ige Glutaraldehyd-Lösung entstand, in welche die Tumorsphäroide für 1 h bei RT inkubiert wurden. Im Anschluss wurden die Sphäroide dreimal mit PBS gewaschen. Dazu wurde das Reaktionsgefäß mit PBS gefüllt und für 10 min bei 200 x g zentrifugiert. Die Aldehydlösungen wurden in einem gesonderten Abfallbehälter gesammelt. Für die folgende OsO_4 -Fixierung wurden die Tumorsphäroide so mit PBS und einer 4 %igen (w/v) OsO_4 -Lösung im Reaktionsgefäß vermischt, dass die Endkonzentration einer ca. 1%igen (v/v) OsO_4 -Lösung entsprach. Die Probe wurde für 1 h bei RT inkubiert.

In der folgenden Dehydrierung wurde schrittweise Wasser entzogen und durch Azeton ersetzt. Dafür wurden die Tumorsphäroide zunächst in 30 %igem (v/v), 50 %igem (v/v), 70 %igem (v/v), gefolgt von 90 %igem (v/v) und zweimal 100 % igem (v/v) Azeton für jeweils 15 min bei RT inkubiert.

Um später Ultradünnschnitte mittels Ultramikrotom anfertigen zu können, mussten die Tumorsphäroide eingebettet werden. In diesem Fall wurde dafür Spurr-Polymerharz [168] verwendet. Zunächst wurden die Sphäroide mit 2/3 Azeton zu 1/3 Spurr gut vermischt und für 1 h bei RT inkubiert. Dann wurde der Deckel des Reaktionsgefäßes geöffnet und über Nacht unter dem Abzug stehen gelassen. So konnte das Azeton verdampfen. Am nächsten Morgen wurde zweimal für jeweils 1 h bei RT mit 100 % Spurr inkubiert. Generell wurden alle Spurr-Abfälle gesondert gesammelt. Schließlich folgte die Flacheinbettung der Tumorsphäroide in

Gummiformen. Dafür wurden jeweils 2 Tumorsphäroide in 1 Gummiform pipettiert und jeweils randständig an die beiden schmalen Enden der Form platziert. Da Spurr noch beim Trocknen schrumpft, wurden die Formen noch soweit mit 100 %igem Spurr aufgefüllt, bis sich das Spurr über dem Bett gewölbt hat (jedoch nicht überlief). Die Formen kamen dann für 48 h bei 60 °C in einen Wärmeschrank. Die Tumorsphäroid enthaltenden Spurr-Blöckchen konnten aus der Gummiform gedrückt und für die Anfertigung von Schnitten verwendet werden.

Zur Anfertigung ultradünner Schnitte wurde ein Ultramikrotom (Leica, Ultramikrotom UCT) verwendet. Vorbereitend mussten dazu extrem scharfe Messer hergestellt werden. Dazu wurden Glasstäbe mittels eines Glasbrechgerätes (Leica, KMR2) erst zu Quadraten und dann zu Dreiecken geritzt und gebrochen. Dabei wurde die Qualität der hergestellten Glasmesser optisch kontrolliert und schärfstmögliche Schnittflächen rausgesucht. Zusätzlich wurde um die Klinge ein Trog bzw. „Schiffchen“ aus Metallklebefolie hergestellt und mit Nagellack abgedichtet. Der geformte Trog wurde später mit VE-Wasser befüllt, so dass die Schnitte während des Schneidens auf dem Wasser schwimmen konnten. Zum Schneiden wurden die Blöcke zunächst mit einer scharfen Rasierklinge getrimmt, anschließend das Messer zum Präparat ausgerichtet und dünne Schnitte angefertigt. Dabei konnten die Dicke und Gleichmäßigkeit der Schnitte über dessen Interferenzfarben bestimmt werden. Für die Analyse mittels TEM wurden silber-goldene Schnitte mit einer Dicke von ca. 80-100 nm verwendet. Mehrere Schnitte wurden schließlich mit Hilfe einer Wimper, welche zuvor mittels Nagellack an ein Zahnstocher befestigt wurde, auf dem Wasser zusammengeführt und anschließend auf ein mit Pioloform beschichtetes, feines Kupfernetz (engl. *grid*) überführt. Letzteres fungierte also als Objektträger und wurde bereits im Vorfeld hergestellt. Dafür wurde ein Glasobjektträger in Chloroform mit 0,8 % (w/v) Pioloform eingetaucht und anschließend der Objektträger so in Wasser eingetaucht, dass der entstandene Film abschwimmen konnte. Der auf dem Wasser schwimmende Film wurde mit Kupfernetzen (matte Seite nach unten) belegt. Mit Parafilm M[®] konnte die Folie mit den fest anhaftenden Netzen aus dem Wasser gehoben werden.

Da schwere Atome wie Blei oder Uran stärker Elektronen streuen als leichte Atome und somit den Kontrast erhöhen, wurden zur Negativkontrastierung die

grids mit der Präparatseite nach unten zunächst auf einem Tropfen ddH₂O mit Uranylacetat 1 % (w/v) platziert und für 6 min inkubiert. Nach kräftigem Abspülen der Kupfernetze mit ddH₂O und Absaugen des restlichen Wassers mit einem Filterpapier wurden die *grids*, erneut mit der Präparatseite nach unten, auf einen Tropfen wässriger Bleicitratlösung [169] platziert und für 4 min inkubiert. Nach nochmaligem Waschen und Trocknen wurden die Kupfernetze in einer geeigneten Aufbewahrungsbox verstaut und am nächsten Tag mittels TEM mikroskopiert und die Bilder entwickelt.

Um am TEM (Zeiss, EM10) aufgenommene Bilder zu entwickeln, wurden die Filme bei genau 20 °C für 5 min in Entwickler (Kodak D19) inkubiert und anschließend mit ddH₂O kurz gewaschen. Es folgte eine Inkubation für 10 min bei genau 20 °C in Fixierer (Tetanal, superfix). Nachdem die Bilder für 20 min in ddH₂O gewaschen wurden, wurden sie Luftgetrocknet und eingescannt.

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 Nachweis von Apoptose in kultivierten Zellen

Zur quantitativen Bestimmung von Apoptose wurde das *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* Kit der Firma Roche verwendet. Dieses bestimmt im Zytoplasma angereicherte Histon-assoziierte DNA-Fragmente (Mono- und Oligonukleosomen). Die Durchführung erfolgte nach Protokoll des Kits. Zuvor wurden stimulierte Zellen (siehe 3.1.8) geerntet, in 1 ml PBS resuspendiert und die Anzahl lebender Zellen mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Generell wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Des Weiteren erfolgte die Analyse mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm. Um schließlich die Apoptoserate behandelte Zellen im Bezug zu unbehandelten Zellen zu errechnen (Akkumulierungsfaktor, engl. *enrichment factor*), wurde das Verhältnis zwischen der Absorption stimulierter und unbehandelter Zellen gebildet. Des Weiteren wurde festgelegt, dass ein Akkumulierungsfaktor von 2 einer Apoptoserate von 10 % entspricht. Zellen, die 30 % Apoptose aufweisen, sind stark sensitiv, die Zellen, die 10 % Apoptose aufweisen sind leicht sensitiv und Zellen, die weniger als 10 % Apoptose aufweisen sind resistent gegenüber einem Stimulus.

3.3.2 Herstellung von Proteinextrakten aus Melanomzellen

Zur Bestimmung der Proteinexpression wurden kultivierte Melanomzellen inklusive Zellen, die sich im Überstand befanden geerntet und anschließend das Pellet je nach Volumen in 50-70 μl 96 °C heißen Lysepuffer (2x Lämmli-puffer) resuspendiert. Es folgte eine Inkubation im Heizblock für 10 min bei 96 °C. Dann wurden die Proben sonifiziert (1 Puls, Ms73/D, Cycle 50) und erneut für 5 min bei 96 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 13,000 rpm (16000 g) für 5 min wurde das Zellysate abgenommen, in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und für die Analyse mittels Western Blot eingesetzt oder bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.3 Herstellung von Proteinextrakten aus Tumorsphäroiden

Zur Herstellung von Proteinextrakten aus 451-LU-Tumorsphäroiden wurden ca. 30 Sphäroide zusammen mit den Zellen des Überstandes in ca. 70 μl 2x Lämmli-puffer resuspendiert und anschließend sonifiziert (1 Puls, Ms73/D, Cycle 50). Die Proben wurden dann für ca. 1 h bei 96 °C inkubiert, anschließend zentrifugiert (5 min, 13000 rpm bzw. 16000 g), das Lysat in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und für die Analyse mittels SDS-PAGE und Western Blot eingesetzt oder bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.4 SDS-PAGE

Zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde die SDS-PAGE (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) verwendet [170]. Dabei denaturiert SDS die Proteine und verleiht ihnen eine negative Ladung in einem konstanten Masse-Ladungs-Verhältnis. β -Mercaptoethanol zerstört Disulfidbrücken und somit die räumliche Struktur des Proteins. Die Elektrophorese fand bei konstanten 120 V statt. Um einen optimalen Trennbereich für Proteine unterschiedlicher Molekulargrößen zu erhalten, wurden Trenngele mit verschiedenen Polyacrylamidkonzentrationen hergestellt. Die Zusammensetzung der verschiedenen Polyacrylamid-Lösungen sind in folgenden Tabellen wiedergegeben.

Tabelle 34: Benötigte Substanzen und deren Volumina für die Herstellung des Sammelgels für die SDS-PAGE.

| Substanz | Sammelgel Volumen 3 ml |
|-------------------------|---------------------------|
| H ₂ O | 1,7 ml |
| 30 % AA: 0,8 % Bis | 0,5 ml |
| 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) | 0,75 ml |
| APS 10 % (w/v) | 30 µl |
| Temed | 3 µl |

Tabelle 35: Benötigte Substanzen und deren Volumina für die Herstellung von Trenngelen mit unterschiedlichen Polyacrylamidkonzentrationen für die SDS-PAGE.

| Substanz | Trenngel, Volumen 15 ml | | | | | |
|----------------------------|-------------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| | 8 % | 10 % | 12 % | 13 % | 14 % | 15 % |
| H ₂ O | 7,1 ml | 6,2 ml | 5,1 ml | 4,7 ml | 4,2 ml | 3,6 ml |
| 30% AA: 0,8 % Bis | 4 ml | 5 ml | 6 ml | 6,5 ml | 7,0 ml | 7,5 ml |
| 0,5 M Tris-HCl (pH 8,8) | 3,75 ml | 3,75 ml | 3,75 ml | 3,75 ml | 3,75 ml | 3,75 ml |
| APS 10 % (w/v) | 150 µl | 150 µl | 150 µl | 150 µl | 150 µl | 150 µl |
| Temed | 15 µl | 15 µl | 15 µl | 15 µl | 15 µl | 15 µl |

3.3.5 Western Blot

Zur Analyse gelelektrophoretisch (SDS-PAGE) getrennter Proteine wurden diese mittels *semidry*-Western-Blotting aus der Polyacrylamid-Matrix auf eine Membran aus Nitrocellulose unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes transferiert und immobilisiert. Die Apparatur bestand aus zwei Plattenelektroden, zwischen welche Filterpapiere, Gel und Membran (Nitrocellulose) horizontal eingebaut wurden. Filterpapiere und Membran wurden vorher in Western Blot-Puffer äquilibriert. Luftblasen wurden durch vorsichtiges Rollen eines Glasstabes über die einzelnen Schichten entfernt. Nach Schließung des Stromkreises wurden die Proteine für 2 h bei konstanten 70 mA/Gel (Begrenzung auf 14 V) auf die Membran transferiert. Der Blot-Vorgang wurde durch ein kurzes Anfärben der Proteine mittels Ponceau-S kontrolliert. Dafür wurden die Proteine kurz mit Ponceau-S angefärbt und anschließend überschüssiges Ponceau-S mit VE-Wasser entfernt.

3.3.6 Nachweis von Proteinen auf einer Nitrocellulosemembran

Proteine, welche zuvor mittels Western Blot auf eine Nitrocellulosemembran transferiert wurden, können mit Hilfe von Antikörpern detektiert werden. Dafür wurden zunächst alle freien Proteinbindungsstellen der Membran für 1 h mit einer 2 %igen Blockierungslösung (Roche) unter Schwenken abgesättigt. Anschließend wurde der Blot mit dem Primärantikörper (siehe Tabelle 22) über Nacht ebenfalls unter Schwenken bei 4 °C inkubiert. Überschüssiger Primärantikörper wurde durch 3maliges Waschen mit TBS Tween 0,05 % (v/v) entfernt. Nach Zugabe des Sekundärantikörpers, welcher die FC-Region des Primärantikörpers erkennt, und einer Inkubation für 3-4 h, wurde erneut wie oben beschrieben mit TBS Tween 0,05 % (v/v) gewaschen. Erfolgte die anschließende Detektion mit Dura (Caspase 3, XIAP), so wurde sechsmal gewaschen. Erfolgte die Detektion hingegen mit ECL-Gebrauchslösung (I κ B α , β -Aktin), so wurde nur dreimal gewaschen. Da an den Sekundärantikörper eine Meerrettich-Peroxidase (engl. *Horse raddish peroxidase*, HRP) gekoppelt ist, konnte die Position des Antigens über eine ECL-Reaktion (engl. *enhanced chemiluminescens reaction*) sichtbar gemacht werden. In dieser Reaktion katalysiert die Peroxidase die Oxidation des ECL-Substrates und löst somit eine Chemilumineszenz aus. Das dabei entstandene Licht kann auf einem Film mit Hilfe einer Entwicklermaschine (AGFA, CURIX 60) sichtbar gemacht werden. Markerbanden wurden durch Nachzeichnen dauerhaft sichtbar gemacht.

4. Ergebnisse

4.1 Sensitivierung von Melanomzelllinien gegenüber TRAIL durch Kostimulation mit TRAIL und Cisplatin bzw. UVB

In früheren Arbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass eine Vielzahl von Melanomzelllinien resistent gegenüber dem tumorselektiven Todesliganden TRAIL sind. Dabei ist die TRAIL-Resistenz unabhängig vom Progressionsstadium und korreliert in allen Fällen mit der Inhibition von Caspase 3 durch XIAP. Jene Melanomzelllinien konnten jedoch durch eine zusätzliche Bestrahlung mit einer subletalen Dosis UVB oder Stimulation mit Cisplatin synergistisch gegenüber dem Todesliganden TRAIL sensitiviert werden. Dabei ging die Sensitivierung mit der Depletion des anti-apoptischen Proteins XIAP und der vollständigen Prozessierung und Aktivierung der Caspase 3 einher und führte zur effektiven Induktion von Apoptose. Die Depletion von XIAP war dabei von der NF κ B-abhängigen Repression der Expression sowie von einer Caspase 3-abhängigen Prozessierung des Proteins abhängig [161,162].

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte mittels *Cell Death Detection ELISA* gezeigt werden, dass in der TRAIL-resistenten Zelllinie WM115 (*VGP*), sowie in den leicht TRAIL-sensitiven Zelllinien 451-LU (*MM*) und SBCL2 (*RGP*) durch Kostimulation mit izTRAIL (Isoleuzin-Zipper-TRAIL, im Folgenden als TRAIL bezeichnet) und UVB bzw. Cisplatin im Vergleich zu unbehandelten bzw. einzelstimulierten Zellen stark synergistisch Apoptose induziert werden konnte (> 30 %) (siehe Abbildung 12). Des Weiteren konnten Western Blot-Analysen der Melanomzelllinie 451-LU bestätigen, dass es unter kostimulatorischen Bedingungen zur Depletion von XIAP und somit zur vollständigen Spaltung von Caspase 3 in das aktive p17-Fragment kommt. Dabei korrelierte die XIAP-Depletion mit der Degradation von I κ B α und somit indikativ mit der Aktivierung von NF κ B. Bei alleiniger Stimulation mit TRAIL wurde zwar ebenfalls I κ B α degradiert und somit vermutlich NF κ B aktiviert, jedoch XIAP nicht depletiert und Caspase 3 lediglich in das inaktive 21 kDa-Fragment prozessiert. Nur geringe Mengen des katalytisch aktiven 17 kDa-Fragmentes der Caspase 3 konnten detektiert werden. Bei Stimulation mit Cisplatin oder UVB wurde I κ B α hingegen nicht degradiert und

NF κ B somit nicht aktiviert. In diesen Fällen wurde XIAP entsprechend nicht depletiert und die Proform der Caspase 3 nicht prozessiert. Nach den genannten Einzelstimulationen kam es also, lediglich zu einer leichten bzw. zu keiner Induktion von Apoptose (siehe Abbildung 13).

Zusammenfassend ließ sich also verifizieren, dass die Resistenz von Melanomzelllinien gegenüber TRAIL unabhängig vom Tumorprogressionsstadium ist und mit der Inhibition von Caspase 3 durch XIAP korreliert [161]. Die synergistische Sensitivierung der TRAIL-resistenten Zelllinien durch die Kombination von TRAIL mit Cisplatin oder UVB stellt also einen möglichen Therapieansatz für das Maligne Melanom dar.

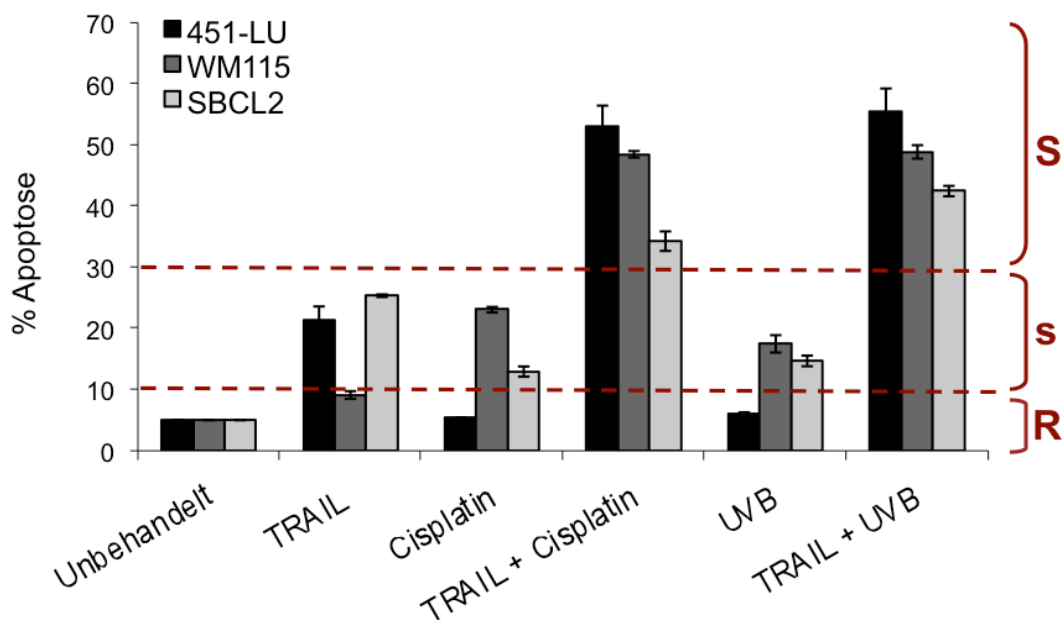


Abbildung 12: Sensitivierung TRAIL-resistenter Melanomzelllinien durch Kostimulation mit TRAIL und Cisplatin bzw. UVB. Melanomzelllinien verschiedener Progressionsstadien (WM115 (VGP), SBCL2 (RGP), 451-LU (MM)) wurden lediglich mit 50 ng/ml izTRAIL, 20 μ M Cisplatin oder 200 J/m² UVB, sowie mit TRAIL in Kombination mit Cisplatin bzw. UVB für 16 h stimuliert. Apoptose wurde mittels *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* detektiert und in Relation zu unbehandelten Zellen gesetzt. 10 % Apoptose = resistente Zellen (R), 30 % Apoptose = leicht sensitive Zellen (s), > 30 % Apoptose = hoch sensitive Zellen (S)

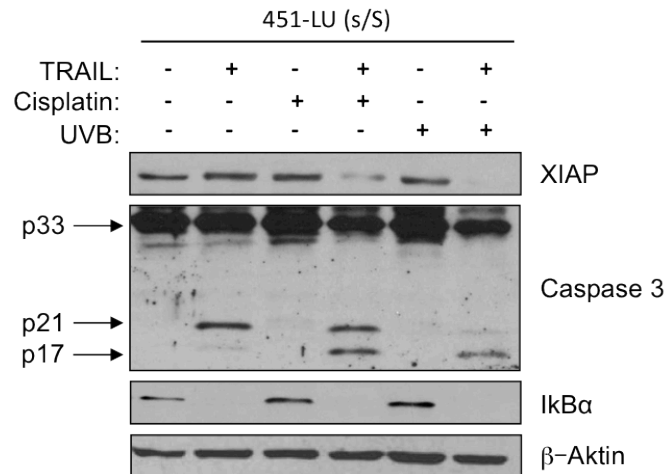


Abbildung 13: Sensitivierung von Melanomzelllinien gegenüber TRAIL korreliert mit der Depletion von XIAP, sowie der Aktivierung von Caspase 3 und indikativ mit der Aktivierung von NFκB. Die Melanomzelllinie 451-LU wurde wie in Abbildung 12 beschrieben für 16 h stimuliert und der zelluläre Proteinstatus von IκBα, XIAP und Caspase 3 mittels Western Blot-Analyse determiniert. Als Ladungskontrolle diente β-Aktin.

4.2. Herstellung von Tumorsphäroiden aus Melanomzellen

Es ist bekannt, dass die 2D-Zellkultur nur bedingt die physiologische Umgebung einer Zelle simuliert. So kann diese Form der Zellkultur z.B. nicht die dreidimensionale Struktur, sowie die Zell-Zell-Kontakte eines avaskulären Tumors mit dessen Zellheterogenität widerspiegeln. Deshalb sollte die biologische und klinische Relevanz der beschriebenen Kombinationstherapien (TRAIL + Cisplatin bzw. UVB) für das Maligne Melanom auch in einem dreidimensionalen Tumorsystem überprüft werden. Dafür wurden zunächst Tumorsphäroide der Melanomzelllinien 451-LU mittels der Methode des hängenden Tropfens hergestellt (siehe Abbildung 14). Dabei war zu beobachten, dass die Tumorsphäroide nach 12 Tagen in Kultur mit bloßem Auge zu erkennen waren und eine Größe erreichten, bei der das Vorhandensein eines nekrotischen Zentrums vermutet werden konnte. Die Tumorsphäroide zeigten Vitalität, zumindest in der Peripherie, wie mittels PI- und FDA-Färbung nachgewiesen werden konnte. Nur vereinzelt wurden hier tote, PI positive Zellen beobachtet (siehe Abbildung 14). Diese Tumorsphäroide definierter Größe wurden im Folgenden auf ihre Sensitivität bzw. Sensitivierbarkeit gegenüber TRAIL getestet.

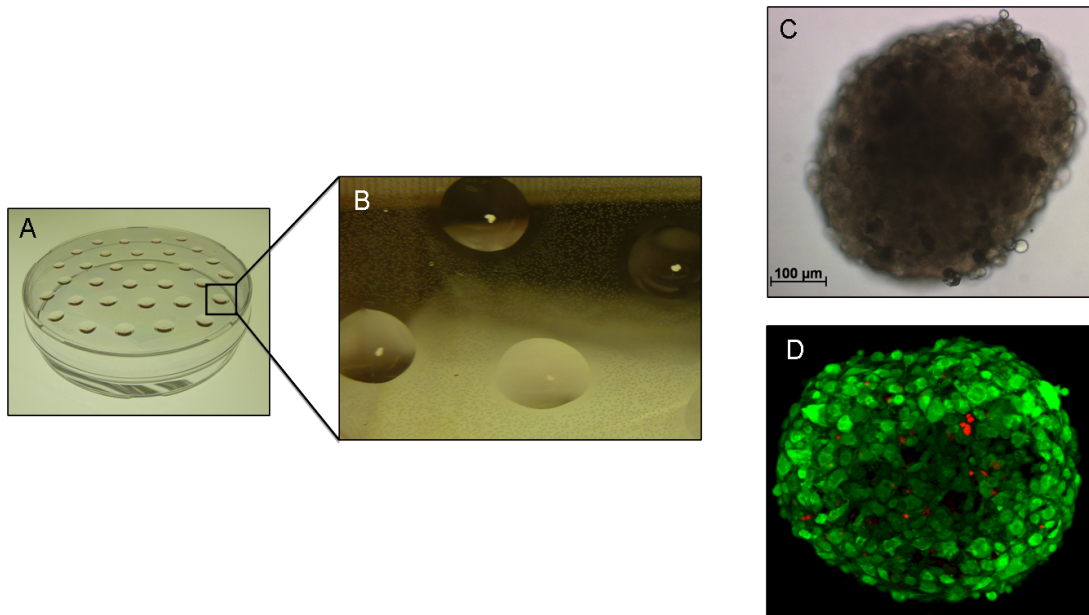


Abbildung 14: Herstellung von Tumorsphäroiden. **A)** Hängende Tropfen aus einer Zellsuspension mit 250 451-LU-Melanomzellen / 25 µl wurden im nicht adhäsiven Deckel einer Petrischale hergestellt. **B)** Nach 12 Tagen in Kultur konnten die Tumorsphäroide im Tropfen mit bloßem Auge betrachtet werden. **C)** Bestimmung der Größe der Sphäroide an Tag 12 der Kultur mittels einer lichtmikroskopischen Analyse. **D)** Überprüfung der Vitalität der äußeren Zellen mittel PI- und FDA-Färbung mit anschließender konfokalmikroskopischen Analyse. PI (tote Zellen) = rot, FDA (lebende Zellen) = grün

4.3 Sensitivierung von Tumorsphäroiden gegenüber TRAIL

Zur Überprüfung der Sensitivierung wurden die Tumorsphäroide *in vitro* lediglich mit TRAIL, UVB und Cisplatin oder mit einer Kombination aus TRAIL und UVB bzw. Cisplatin behandelt und anschließend auf sterbende Melanomzellen im Überstand und an der Peripherie der Tumorsphäroide untersucht. Auch hier wurden, wie für die 2D-Zellkultur, subletale Dosen Cisplatin und UVB gewählt. Eine Auslösung apoptotischer bzw. nicht vitaler Melanomzellen aus dem soliden Sphäroid wurde im umgebenden Medium lichtmikroskopisch beobachtet.

Im Vergleich zu den jeweiligen Einzelstimulationen führte lediglich die Kombination von TRAIL mit UVB oder Cisplatin zu einer deutlichen Zunahme von toten Zellen im Medium. Dabei war zu beobachten, dass die Kostimulation mit Cisplatin effektiver war als die mit UVB (siehe Abbildung 15). Einzelstimulierte Tumorsphäroide blieben hingegen nahezu resistent bzw. zeigten keine Auslösung von Zellen aus dem Sphäroidverband.

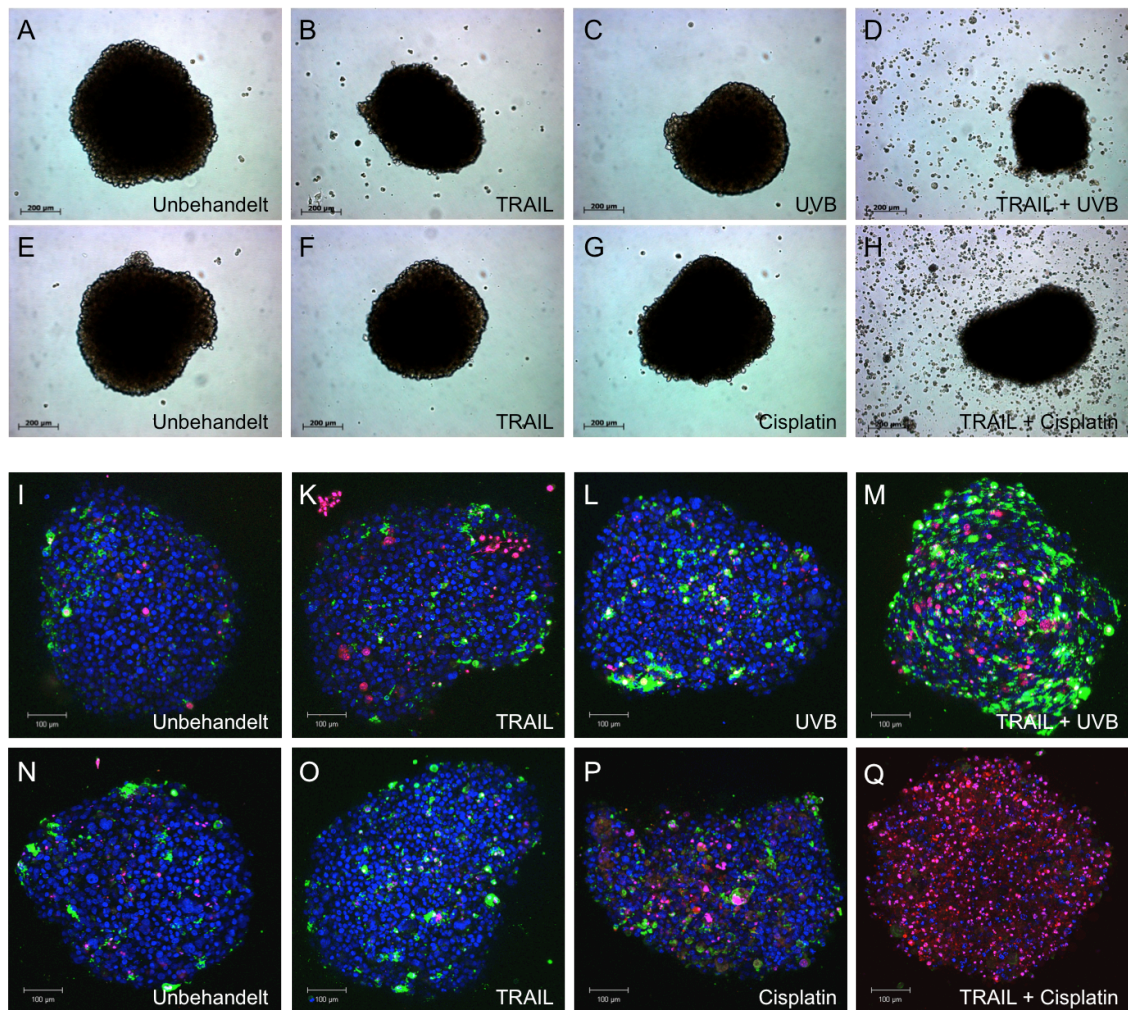


Abbildung 15: Stimulation von Tumorsphäroiden mit TRAIL in Kombination mit UVB oder Cisplatin führt zum erhöhten Sterben von Melanomzellen. 451-LU-Tumorsphäroide blieben unbehandelt (A,E,I,N) oder wurden mit 100 ng/ml izTRAIL (B,F,K,O), 200 J/m² UVB (C,L), 20 µM Cisplatin (G,P) und mit einer Kombination aus TRAIL und UVB (D,M) bzw. Cisplatin (H,Q) für 20 h stimuliert. Die Analyse der Tumorsphäroide erfolgte mittels Licht- (Zeiss, Axiovert 200M) (A-H) oder Konfokalmikroskop (Zeiss, LSM 710) (I-Q). Für die Färbung wurden die Tumorsphäroide mit 3 µg/ml Hoechst für 30 min, 0,375 µg/ml Annexin V-FITC für 15 min und 0,6 µg/ml PI für 5 min gefärbt. Maßstabsbalken (A-H) = 200 µm, (I-Q) = 100 µm

Um zu untersuchen, ob es sich bei dem Zellsterben der Tumorsphäroide um apoptotischen oder nekrotischen Zelltod handelt, wurden die Tumorsphäroide mit Annexin V-FITC und PI gefärbt, die Kerne mit Hoechst 33342 sichtbar gemacht und mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Dabei konnte erneut gezeigt werden, dass insgesamt ein erhöhtes Sterben von Melanomzellen nach der Behandlung mit TRAIL in Kombination mit UVB bzw. Cisplatin vorlag. Hingegen blieben die Tumorsphäroide nach den jeweiligen Einzelstimulationen resistent (siehe Abbildung 15). Während die Sphäroide nach Stimulation mit TRAIL und

UVB vorwiegend Annexin V-gefärbte Zellen in der Peripherie aufwiesen, was auf apoptotischen Zelltod hinweist, wurden bei der Kostimulation mit TRAIL und Cisplatin hauptsächlich PI-positive, also nekrotische, Zellen dokumentiert. Dies deutet entweder auf unterschiedliche molekulare Mechanismen hin, oder es handelt sich bei der TRAIL-Cisplatin Kombination bereits um sekundär eintretende Nekrose, als Zeichen intensiverer Wirkungsweise. Insgesamt konnte also gezeigt werden, dass sich Melanomzellen nicht nur in der 2D-Zellkultur, sondern auch in einem dreidimensionalen Sphäroidverband sensitivieren lassen.

4.4 Die Sensitivierung von Tumorsphäroiden gegenüber TRAIL korreliert mit NF κ B-Aktivierung, XIAP-Depletion und vollständiger Caspase 3-Prozessierung

Analog zur 2D-Zellkultur konnte auch für Tumorsphäroide nachgewiesen werden, dass die Sensitivierung gegenüber TRAIL mit der Degradation von I κ B α und somit vermutlich mit der Aktivierung von NF κ B, der Depletion von XIAP und der Aktivierung von Caspase 3 einhergeht. Dafür wurden 451-LU-Tumorsphäroide erneut mit TRAIL, UVB und Cisplatin oder mit einer Kombination aus TRAIL und UVB bzw. Cisplatin behandelt und im Anschluss der Proteinstatus von I κ B α , XIAP und Caspase 3 analysiert.

Dabei ergab die Western Blot-Analyse, dass eine alleinige Stimulation mit TRAIL zwar zu einer erhöhten Degradation von I κ B α und somit vermutlich zu der Aktivierung von NF κ B führte, XIAP jedoch nicht depletiert und Caspase 3 entsprechend primär nur in das inaktive 21 kDa-Fragment gespalten wurde. Auch unter dem Einfluss von Cisplatin und UVB kam es zu keiner Depletion von XIAP und vollständigen Prozessierung und Aktivierung der Caspase 3. Unter den genannten Umständen blieben behandelte Tumorsphäroide also resistent und Apoptose wurde nicht induziert. Bei der Kombination von TRAIL mit UVB oder Cisplatin kam es hingegen in Abhängigkeit der Aktivierung von NF κ B zur Depletion von XIAP und somit zur vollständigen Spaltung von Caspase 3 in das aktive p17-Fragment und somit zur Induktion von Apoptose (siehe Abbildung 16). Dabei wurde ersichtlich, dass es unter dem Einfluss von Cisplatin zu einer sehr viel stärkeren Prozessierung der Caspase 3 kam, was darauf hinweist, dass die

Kombination mit Cisplatin zu einer intensiveren Sensitivierung von Sphäroiden gegenüber TRAIL führt und es sich bei den PI gefärbten Zellen im Sphäroid (siehe Abbildung 15) tatsächlich um sekundär nekrotische Zellen und nicht um einen unterschiedlichen molekularen Mechanismus zu handeln scheint.

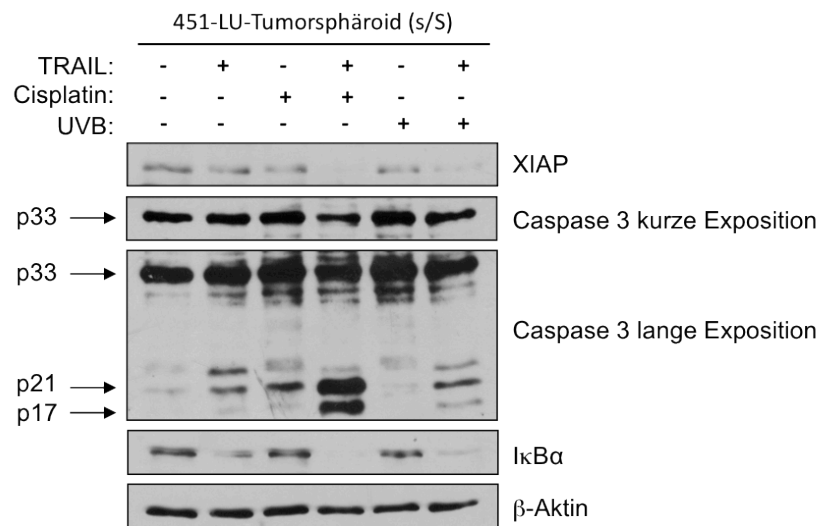


Abbildung 16: Die Sensitivierung von Tumorsphäroiden gegenüber TRAIL korreliert mit NFκB-Aktivierung, XIAP-Depletion, sowie Caspase 3-Aktivierung. 451-LU-Tumorsphäroide blieben unbehandelt oder wurden mit 100 ng/ml izTRAIL, 200 J/m² UVB, 20 μM Cisplatin und mit einer Kombination aus TRAIL und UVB bzw. Cisplatin für 20 h stimuliert. Der Proteinstatus von IκBα, XIAP und Caspase 3 wurde mittels Western Blot determiniert. Als Ladungskontrolle diente β-Aktin.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass Tumorsphäroide gegenüber TRAIL sensitiviert werden können, indem sie mit TRAIL und Cisplatin bzw. UVB kostimuliert werden. Dies wird unter anderem durch ein erhöhtes Antreffen von toten Zellen im Überstand und durch das Färben von apoptotischen bzw. sekundär nekrotischen Zellen an der Peripherie der Tumorsphäroide ersichtlich. Die Sensitivierung korreliert dabei, analog zur 2D-Zellkultur, mit der Depletion von XIAP und der daraus resultierenden vollständigen Aktivierung der Caspase 3. Insgesamt konnten also die Ergebnisse der 2D- auf die 3D-Zellkultur übertragen werden, wobei sich Tumorsphäroide als sehr gutes dreidimensionales Testsystem herausstellten. Für potentielle *in vivo* Applikationen der TRAIL-Cisplatin bzw. TRAIL-UVB Behandlung des Malignen Melanoms muss allerdings auch die Tumorselektivität dieser gewährleistet sein.

4.5 Die Sensitivierung von Melanomzelllinien gegenüber TRAIL mit subletalen Dosen UVB oder Cisplatin ist tumorselektiv

Trotz eindeutiger Übertragbarkeit der 2D-Therapieergebnisse auf 3D-Tumorsphäroide, bleibt die Frage offen, inwieweit das umliegende Wirtsgewebe *in vivo* den Therapieerfolg zusätzlich beeinflussen oder gar beeinträchtigen könnte. Sowohl primäre Melanome als auch primäre Melanommetastasen befinden sich hauptsächlich im epidermalen / dermalen Bereich humaner Haut. Um also die potentielle *in vivo* Relevanz der TRAIL-UVB und TRAIL-Cisplatin Behandlung für die kutane Form des Malignen Melanoms zu überprüfen, sollten funktionelle organotypische Vollhautmodelle mit integrierten Melanomzellen hergestellt und diese behandelt werden. Als essentielle Voraussetzung musste jedoch sicher gestellt werden, dass die Behandlung mit TRAIL in Kombination mit Cisplatin oder UVB in der applizierten Dosis tumorselektiv ist, das heißt primäre Hautzellen wie Melanozyten, Keratinozyten und Fibroblasten sollten resistent bleiben (siehe Abbildung 17).

In der Tat konnte mit dem Nachweis von Apoptose (*Cell Death Detection ELISA*) erfolgreich belegt werden, dass primäre Zellen gegenüber den Stimuli TRAIL, Cisplatin und UVB resistent blieben. Auch unter kostimulatorischen Bedingungen blieben primäre Hautzellen weitgehend resistent (< 10 % Apoptose). Lediglich primäre Keratinozyten reagierten leicht sensitiv auf die Kostimulation von TRAIL mit UVB oder Cisplatin. Im Gegensatz dazu reagierte die Melanomzelllinie 451-LU wie erwartet bereits leicht sensitiv auf TRAIL (10-30 % Apoptose). Nach Stimulation mit TRAIL und subletalen Cisplatin bzw. UVB Dosen konnte die apoptotische Antwort typischerweise synergistisch erhöht werden (> 30 % Apoptose). Die ermittelte Tumorselektivität bietet somit beste Voraussetzungen für die Etablierung eines *in vivo* relevanten Tumormodells in rekonstruierter Vollhaut.

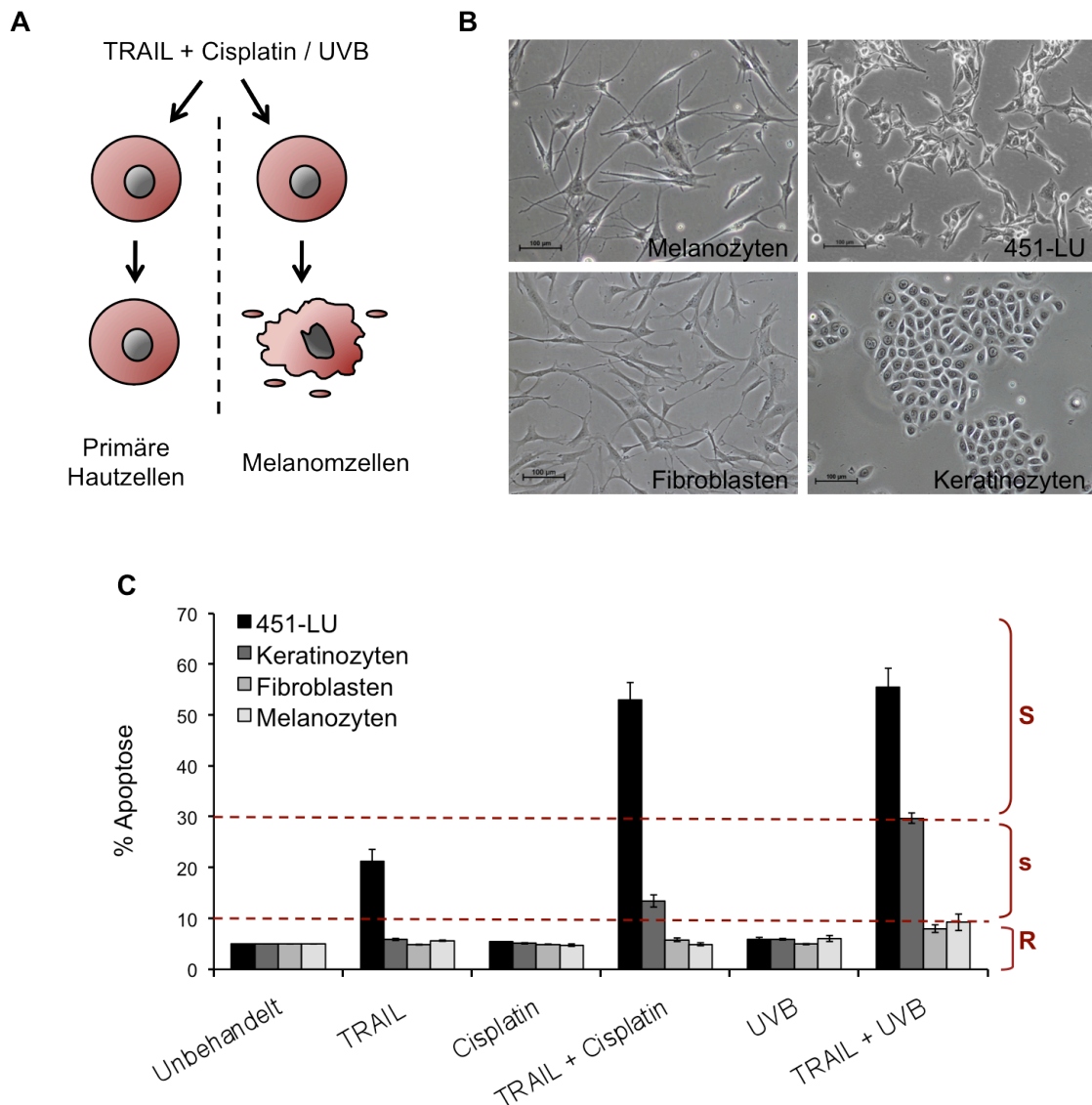


Abbildung 17: Die Behandlung von Melanomzellen mit TRAIL in Kombination mit UVB oder Cisplatin ist tumorselektiv **A) Schema zur Tumorselektivität** von TRAIL in Kombination mit Cisplatin bzw. UVB **B) Bewertung von primären Hautzellen mittels Lichtmikroskop.** Primäre Keratinozyten und Fibroblasten wurden aus juveniler Vorhaut und primäre Melanozyten aus adulter Haut isoliert. Zusammen mit der Melanomzelllinie 451-LU wurden die Zellen mittels Lichtmikroskopie bewertet. Maßstabsbalken = 100 µm. **C) Nachweis von Apoptose.** Die Melanomzelllinie 451-LU und primäre Hautzellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80 % lediglich mit 50 ng/ml TRAIL, 20 µM Cisplatin, 200 J/m² UVB oder mit einer Kombination aus TRAIL und UVB bzw. Cisplatin stimuliert. Nach 16 h wurden die Zellen geerntet und Apoptose mittels des *Cell Death Detection ELISA^{PLUS}* analysiert. Die Sensitivität der Zellen wurde dabei durch den Anstieg der Apoptose im Vergleich zu unbehandelten Zellen bestimmt. < 10 % Apoptose = resistente Zellen (R), 10-30 % Apoptose = leicht sensitive Zellen (s), > 30 % Apoptose = hoch sensitive Zellen (S)

4.6 Aufbau eines funktionalen Vollhautmodells

Für die Herstellung eines Vollhautmodells wurden im ersten Schritt, den Aufbau der Dermis, primäre Fibroblasten in eine Kollagen I Matrix eingebracht. Im Anschluss wurden frisch isolierte primäre Keratinozyten auf den dermalen Anteil ausgesät und zunächst submers kultiviert. An Tag 7 erfolgte die Umstellung auf die sogenannte *air-liquid*-Kultivierung, in welcher die Keratinozyten differenzieren und die verschiedenen Schichten der Epidermis bilden.

Wie in Abbildung 18 zu erkennen, simulierte dabei das hier hergestellte Vollhautmodell in hohem Maße die dermalen und epidermalen Strukturen der nativen Haut. Insbesondere die Epidermis zeigte wie *in vivo* eine vollständige Differenzierung in die unterschiedlichen Schichten: *Stratum basale*, *spinosum*, *granulosum* und *corneum* (siehe Abbildung 18). Diese Differenzierung konnte durch die Detektion der Differenzierungsmarker Zytokeratin 14 und 10, Involucrin und Filaggrin verdeutlicht und bestätigt werden (siehe Abbildung 19). Dabei färbte, ähnlich zur nativen Haut, Zytokeratin 14 verstärkt die Basalzellen, Zytokeratin 10 und Involucrin suprabasale Schichten, sowie Filaggrin am Ende der Differenzierung stehende Keratinozyten. Zusätzlich konnte durch die Detektion von Laminin 5 das Vorhandensein einer Basalmembran nachgewiesen werden. Dies unterstreicht die Funktionalität hergestellter Hautmodelle, da eine funktionelle Basalmembran nur durch ein abgestimmtes Zusammenspiel von Fibroblasten und Keratinozyten gebildet wird.

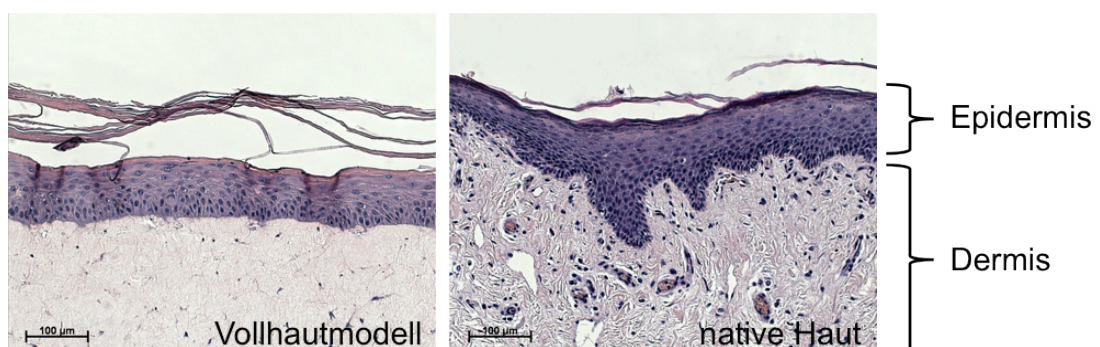


Abbildung 18: Aufbau eines Vollhautmodells, dass strukturell und funktionell sehr stark nativer Haut gleicht. 50,000 primäre Fibroblasten wurden in eine Matrix aus Kollagen I eingebracht und 100,000 primäre Keratinozyten auf dieser ausgesät. Nach einer Woche der submers-Kultivierung wurde das Hautmodell auf die *air-liquid*-Kultivierung umgestellt. Nach 12-17 Tagen erfolgten die Fixierung und die HE-Färbung des Vollhautmodells. Links = Vollhautmodell, rechts = native Haut.

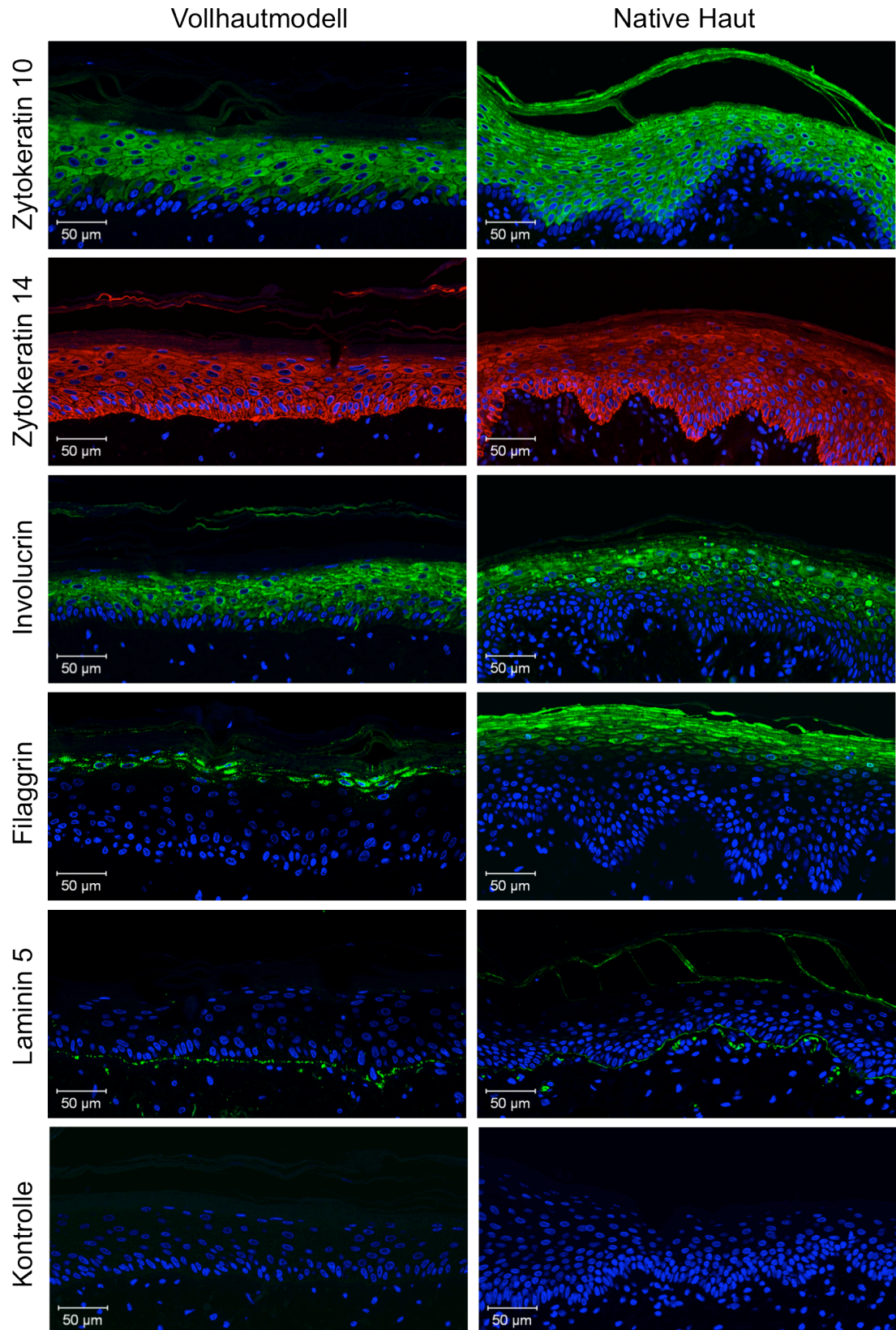


Abbildung 19: Vollhautmodelle zeigen eine vollständig differenzierte Epidermis und eine funktionelle Basalmembran wird ausgebildet. Vollhautmodelle (linke Spalte) und native Haut (rechte Spalte) wurden mit den Differenzierungsmarkern Zytokeratin 10 / 14, Involucrin und Filaggrin, sowie mit dem Marker der Basalmembran Laminin 5 immunhistologisch gefärbt und anschließend mittels Konfokalmikroskopie analysiert.

4.7 Die erfolgreiche Integration von Melanomzelllinien ins Vollhautmodell ist Abhängig von der Zelllinie und korreliert mit dem Tumorprogressionsstadium

Als nächstes galt es effizient Melanomzellen in die Vollhautmodelle zu integrieren, um so die therapeutische Leistung der Kombinationsbehandlungen im Kampf gegen das Maligne Melanom überprüfen zu können. Dazu wurden die Melanomzelllinien WM115 (*VGP*), SBCL2 (*RGP*) und 451-LU (*MM*) ins Vollhautmodell integriert.

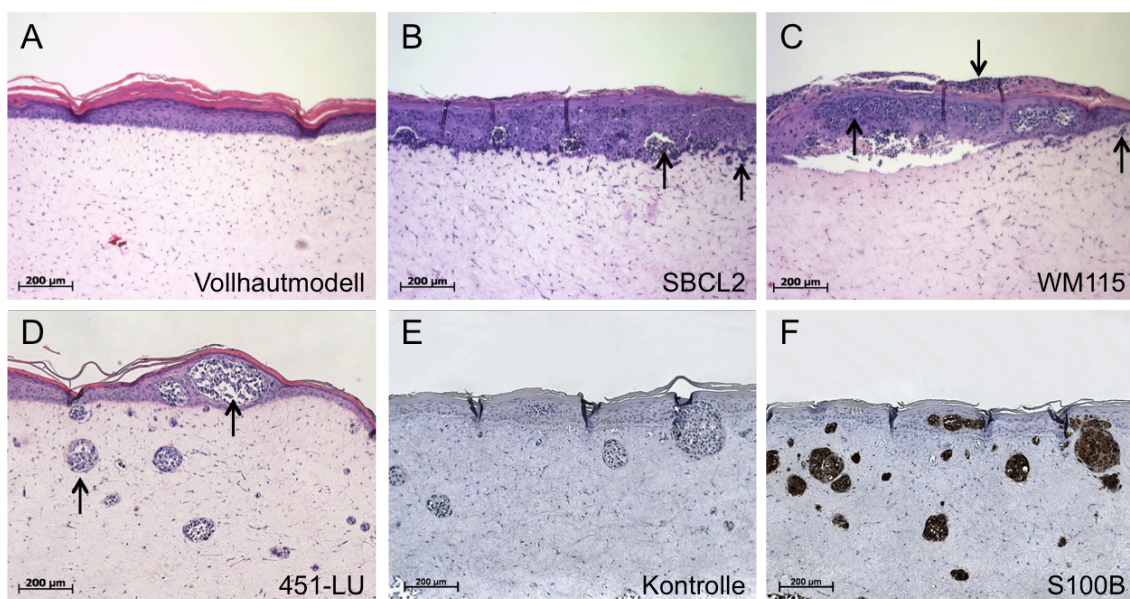


Abbildung 20: Integration von Melanomzelllinien verschiedener Progressionsstadien ins organotypische Vollhautmodell. A-D) HE-Färbungen A) Vollhautmodell ohne Melanomzellen B) Integration der Melanomzelllinie SBCL2 (*RGP*). C) Integration der Melanomzelllinie WM115 (*VGP*). D) Integration der Melanomzelllinie 451-LU (*MM*). **E-F) Immunhistologischer Nachweis von Melanomnestern.** Hautmodelle mit integrierten 451-LU-Zellen wurden immunhistologisch mit dem melanomspezifischen Antikörper S100B gefärbt. (F). Als Negativkontrolle diente die alleinige Inkubation mit Sekundärantikörper (E). Maßstabsbalken = 200 µm, Pfeil = Melanomzellen

Abbildung 20 zeigt deutlich, dass das Wachstumsverhalten eindeutig mit dem jeweiligen Progressionsstadium der Zelllinie korrelierte. Die aus der radialen Wachstumsphase stammenden SBCL2-Zellen breiteten sich radial in der Epidermis aus und bildeten epidermale Nester. Sie invadierten nur geringfügig in die Dermis. Die aus der vertikalen Wachstumsphase stammenden WM115-Zellen wuchsen zwar in und oberhalb der Epidermis, infiltrierten jedoch wenig die Dermis,

wie es eigentlich erwartet wurde. Die hochaggressive und metastatische Zelllinie 451-LU bildete hingegen deutlich sichtbare Melanomnester vereinzelt in der Epidermis und vermehrt tief in der Dermis, was durch melanomspezifische immunhistologische Färbungen mit einem Antikörper gegen S100B spezifiziert werden konnte.

4.8 Die Behandlung mit TRAIL in Kombination mit Cisplatin oder UVB führt zur Reduktion der Melanomnestgröße im Vollhautmodell

Da beim metastatischen Stadium des Malignen Melanoms die Aussichten auf einen möglichen Therapieerfolg sehr gering sind und es in den meisten Fällen zum Tode der Patienten kommt, wurde sich auf Grund der hohen klinischen Relevanz auf die Integration und Behandlung der metastatischen Zelllinie 451-LU konzentriert.

Zur Behandlung der Tumornester mit TRAIL in Kombination mit UVB oder Cisplatin wurden die Hautmodelle sowohl kurz- als auch langzeit-stimuliert. Dies bedeutet, dass die Hautmodelle entsprechend von Tag 10-14 (Kurzzeit) oder von Tag 7-17 (Langzeit) der *air-liquid*-Kultivierung mit den jeweiligen Stimuli behandelt wurden, wobei alle 2-3 Tage mit dem Mediumwechsel frisch stimuliert wurde. TRAIL und Cisplatin wurden dem Medium zugeführt. Es wurde sich auf genannte Stimulationszeiträume festgelegt, da Hautmodelle in ihrer Gesamtlebensdauer auf wenige Wochen begrenzt sind. Nach Abschluss der Versuchsreihe konnte sowohl unter der Behandlung mit TRAIL und Cisplatin als auch mit UVB eine deutliche Reduktion der Größe der Tumornester in fixierten Hautmodellen dokumentiert werden (Abbildung 21). Dieser Effekt konnte sowohl in Langzeitstimulationen mit einer niedrigen Dosis Cisplatin (2,5 μm Cisplatin) bzw. UVB (200 J/m^2) als auch in Kurzzeitstimulationen mit einer hohen Dosis Cisplatin (20 μm Cisplatin) bzw. UVB (400 J/m^2) bewirkt werden. Vergleicht man die Ergebnisse der Langzeit- und Kurzzeitstimulation, so ist zu erkennen, dass sich dabei Zeit- bzw. Dosisabhängig unterschiede in der Sensitivierung der TRAIL-resistenten Melanomzellen ergaben. So war in der Kurzzeitstimulation der Wirkungsgrad von TRAIL-Cisplatin höher als der von TRAIL-UVB. Dieser Effekt glich sich jedoch in der Langzeitstimulation aus.

Dieses Ergebnis konnte unabgänglich von der Herkunft der Primärzellen (verschiedene Donoren) zur Generierung des Hautmodells mehrfach verifiziert und statistisch ausgewertet werden (siehe Abbildung 22). Dazu wurden mit der Software ImageJ jeweils die 10 größten im Hautmodell vorhandenen Nester vermessen und die durchschnittliche Größe ermittelt. Insgesamt scheint die erfolgreiche Behandlung der Melanomnester tumorselektiv zu sein. So blieb die typische Struktur der Dermis und Epidermis auch unter kostimulatorischen Bedingungen erhalten.

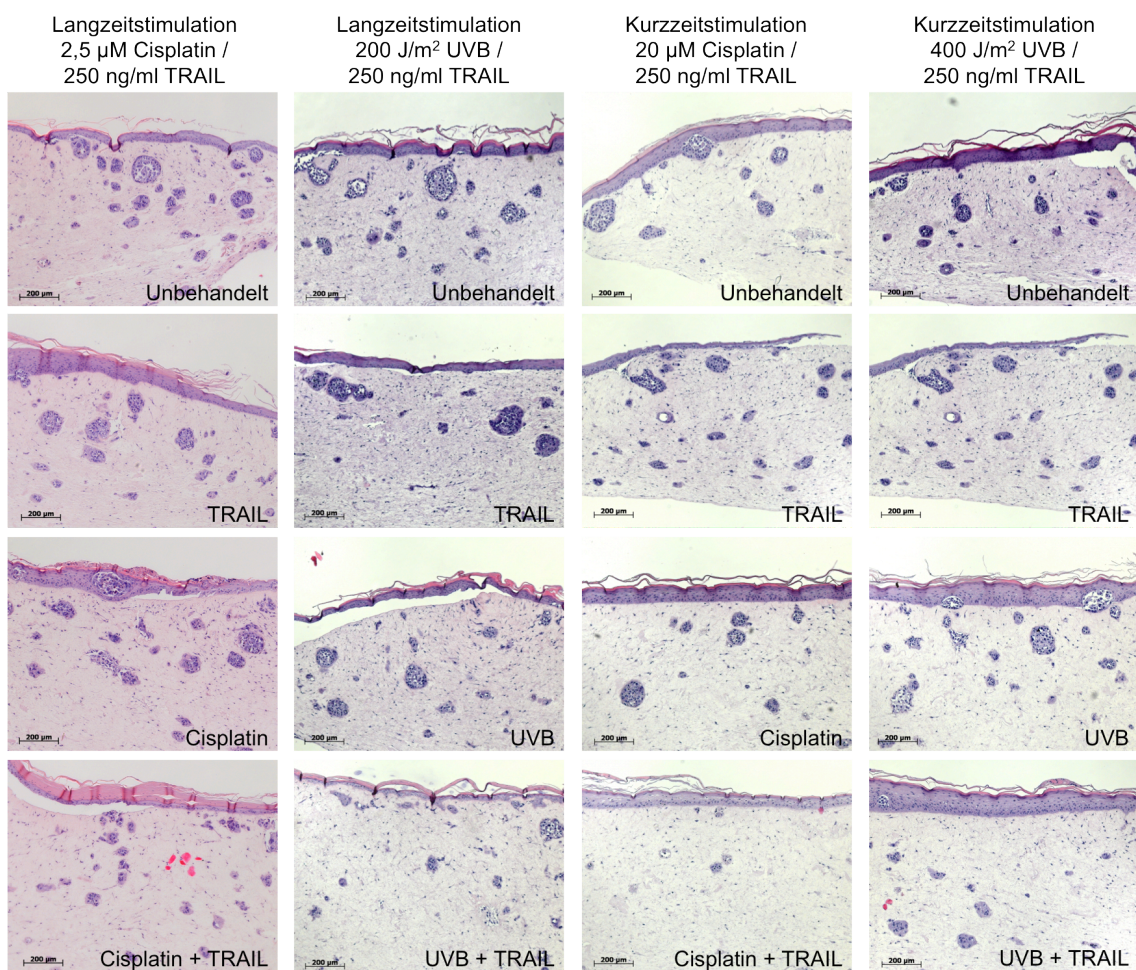


Abbildung 21: Reduktion der Größe von Melanomnestern durch eine kostimulatorische Behandlung mit TRAIL und Cisplatin bzw. UVB. Hautmodelle mit integrierten 451-LU-Tumornestern wurden in der Kurzzeitstimulation von Tag 10-14 der *air-liquid*-Kultivierung mit 250 ng/ml izTRAIL, 20 μM Cisplatin, 400 J/m^2 UVB oder mit einer Kombination aus TRAIL und UVB oder Cisplatin behandelt. In der Langzeitstimulation erfolgte die Behandlung von Tag 7-17 der *air-liquid*-Kultivierung mit 250 ng/ml izTRAIL 2,5 μM Cisplatin, 200 J/m^2 UVB oder mit einer Kombination aus TRAIL und UVB bzw. Cisplatin. IzTRAIL und Cisplatin wurden dem Medium zugefügt. Von den fixierten und in Paraffin eingebetteten Hautmodellen wurden zur Analyse 3 μm dicke Schnitte und HE-Färbungen angefertigt. Maßstab = 200 μm

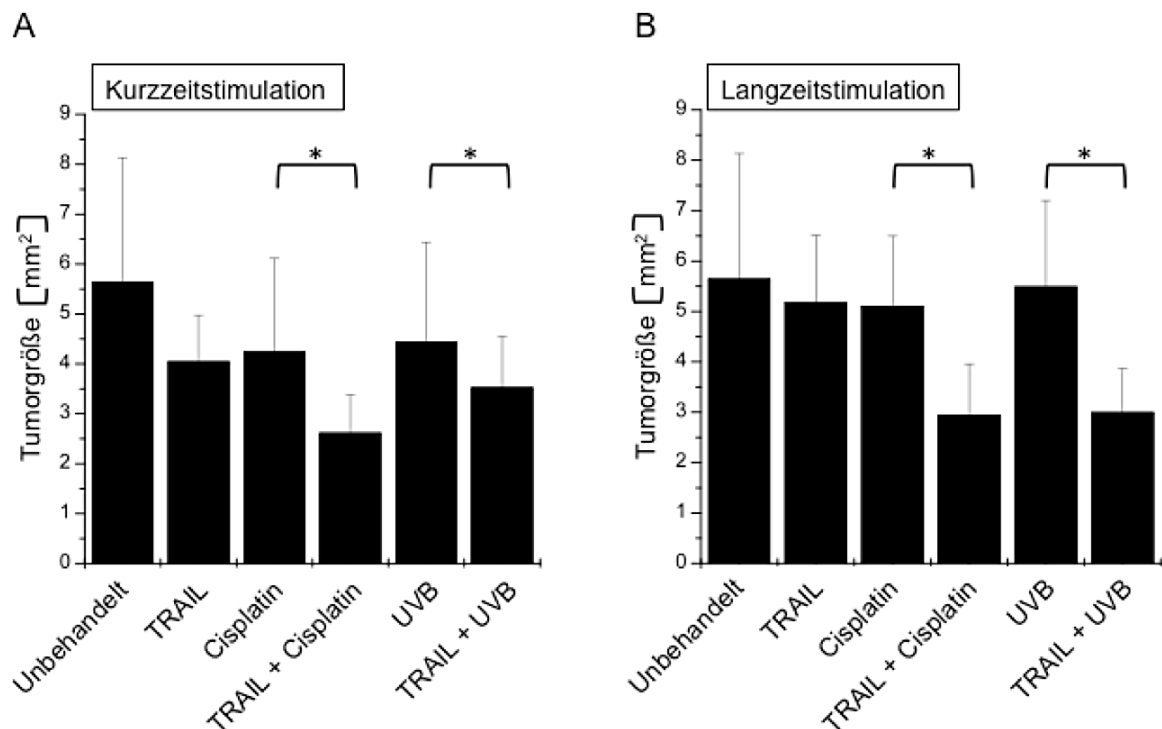


Abbildung 22: Statistische Auswertung der Tumornestgröße im Hautmodell. Behandelte und unbehandelte Hautmodelle 5 verschiedener Donoren mit integrierten Tumornestern wurden zur Analyse herangezogen. Die Fläche [mm²] der Tumornester wurde mittels der Software ImageJ bestimmt und statistisch ausgewertet. * < p 0,01 (Student-T-Test). A) Kurzzzeitstimulation B) Langzeitstimulation.

4.9 Die Dezimierung von Melanomnestern im Vollhautmodell erfolgt durch Induktion von Apoptose

Histologisch kann man die Induktion von Apoptose am besten durch die sogenannte TUNEL-Färbung darstellen. Hierbei werden die für die Induktion von Apoptose kennzeichnenden DNA-Fragmente durch ein fluoreszenzgekoppeltes Nukleotid sichtbar gemacht. Tatsächlich konnte entsprechend der *in vitro* 2D- und 3D-Vorversuche auch in Tumornestern der Hautmodelle bewiesen werden, dass es unter der Kombinationstherapie bestehend aus TRAIL und Cisplatin bzw. UVB zur selektiven Induktion von Apoptose kommt (siehe Abbildung 23).

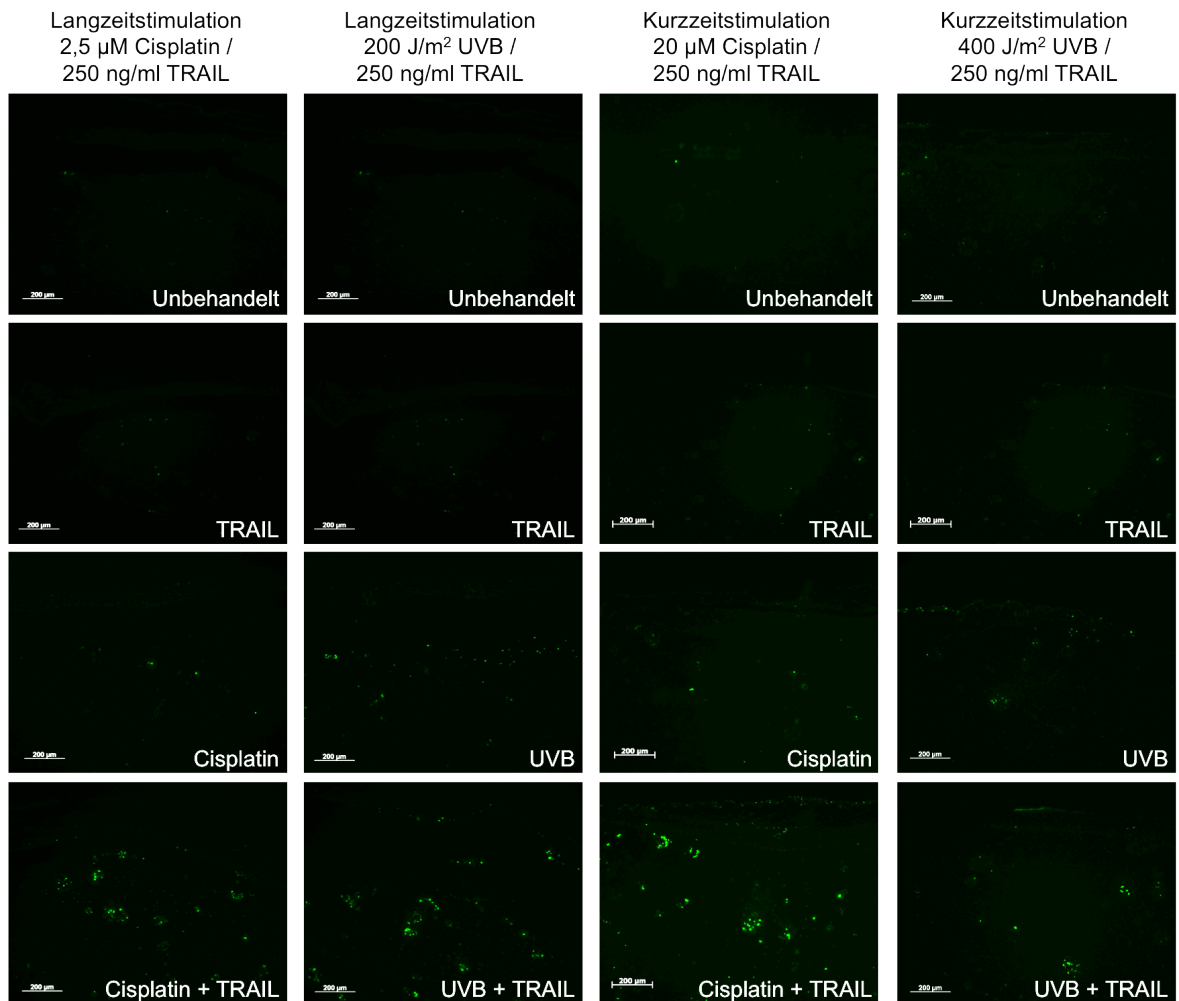


Abbildung 23: Behandlung von Melanomnestern im Hautmodell mit TRAIL in Kombination mit Cisplatin oder UVB führt zur selektiven Induktion von Apoptose. In unbehandelten und differenziell behandelten Hautmodellen mit integrierten Tumornestern wurde Apoptose mittels TUNEL-Färbung (*In Situ Cell Death Detection Kit, POD*) nachgewiesen. Die Detektion erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop. Maßstab = 200 μ m

Ein weiteres Charakteristikum der physiologischen Apoptoseinduktion ist die Spaltung der Effektorcaspase 3, die in der Sensitivierung der Melanomzelllinien gegenüber TRAIL eine entscheidende Rolle spielt. Mit einem spezifisch gegen aktive Caspase 3 gerichteten Antikörper konnte exemplarisch in behandelten Hautmodellen die Aktivität von Caspase 3 selektiv in Melanomnestern nachgewiesen werden. Epidermale Keratinozyten und dermale Fibroblasten zeigten dabei nur eine leichte Hintergrundfärbung, was erneut die Tumorselektivität der Behandlung unterstrich (siehe Abbildung 24).

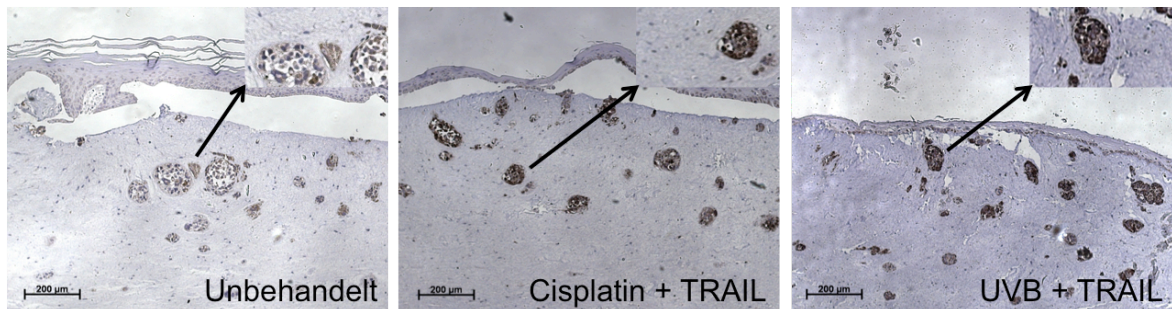


Abbildung 24: Selektiver Nachweis von Apoptose in Melanomnestern nach Behandlung mit TRAIL in Kombination mit Cisplatin oder UVB. In Hautmodellen mit integrierten Tumornestern wurde nach kombinatorischer Behandlung mit TRAIL und Cisplatin bzw. TRAIL und UVB mittels Caspase 3-Färbung eine erhöhte Induktion von Apoptose nachgewiesen. Maßstabsbalken = 200 µm

Zusammenfassend lassen sich also Hautmodelle herstellen, welche die epidermalen und dermalen Strukturen nativer Haut strukturell und funktionell in hohem Maße simulieren. In diese Hautmodelle können Melanomzelllinien unterschiedlicher Progressionsstadien integriert werden. Hautmodelle mit integrierten 451-LU-Tumornestern simulieren dabei das schwer therapierbare metastatische Stadium des Malignen Melanoms. Diese Tumornester lassen sich jedoch durch eine Kombinationstherapie aus TRAIL und Cisplatin bzw. UVB behandeln, ohne dass die Struktur der Haut und die enthaltenen Zellen Schaden nehmen. Dies zeigt sich in der melanomspezifischen Reduktion der Tumornestgröße, sowie in der selektiv erhöhten Induktion von Apoptose. Somit hat die mögliche Therapie des Malignen Melanoms mit TRAIL in Kombination mit UVB oder Cisplatin nicht nur eine *in vitro* sondern auch eine potentielle *in vivo* Relevanz.

4.10 Integration von Tumorsphäroiden ins Vollhautmodell simuliert die *in vivo* Situation eines soliden Tumors – Etablierung eines neuartigen Tumor-Testsystems

In der Tumorbiologie nehmen dreidimensionale *in vitro* Testsysteme einen immer höheren Stellenwert ein, auch weil man mit ihnen ethisch problematische Tierversuche reduzieren kann. Zur effektiven präklinischen Selektion und Testung möglicher Therapiemodalitäten auf ihre Wirksamkeit sollten diese *in vitro* Testsysteme so weit wie möglich die *in vivo* Situation eines Tumors simulieren. Bei dem Malignen Melanom nehmen dabei insbesondere bereits manifestierte, solide

und nicht behandelbare Formen des Tumors einen hohen klinischen Stellenwert ein. Um jene Form des Malignen Melanoms in einem Hautmodell zu simulieren, sollte nicht nur die dreidimensionale Struktur, sondern auch z.B. das Vorhandensein verschiedener tumoraler Zellsubpopulationen, sowie der Kontakt und die Kommunikation zur extrazellulären Matrix und ihren Bestandteilen gegeben sein. Mit der Simulation eines soliden Tumors sollte die Möglichkeit bestehen nicht nur das Auswachsen, sondern auch die Reduktion des Tumors durch eine Behandlung zu testen. Um jene Voraussetzungen zu erfüllen, wurde in dieser Arbeit ein neues Tumor-Testsystem entwickelt. In diesem wurden erstmals Tumorsphäroide ins Vollhautmodell integriert, wodurch die *in vivo* ähnlichen Eigenschaften von Tumorsphäroiden mit denen von organotypischen Vollhautmodellen vereint werden konnten.

Trotz des Einbaus großer Tumorsphäroide blieb die Struktur der Hautmodelle mit der Dermis und der differenzierten Epidermis erhalten. Färbungen mit Hämatoxylin-Eosin zeigten, dass die Tumorsphäroide aus einer inneren und einer äußeren Zellsubpopulation bestanden. Bei näherer Betrachtung der Subpopulationen war zu erkennen, dass die Zellen des Zentrums durch kondensierte Zellkerne gekennzeichnet waren. Dies ließ vermuten, dass es sich bei dieser Zellpopulation um das in Tumorsphäroiden und nativen avaskulären Tumoren anzutreffende und oben beschriebene, apoptotische / nekrotische Zentrum handelte. Die Zellen, die sich an der Peripherie der Tumorsphäroide befanden wiesen hingegen große Zellkerne auf, was auf eine vitale Zellpopulation mit besserem Zugang zu Nährstoffen hindeutete. Diese Vermutungen konnten sehr gut durch immunhistologische Färbungen mit einem Antikörper gegen Ki 67 und TUNEL bestätigt werden. Dabei färbt Ki 67 proliferierende und TUNEL apoptotische Zellen (siehe Abbildung 25). Sowohl die Existenz apoptotischer und nekrotischer Zellen im Zentrum als auch lebender Zellen am Rande von hergestellten Tumorsphäroiden konnte durch elektronenmikroskopische Aufnahmen bestätigt werden. Dabei waren deutlich lebende Zellen mit großem Zellkern, apoptotische Zellen mit kondensierter DNA und völlig zerstörte, nekrotische Zellen zu erkennen (siehe Abbildung 26).

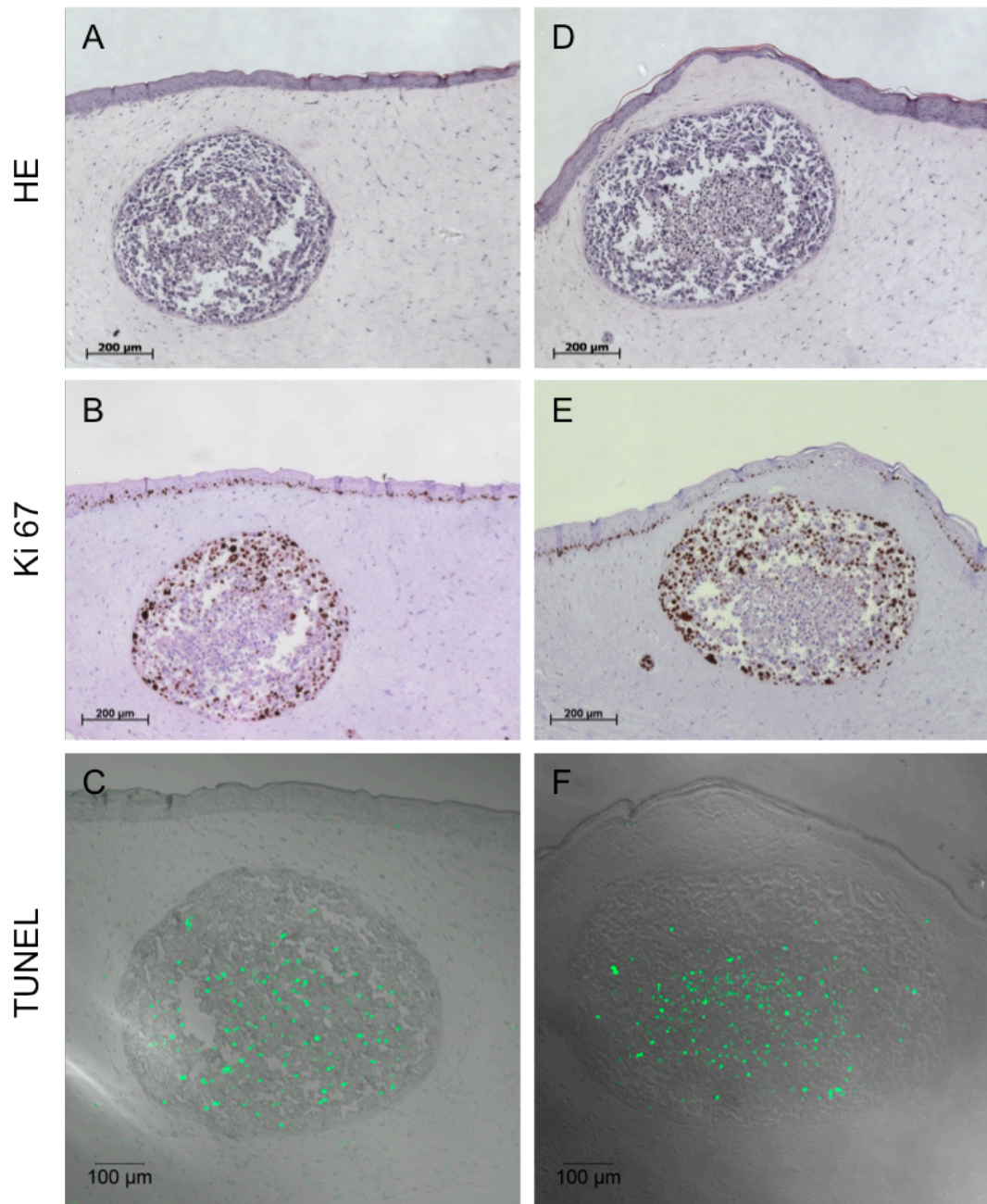


Abbildung 25: Ins Vollhautmodell integrierte Tumorsphäroide simulieren die *in vivo* Situation eines soliden Tumors. Nachweis einer vitalen, proliferierenden und einer apoptotischen Zellsubpopulation. Tumorsphäroide wurden in den dermalen Anteil des Vollhautmodells integriert. Als Beispiele sind FFPE-Dünnschnitte von zwei unterschiedlichen Tumorsphäroiden im Vollhautmodell gezeigt (A-C und D-F). **A,D**) Hämatoxylin-Eosin-Färbung. **B,E**) Immunhistologischer Nachweis von proliferierenden Zellen mittels Ki 67-Färbung. **C,F**) Nachweis apoptotischer Zellen durch TUNEL-Färbung. Maßstabsbalken (A,B,D,E)= 200 µm, (C,F)= 100 µm

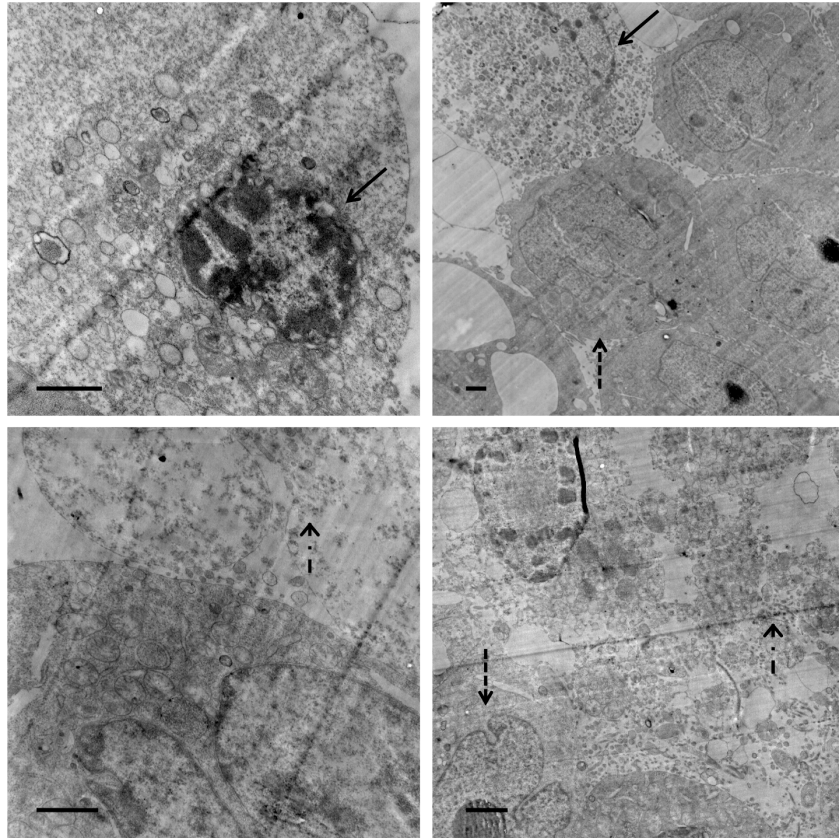


Abbildung 26: Nachweis vitaler Zellen am Rand und apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen im Zentrum von Tumorsphäroiden. Tumorsphäroide wurden nach 12 Tagen in Kultur fixiert, dehydriert und eingebettet. Die Analyse erfolgte mittels Transmissionselektronenmikroskopie. Durch Apoptose gestorbene Zellen sind z.B. durch kondensierte DNA (durchgängiger Pfeil), nekrotische Zellen durch eine völlig zerstörte Zellstruktur (Pfeil mit Punkt) und gesunde Zellen z.B. durch einen großen, intakten Zellkern und Plasmamembran (gestrichelter Pfeil) zu erkennen. Maßstabsbalken = 1 µm

Es konnte also ein organotypisches *in vitro* Modell aus in Vollhautmodelle inserierte Tumorsphäroide etabliert werden, dass in hohem Maße die Eigenschaften eines soliden, avaskulären *in vivo* Tumors simuliert. Dabei ist nicht nur die dreidimensionale Struktur des Tumors und der Haut gegeben, auch wird die im nativen Tumorgewebe anzufindende Zellheterogenität mit lebenden Zellen nahe der Nährstoffquelle und toten Zellen im Zentrum sehr gut wiedergespiegelt. Des Weiteren kann der Tumor mit der extrazellulären Matrix und den darin enthaltenen Fibroblasten, sowie mit den Keratinozyten der Epidermis kommunizieren. Vollhautmodelle mit integrierten Tumorsphäroiden eignen sich also sehr gut zur Testung und Selektion möglicher Behandlungsformen insbesondere für das Maligne Melanom. Vorteile sind die spezifische Größe des Tumors zu Beginn der Versuche und die Tatsache, dass der Experimentator viele Parameter selber bestimmen kann.

4.11 Behandlung von Tumorsphäroiden im Vollhautmodell mit TRAIL in Kombination mit Cisplatin führt zur reduzierten Proliferation und erhöhten Apoptose

Bei einer Kurzzeitstimulation (Tag 10-14 der *air-liquid*-Kultivierung) mit 40 μ M Cisplatin und 500 ng/ml izTRAIL war sowohl bei unbehandelten als auch bei TRAIL oder Cisplatin stimulierten Tumorsphäroiden die tote Zellpopulation im Zentrum (TUNEL positiv) und die lebende Zellpopulation am Rande der Tumorsphäroide (ki 67 positiv) zu erkennen. Wurde hingegen TRAIL mit Cisplatin kombiniert, so zeigten auch die äußeren Zellen die typische Morphologie der toten Zellen des Zentrums, insbesondere einen kondensierten Zellkern. Jedoch waren von dieser Behandlung auch zu einem gewissen Maße die Keratinozyten betroffen (siehe Abbildung 27). Eine immunhistochemische Analyse ergab, dass die Anzahl proliferierender Zellen (Ki 67) nach der Kombinationsbehandlung mit TRAIL und Cisplatin zu einem hohen Maße reduziert war (siehe Abbildung 28). Zieht man die morphologische Veränderung der Zellen mit in Betracht, so kann eine fehlende Detektion von Ki 67 zusätzlich auf tote Zellen zurückzuführen sein. Tatsächlich zeigte sich in der immunhistologischen Färbung eine Zunahme von aktiver Caspase 3 in der Peripherie stimulierter Sphäroide (siehe Abbildung 29). Eine anschließende TUNEL-Färbung konnte die Annahme erneut bestätigen. Während in unbehandelten und einzelstimulierten Sphäroiden TUNEL-positive Zellen primär im Zentrum nachgewiesen werden konnten, zeigten mit TRAIL und Cisplatin kostimulierte Sphäroide verstärkt apoptotische Zellen in der Peripherie. Die Zellen des Zentrums wurden hier kaum noch gefärbt, vermutlich weil die Zellen schon sekundär nekrotisch und zerstört waren (siehe Abbildung 30).

Insgesamt sprechen diese Ergebnisse für eine erfolgreiche Therapie solider Formen des Malignen Melanoms durch TRAIL in Kombination mit Cisplatin. Dabei sind Therapiemodalitäten, insbesondere für Cisplatin, noch optimierbar. Offensichtlich eignen sich ins Hautmodell integrierte Tumorsphäroide sehr gut als präklinisches Testsystem für die Evaluierung und Selektion möglicher Behandlungen des Malignen Melanoms.

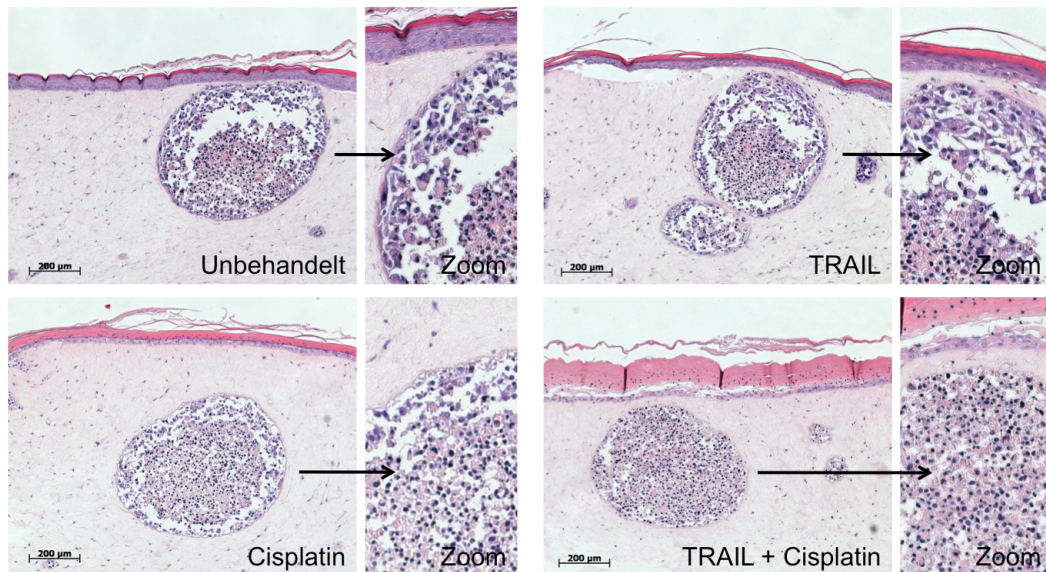


Abbildung 27: Durch TRAIL und Cisplatin sensitivierte Melanomzellen in Tumorsphäroiden zeigen ein morphologisches Merkmal der Apoptose. Hautmodelle mit integrierten Tumorsphäroiden wurden von Tag 10-14 der *air-liquid*-Kultivierung mit 500 ng/ml izTRAIL, 40 µm Cisplatin oder mit einer Kombination beider Stimuli behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Tumorsphäroide. FFPE-Dünnschnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und lichtmikroskopisch analysiert. Von der Behandlung beeinflusste Zellen zeigen einen kondensierten Zellkern, ein Merkmal der Apoptose. Maßstabsbalken = 200 µm

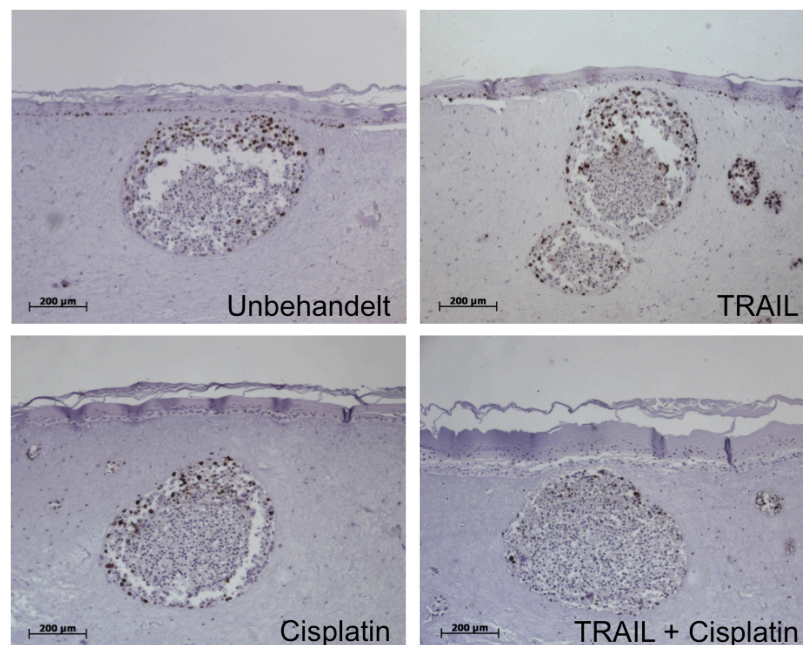


Abbildung 28: Behandlung von Tumorsphäroiden mit TRAIL in Kombination mit Cisplatin reduziert die Anzahl proliferierender Melanomzellen im Sphäroid. Mit TRAIL und Cisplatin behandelte bzw. unbehandelte Hautmodelle mit integrierten Tumorsphäroiden wurden immunhistologisch mit einem Antikörper gegen Ki 67 gefärbt und lichtmikroskopisch analysiert. Maßstabsbalken = 200 µm

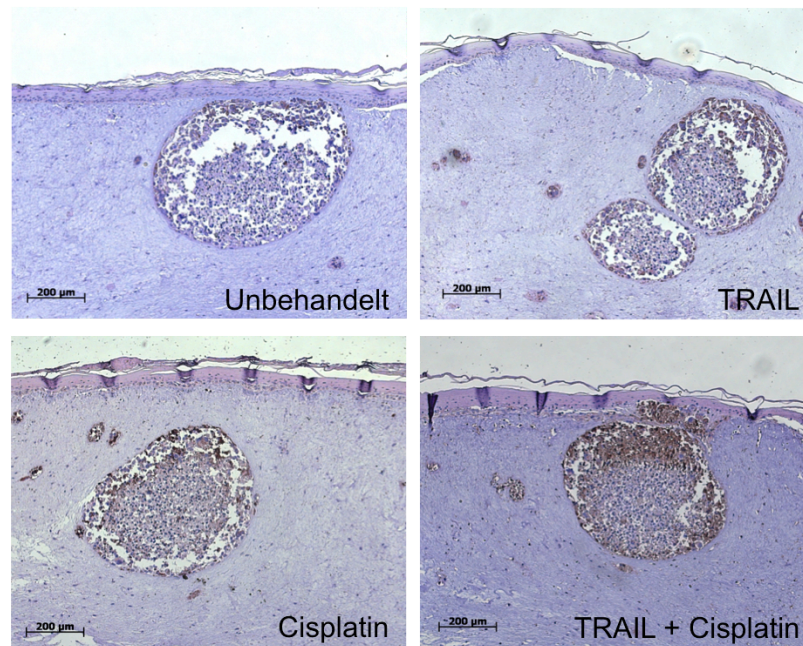


Abbildung 29: Behandlung von Tumorsphäroiden mit TRAIL in Kombination mit Cisplatin führt zur erhöhten Apoptose von Melanomzellen. Färbung auf aktive Caspase 3. Hautmodelle mit integrierten Tumorsphäroiden wurden mit izTRAIL und Cisplatin behandelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Tumorsphäroide. FFPE-Dünnschnitte wurden immunhistologisch gegen aktive Caspase 3 gefärbt. Maßstabsbalken = 200 µm

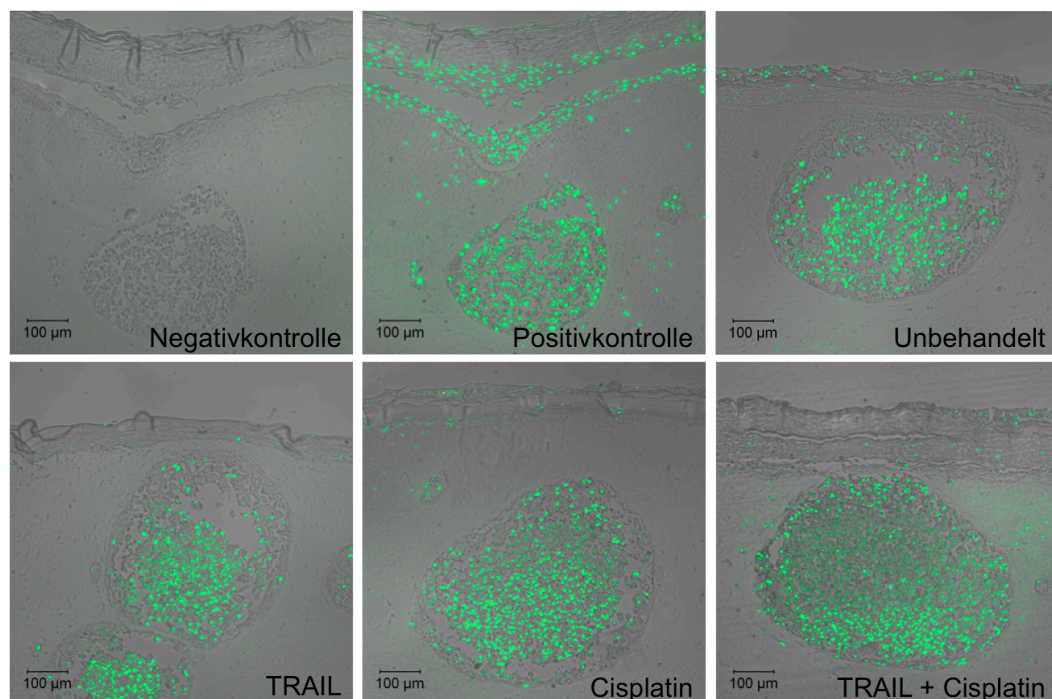


Abbildung 30: Behandlung von Tumorsphäroiden mit TRAIL in Kombination mit Cisplatin führt zur erhöhten Apoptose von Melanomzellen. TUNEL-Nachweis. Mit TRAIL und Cisplatin behandelte bzw. unbehandelte Hautmodelle mit integrierten Tumorsphäroiden wurden zum Nachweis von Apoptose TUNEL-gefärbt. Positivkontrolle = Behandlung mit DNase I (1500 U/ml), Negativkontrolle = Färbung nur mit *label solution*. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Konfokalmikroskop. Maßstabsbalken = 100 µm

4.12 Nachweis von ABCB5-positiven Zellen deutet auf eine mögliche Langzeitresistenz hin und unterstreicht die *in vivo* Relevanz des neuartigen Tumor-Testsystems

Um die Ähnlichkeit des neuartigen Tumor-Testsystems zu einem *in vivo* Tumor genauer zu Evaluieren, wurden bekannte, klinisch hoch relevante und *in vivo* beobachtete Mechanismen der Langzeitresistenz gegenüber Chemotherapeutika untersucht. Dazu zählen z.B. das Überleben von Zellen durch den Zustand der Autophagie [171–173], das langfristige Tumorstadium durch das Vorhandensein von langsam proliferierenden Zellen, vermittelt durch die Expression von Jarid1B [174, 175] oder das erhöhte Ausschleusen von chemotherapeutischen Substanzen vermittelt durch eine verstärkte Expression von Membrantransportern wie ABCB5 [176].

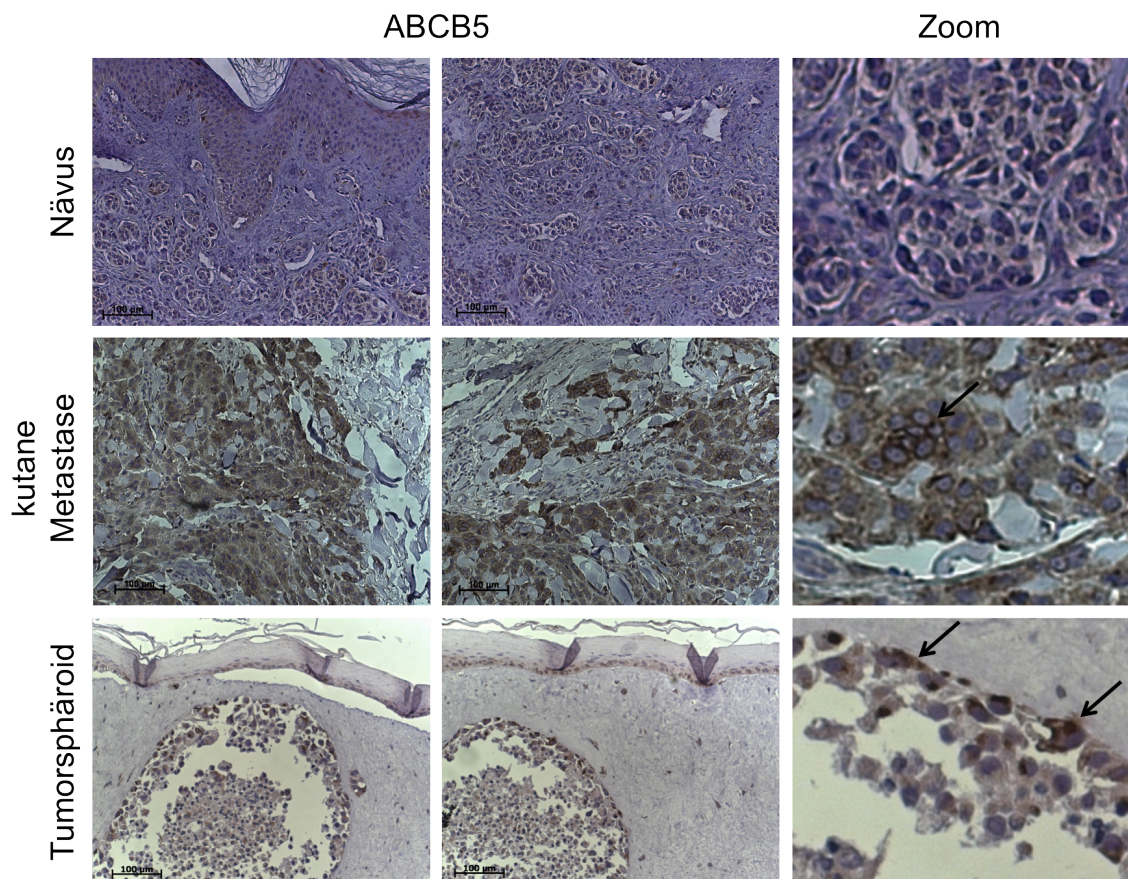


Abbildung 31: Nachweis von ABCB5 im nativen Tumorgewebe und Tumorsphäroid. Paraffinschnitte eines humanen dermalen Nävuszellnävus (Hautklinik Kiel), einer kutanen Metastase (Hautklinik Dresden) und ins Hautmodell integrierte Tumorsphäroide wurden immunhistologisch auf den Membrantransporter ABCB5 gefärbt. Als Kontrolle diente die Färbung mit Sekundäntikörper (Aufnahmen hier nicht gezeigt). Pfeil = ABCB5 positive Zellen. Maßstabsbalken = 100 µm

Tatsächlich konnten sowohl in einer primären, kutanen Melanometastase als auch in integrierten Tumorsphäroiden selektiv in vereinzelt Zellen eine verstärkte Expression des Membrantransporters ABCB5 detektiert werden. Dabei hebt sich ABCB5-positive Zellen durch eine deutlich stärkere und die Zelle umrandende Braunfärbung von der Hintergrundfärbung ab. In beiden Fällen war zu beobachten, dass nur ein Teil der Zellen positiv gefärbt wurde. Im Gegensatz zum Tumorgewebe, wurden die Zellen eines dermalen Nävuszellnävus nicht gefärbt. Hier kam es lediglich zu einer Hintergrundfärbung. Ins Hautmodell integrierte Tumorsphäroide simulieren also auch in Hinblick auf interne Zelldifferenzierung sehr gut natives Tumorgewebe, wobei ABCB5-positive Zellen in der Lage sind Langzeitresistenzen zu vermitteln, eventuell auch im Hinblick auf eine mögliche Behandlung des Malignen Melanoms mit TRAIL und Cisplatin bzw. UVB.

Insgesamt konnte also durch die Integration von Tumorsphäroiden spezifischer Größe in Vollhautmodelle ein neues Tumor-Testsystem entwickelt werden, welches die *in vivo* Situation eines soliden, avaskulären Malignen Melanoms mit dessen dreidimensionaler Struktur, Zellheterogenität, umliegendem Gewebe und mögliche Langzeitresistenzen in hohem Maße simuliert. Das hier beschriebene Tumor-Testsystem mit hoher klinischer Relevanz eignet sich also sehr gut zur Selektion möglicher Therapien für das Maligne Melanom, zumal eine Reduktion der Tumorgöße eines bestehenden, soliden Tumors analysiert werden kann.

5. Diskussion

Das Maligne Melanom ist bis heute die aggressivste Form aller Hautkrebsarten mit der höchsten Sterberate. Besonders Patienten mit metastatischen Stadien besitzen sehr schlechte bzw. infauste Prognosen. Gründe dafür liegen in der Fähigkeit früh Metastasen zu bilden, die zudem eine hohe Resistenz gegenüber Radio- und Chemotherapien aufweisen. In jüngster Zeit kamen jedoch zwei neue Therapeutika zur systemischen Behandlung des Malignen Melanoms auf den Markt: Vemurafenib, ein Inhibitor der mutierten Serin-Threonin-Kinase BRAF V600E des MAPK-Signalwegs und Ipilimumab, ein immunmodulatorischer Antikörper. Trotz dieser neuen Entwicklungen bleibt das Maligne Melanom, insbesondere in fortgeschrittenen Stadien schwer bzw. meist nicht therapierbar, zumal z.B. Vemurafenib nur für Patienten mit der V600E Mutation in der BRAF-Kinase zugänglich ist und auch für BRAF-Inhibitoren bereits Resistenzen festgestellt wurden [177–179]. Die Suche nach neuen Therapiemodalitäten für das Maligne Melanom ist also unabdingbar. In diesem Zusammenhang erlangte in den letzten Jahren nicht nur die kombinatorische Inhibition der konstitutiv aktiven Akt- und MAPK-Signalwege [121–124], sondern auch der Todesligand TRAIL der TNF-Superfamilie zunehmend an Interesse. Da insbesondere TRAIL tumorselektiv Apoptose in transformierten Zellen induziert, ohne normale Zellen zu schädigen [131–134], kommt dieser Todesligand auch als mögliches Therapeutikum für das Maligne Melanom in Frage. Jedoch zeigten sich viele Melanomzelllinien und das primäre Melanom, genauso wie weitere Tumore, z.B. Glioblastom [180], Leukämien [181], Pankreaskarzinom [182] etc., resistent gegenüber TRAIL [161, 183, 184]. Über die Tatsache, ob die differenzielle Expression von TRAIL-Köderrezeptoren an der Resistenzvermittlung des Malignen Melanoms beteiligt ist, wird kontrovers diskutiert [183, 185, 186]. Allerdings konnten eigene Arbeiten, die 18 Melanomzelllinien in Betracht zogen, keinerlei Korrelation zwischen der differenziellen TRAIL-Rezeptorexpression und der Resistenz gegenüber TRAIL feststellen [161]. Vielmehr entpuppte sich die stringente Wechselwirkung zwischen XIAP und Caspase 3 als ausschlaggebend für die TRAIL-Resistenz, ein Phänomen welches sich ubiquitär und unabhängig vom Tumorprogressionsstadium für alle getesteten Zelllinien verifizieren ließ [161].

Um der Apoptoseresistenz gegenüber TRAIL entgegenzuwirken, treten zunehmend gezielte Kombinationstherapien aus TRAIL und Chemotherapeutika, Bestrahlung oder auch Inhibitoren anti-apoptotischer Proteine in den Mittelpunkt. Diese forcieren die Induktion des programmierten Zelltods durch den extrinsischen bzw. intrinsischen Signalweg und resensitivieren somit Tumorzellen gegenüber TRAIL. Als Beispiele sind hier die Kombinationen aus TRAIL mit Proteasom-inhibitoren (z.B. PS341/Bortezomib), mimetische Smac-Verbindungen und DNA-schädigende Agenzien (z.B. Cisplatin, Doxorubicin, Etoposid, Bestrahlung) zu nennen [158]. Insbesondere im Hinblick auf die Sensitivierung TRAIL-resistenter Melanomzellen können diese Kombinationstherapien dazu beitragen das für die Resistenz ausschlaggebende Protein XIAP zu inhibieren. So führte eine Behandlung von Melanomzellen mit spezifischen XIAP-Inhibitoren, den mimetischen smac-Verbindungen, in Kombination mit TRAIL zur erhöhten Apoptose in Melanomzellen [187]. Auch konnte durch DNA-Schaden oder den Proteasom-inhibitor Bortezomib eine Potenzierung des intrinsischen Signalweges und somit eine erhöhte Freisetzung des endogenen XIAP-Inhibitors smac/DIABLO erreicht werden und Melanomzellen sensitiviert werden [162, 187, 188]. Bortezomib wirkte dabei insbesondere durch die Induktion bzw. Aufregulierung des proapoptotischen Proteins Noxa [188, 189]. Es kann aber auch die Aktivierung von NF κ B und somit responsive Gene wie XIAP inhibieren [190]. In Übereinstimmung mit diesen Daten konnten in der vorliegenden Arbeit unter der Depletion von XIAP und der vollständigen Prozessierung von Caspase 3 in das 17 kDa-Fragment TRAIL-resistente bzw. leicht TRAIL-sensitive Melanomzelllinien verschiedener Progressionsstadien *in vitro* gegenüber TRAIL sensitiviert werden, indem sie mit izTRAIL und subletalen Dosen der DNA-schädigenden Agenzien Cisplatin bzw. UVB-Strahlung kostimuliert wurden. Dabei konnte zunächst von Thayaparasingham *et al.* ein für diese XIAP-Depletion verantwortlicher Mechanismus gezeigt werden. So kommt es unter kostimulatorischen Bedingungen mit TRAIL und UVB zu einer NF κ B-abhängigen Repression der Expression von XIAP [161]. Auch in dieser Arbeit kam es unter der kostimulatorischen Behandlung mit TRAIL und UVB bzw. Cisplatin zur Degradation von I κ B α , was mit einer Aktivierung von NF κ B in Zusammenhang gebracht werden kann. Dies korrelierte jedoch nicht mit einer Expression von XIAP wie unter alleiniger Stimulation mit TRAIL, sondern mit einer Depletion von XIAP. NF κ B wird also unter dem Einfluss

von DNA-Schäden von einem Aktivator zu einem Repressor anti-apoptotischer Gene [191, 192], in diesem Fall XIAP [161]. Ein weiterer von Hörnle *et al.* gezeigter Mechanismus, der zur XIAP-Depletion unter kostimulatorischen Bedingungen mit TRAIL und UVB bzw. Cisplatin führt, ist die Aktivierung des intrinsischen Signalweges und die Freilassung von smac/DIABLO und Cytochrom C aus dem Mitochondrium, wie es auch verstärkt für TRAIL-sensitive Zelllinien gezeigt werden konnte [193]. Smac/DIABLO antagonisiert XIAP [194, 195] indem es um die Bindestelle an Caspase 3 kompetitiert, sodass diese vollständig prozessiert werden kann. Freie aktive Caspase 3 spaltet im Gegenzug XIAP, welches daraufhin proteosomal degradiert wird. Depletiertes XIAP kann nun nicht weiter die Caspasen 3 und 9 inhibieren, wodurch ein positiver *feedback loop* entsteht, durch den synergistisch Apoptose induziert werden kann [162].

Auch wenn TRAIL-resistente Melanomzellen durch beschriebene Kombinations-therapien gegenüber TRAIL resensitiviert werden können, muss sichergestellt werden, dass diese nicht zu Lasten der Tumorselektivität gehen. In diesem Zusammenhang führte z.B. die Behandlung mit TRAIL und Cisplatin zu einer Sensitivierung von primären Hepatozyten [196] und die Behandlung mit TRAIL und der Inhibition des Proteasoms zur Sensitivierung von primären Keratinozyten [197]. Dabei stellte sich allerdings heraus, dass die Sensitivierbarkeit beider Zelltypen z.B. von Kultivierungsbedingungen, vom Differenzierungszustand [196, 198, 199] und auch von der rekombinanten TRAIL-Form abhängig ist [145, 200]. Mit der Debatte um die Sensitivierbarkeit von Keratinozyten und Hepatozyten wird erneut deutlich wie wichtig ein möglichst *in vivo* getreues, physiologisches, humanes Modellsystem ist, um mögliche cytotoxische Wirkungen TRAIL-basierter Therapien abschätzen, bzw. sogar voraussagen zu können. Um so aussagekräftiger ist die Tatsache, dass in dieser Arbeit eine Behandlung mit TRAIL in Kombination mit UVB bzw. Cisplatin nicht nur in der 2D-Zellkultur, sondern auch in dreidimensionalen Tumorsphäroiden und organotypischen Hautmodellen selektiv auf Melanomzellen wirkte, ohne die umgebenden normalen Hautzellen zu schädigen. So blieben zunächst in der 2D-Zellkultur primäre humane Keratinozyten, Fibroblasten und Melanozyten gegenüber den Stimuli weitgehend resistent, während die hochaggressive Melanomzelllinie 451-LU stark sensitiviert wurde (>30 % Apoptose). Lediglich Keratinozyten zeigten eine leichte Sensitivität unter kostimulatorischen Bedingungen. Dieses überrascht allerdings

nicht, denn auch unter physiologischen Bedingungen sind Keratinozyten Apoptose-sensitiv. So stellt die Induktion von Apoptose in Keratinozyten, insbesondere nach erhöhtem DNA-Schaden, verursacht durch UVB-Strahlung, ein Schutzmechanismus dar, um vor Hautkrebs zu schützen [201–203]. Im Gegensatz dazu ist für Melanozyten bekannt, dass sie eine hohe Apoptoseresistenz besitzen und sehr langlebig sind, was langfristig zu einer genomischen Instabilität und zur Entstehung des Malignen Melanoms beitragen kann [37, 204].

Trotz der möglichen Sensitivierung TRAIL-resistenter Melanomzellen gegenüber TRAIL in der 2D-Zellkultur ist zu beachten, dass diese nicht die *in vivo* Situation eines Tumors simuliert. So fehlen die dreidimensionale Struktur und eine extrazelluläre Matrix, in der die Zellen eingebettet sind. Auch ergeben sich in der 2D-Zellkultur andere Nährstoffversorgungen als im dreidimensionalen Tumorgewebe. Während in Ersterer die Zellen gleichmäßig versorgt werden können, ergeben sich im Tumorgewebe nahe der Blutgefäße Bereiche mit hohem Nährstoff- und Sauerstoffgehalt, während das Zentrum sauerstoff- und nährstoffarm ist und dort Abfallprodukte akkumulieren [66, 69, 78]. Auf Grund dessen existieren im nativen Tumor verschiedene Zellsubpopulationen mit unterschiedlichen physiologischen Eigenschaften. Aus diesen Tatsachen heraus können sich nicht nur die Genexpression, Adhäsion, Migration und Invasion der Zellen, sondern insbesondere auch die Radio- und Chemoresistenz bzw. Sensitivität ändern [61–65]. Die Beurteilung einer möglichen *in vivo* Relevanz für die selektive Behandlung des Malignen Melanoms mittels TRAIL in Kombination mit UVB bzw. Cisplatin ist also durch *in vitro* Versuche in der 2D-Zellkultur unzureichend. Aus diesem Grunde wurden in dieser Arbeit dreidimensionale Tumorsysteme unterschiedlicher Komplexität, nämlich Tumorsphäroide und organotypische Hautmodelle, verwendet bzw. entwickelt, um eine *in vivo* nahe Situation zu kreieren und so die Übertragbarkeit der *in vitro* Ergebnisse auf klinische Applikationen zu analysieren.

Zunehmend werden Tumorsphäroide zur Evaluierung der Wirksamkeit und Sicherheit neuer Substanzen verwendet [65, 205, 206], weil ihre Herstellung einfach ist und sie dafür bekannt sind, dass sie nicht nur die dreidimensionale Struktur eines Tumors, sondern auch die lebende Zellpopulation am Rande und die apoptotische bzw. nekrotische Zellpopulation im Zentrum von Tumoren darstellen können. Allerdings muss für die Ausbildung des nekrotischen /

apoptotischen Zentrums ein Durchmesser von ca. 500 µm gewährleistet sein, denn erst ab jener Größe ist eine gleichmäßige Versorgung durch Sauerstoff und Nährstoffe mittels Diffusion nicht mehr gegeben und Abfallprodukte werden verstärkt im Zentrum akkumuliert. Als Konsequenz gehen die lebenden Zellen zunächst in einen Ruhezustand über und sterben schließlich im Zentrum [69, 77, 79]. Da die hier hergestellten Tumorsphäroide der hochaggressiven Melanomzelllinie 451-LU diese kritische Größe erreichten, war die Grundvoraussetzung für das Vorhandensein eines apoptotischen / nekrotischen Tumorzentrums gegeben. Zusätzlich konnte bewiesen werden, dass die Zellen nahe der Nährstoffquelle, sprich in der Peripherie der Sphäroide, vital waren. Nur vereinzelt wurden tote Zellen beobachtet.

Entsprechend einer Vielzahl an Studien zeigen Tumorsphäroide eine erhöhte Resistenz gegenüber diversen Therapiemodalitäten. Gründe dafür liegen z.B. in einer verringerten Penetration von Substanzen, wie es z.B. für Vinblastin, Doxorubicin, Cisplatin und weitere Substanzen anhand von Sphäroiden oder multizellulären Schichten gezeigt werden konnte [207–209]. Ein weiterer wichtiger Resistenzmechanismus wird durch das Vorhandensein von hypoxischen Zellen im Zentrum von Sphäroiden bzw. Tumoren vermittelt. Dabei scheint insbesondere der Transkriptionsfaktor HIF (engl. *Hypoxia-inducible factor*) eine entscheidende Rolle zu spielen, wobei dessen Beitrag zu Resistenzmechanismen komplex und Tumorabhängig ist [210]. Er kann z.B. zur Aufregulierung von Proteinen führen, welche in der Glykolyse oder Angiogenese beteiligt sind, aber auch zur Runterregulierung pro-apoptotischer Proteine wie Bid beitragen, wodurch das Überleben von Zellen unter sauerstoffarmen Bedingungen erlaubt wird [211], [212]. Auch die Aufregulierung anti-apoptotischer Proteine kann zur Resistenz beitragen. So zeigte sich im Vergleich zur 2D-Zellkultur eine verstärkte Resistenz gegenüber der Behandlung mit Bortezomib und TRAIL in Lungenkrebs-Sphäroiden, wobei dies mit einer erhöhten Bcl-2-Expression begründet wurde [213]. Offensichtlich kann jedoch eine erhöhte Resistenz gegenüber diversen Therapiemodalitäten in dreidimensionalen Testsystemen nicht verallgemeinert werden, denn die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigten, dass Tumorsphäroide genauso wie die Zellen der 2D-Zellkultur sensitiv auf TRAIL in Kombination mit Cisplatin und UVB reagierten. Sowohl die Anzahl toter sich aus dem Sphäroid lösenden Zellen als auch die Ausbildung apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen in der Peripherie der

Tumorsphäroide belegten hierbei, dass die Kombination aus TRAIL und Cisplatin einen stärkeren Effekt als die Kombination aus TRAIL und UVB hatte. In der 2D-Zellkultur induzierte hingegen TRAIL zusammen mit UVB stärker Apoptose, wobei der generelle Wirkmechanismus, nämlich mit XIAP einhergehende Caspase 3-Aktivierung, identisch war. Erklärenderweise ist zu erwähnen, dass die UVB-Strahlung in der 2D-Zellkultur auf jede Zelle gleichermaßen einwirken kann, während sie im Tumorsphäroid wahrscheinlich nur die obersten Zellschichten erreicht. Hingegen kann Cisplatin als Chemotherapeutikum eventuell tiefer in die Tumorsphäroide eindringen und effektiver DNA-Schaden und somit Apoptose induzieren.

Tumorsphäroide stellen im Vergleich zu anderen 3D-Zellkulturen einen klassischen Ansatz dar, um das Mikromilieu, die Funktion und die Histomorphologie eines *in vivo* Tumors nachzuahmen [214–217]. Sie sind in der Lage, die dreidimensionale Struktur und die Zellheterogenität eines Tumors zu rekapitulieren, insbesondere wenn sie mit anderen Zellen wie Fibroblasten [60, 218, 219], Immunzellen [220] und Endothelzellen [221, 222] kokultiviert werden. Jedoch können sie nicht die *in vivo* Situation der kutanen Form des Malignen Melanoms in der Haut simulieren. Um die für das Tumorstadium und auch die Tumorthherapie wichtige Wirtsumgebung zu simulieren, gewinnen organotypische Hautmodelle zunehmend an Bedeutung. Im Vergleich zu multizellulären Sphäroiden, schließen diese noch weiter die Lücke zwischen 2D-Zellkulturen und nativem Gewebe, zumal „klassische Hautmodelle“ mit Fibroblasten und Keratinozyten ebenfalls um weitere Zellen wie Endothelzellen [110, 223–225], Langerhanszellen [102, 226, 227], Makrophagen [228], Melanozyten [229, 230] und insbesondere Melanomzellen [92, 114, 115] erweiterbar sind.

Wie wichtig organotypische Hautsysteme und mit ihnen die Kommunikation zwischen Zellen in der Melanomforschung sind, wird insbesondere durch die Wechselwirkung von Keratinozyten mit Melanozyten bzw. Melanomzellen deutlich. So zeigen Melanozyten in der 2D-Zellkultur nur eine di- bzw. tripolare Morphologie, während sie in Kokultur mit Keratinozyten ihre *in vivo* typische Multipolarität behalten [44]. Des Weiteren weisen Melanozyten in reiner 2D-Zellkultur Attribute von transformierten Zellen auf, wie z.B. eine erhöhte Proliferation oder die Expression melanomspezifischer Antigene (z.B. MelCAM/MUC18, β 3 Integrin)

[44]. Hingegen wird in Kokultur mit Keratinozyten, unter der E-Cadherin vermittelten Kontrolle [231], der physiologische Phänotyp von Melanozyten wieder hergestellt. Dabei wird nicht nur die Expression melanomspezifischer Antigene auf ein nicht detektierbares Maß reduziert, auch stellt sich das Verhältnis einer typischen Melanineinheit ein, wobei 1 Melanozyt zwischen ca. 5-10 Keratinozyten gelagert ist [44, 232]. Untersuchungen zu der Interaktion zwischen Melanomzellen und Keratinozyten in Hautäquivalenten zeigten, dass der Zellkontakt eine entscheidende Rolle bei der Herunterregulierung der invasionsrelevanten Rezeptoren MelCAM/MUC18 und β 3 Integrin spielt, wodurch die Invasivität von Melanomzellen beeinflusst wird [233]. Diese Studien unterstreichen erneut, dass die 2D-Zellkultur nur eine beschränkte Aussagekraft in der Erforschung melanomrelevanter Fragestellungen besitzt. Deswegen sollten bei der Evaluation neuer Therapieansätze organotypische Hautmodelle in Betracht gezogen werden.

Dafür muss allerdings zunächst sicher gestellt sein, dass hergestellte Hautmodelle in einem bestimmten Umfang funktional sind und die Strukturen nativer Haut widerspiegeln. Eben dies konnte, wie den Ergebnissen dieser Arbeit zu entnehmen ist, gewährleistet werden. Die hergestellten Vollhautäquivalente entwickelten sehr präzise die dermalen und epidermalen Strukturen der humanen Haut. Insbesondere die Keratinozyten vollzogen einen vollständigen Differenzierungsprozess und bildeten wie *in vivo* eine Epidermis mit den unterschiedlichen Schichten: *Stratum basale*, *spinosum*, *granulosum* und *corneum* und bildeten im Zusammenspiel mit den Fibroblasten eine dermale-epidermale Junctionszone, die sogenannte Basalmembran. Da in anderen Studien gezeigt werden konnte, dass die Interaktionen zwischen Fibroblasten und Keratinozyten nicht nur für die Bildung der Basalmembran [234, 235], sondern auch für das Wachstum [236, 237], die Differenzierung [96, 98] und das Regenerationspotenzial der Epidermis [96–99] wichtig ist, konnte im entwickelten Hautäquivalent davon ausgegangen werden, dass eine funktionierende Kommunikation zwischen Keratinozyten und Fibroblasten stattfindet. Dermale Papillen bzw. epidermale Reteleisten zur effektiven diffusionsvermittelten Nährstoffversorgung der Epidermis durch die Dermis wurden in den hier hergestellten Vollhautmodellen jedoch nicht ausgebildet. Da die Vollhautmodelle jedoch lediglich über Medium versorgt wurden und nicht über ein Blutgefäßsystem mit Kapillarschlingen, die normalerweise bis in die Papillen hinreichen, spielt dieser Punkt hier eine

untergeordnete Rolle. Insgesamt konnten also funktionale Vollhautmodelle hergestellt werden, die die strukturelle, funktionelle und physiologische Komplexität der nativen Haut in hohem Maße simulieren.

Um zu untersuchen, ob sich Melanomzellen gegenüber TRAIL im Hautmodell sensitivieren lassen, wurden verschiedene Melanomzelllinien ins Hautmodell integriert, sich aber in den Versuchen auf Grund der hohen klinischen Relevanz auf die Zelllinie 451-LU des metastatischen Stadiums konzentriert. Diese bildet entsprechend ihrer hohen Aggressivität verstärkt S100B nachweisliche Tumornester in der Dermis, vereinzelt jedoch auch in der Epidermis. Damit konnten Ergebnisse anderer Studien bestätigt werden, nach denen das Invasionspotenzial mit der Aggressivität der Zelllinie korreliert, wodurch klinische Progressionsstadien des Malignen Melanoms wiedergegeben werden können. So konnte gezeigt werden, dass Melanomzellen der radialen Wachstumsphase (z.B. SBCL2, WM35) epidermale Nester bilden bzw. an der Grenze zur Dermis wachsen, Zellen der vertikalen Wachstumsphase bereits in die Dermis filtrieren (z.B. WM793, WM115) und metastatische Melanomzellen (z.B. 451-LU, 1205LU) wie oben beschrieben Nester oder auch strangähnliche Strukturen tief in der Dermis bilden [92, 114, 115]. Zur Behandlung der 451-LU-Zellen in Hautmodellen wurde analog zur 2D-Zellkultur TRAIL mit UVB bzw. Cisplatin kombiniert. Dabei wurde anhand der reduzierten Tumornestgröße und der erhöhten Apoptose deutlich, dass sich Melanomzellen nicht nur in der 2D-Zellkultur sensitivieren lassen, sondern auch ein Therapieerfolg unter *in vivo* ähnlichen Bedingungen des Melanoms erzielt werden konnte. Insbesondere im Hinblick auf die *in vivo* Relevanz dieser Ergebnisse, ist von besonderer Bedeutung, dass in dieser Arbeit tatsächlich Vollhautmodelle und nicht, wie in anderen Studien, rein dermale Hautäquivalente verwendet wurden. So wurden z.B. dermale Modelle mit integrierten 451-LU-Zellen benutzt, um die kombinatorische Wirksamkeit von Inhibitoren des MAPK- und Akt-Signalwegs (z.B. Sorafenib + Rapamycin) und die gleichzeitige Behandlung mit Cisplatin und dem PI3-Kinase Inhibitor LY294002 zu untersuchen [123, 125, 238]. Zwar waren die Behandlungen erfolgreich, jedoch simulieren dermale Modelle nur den Zell-Zell-Kontakt zwischen Melanomzellen und Fibroblasten. Keratinozyten, die eine eben so wichtige Rolle im Mikromilieu des Malignen Melanoms besitzen, werden hierbei nicht berücksichtigt. Dabei ist bekannt, dass sowohl Keratinozyten als auch Fibroblasten z.B. über die E- bzw.

N-Cadherin vermittelte Kontrolle, über Wachstumsfaktoren wie PDGF, IGF-1 und bFGF und die Sekretion von Metalloproteinasen (z.B. MMP 9 sekretiert von Keratinozyten) mit Melanomzellen wechselwirken und einen entscheidenden Beitrag zur Aggressivität und Invasion, sowie zur Resistenz des Melanoms beitragen [47, 239–242]. Um so bedeutender ist die Tatsache, dass sich hier Melanomzellen mit Hilfe von Cisplatin und UVB gegenüber TRAIL im Vollhautmodell sensitivieren ließen, wobei die Kombination aus TRAIL und Cisplatin eine höhere klinische Relevanz besitzt, da es im Patienten systemisch wirken und sekundäre Fernmetastasen bekämpfen kann.

Zwar konnte die *in vivo* Relevanz der Behandlung des Malignen Melanoms mittels TRAIL in Kombination mit Cisplatin bzw. UVB erfolgreich in Tumorsphäroiden und insbesondere im Hautmodell gezeigt werden, allerdings wurde im Letzteren nicht aktiv die Größe der Tumornester reduziert, sondern lediglich, wie bis jetzt in anderen Studien auch [123, 125, 238], das weitere Auswachsen der Tumornester verhindert. Einen viel größeren Stellenwert im klinischen Alltag besitzt jedoch die Bekämpfung von bereits manifestierten, soliden Formen des Malignen Melanoms, zumal eine erfolgreiche Therapie für metastatische Stadien bis jetzt ausgeblieben ist. Um so wichtiger ist es, diese Situation in einem organotypischen Hautmodell so *in vivo* nahe wie möglich zu simulieren, um neue Therapien bzw. Substanzen zur Behandlung solider Formen des Malignen Melanoms testen zu können. Eben dies konnte durch 451-LU-Tumornester nicht realisiert werden, denn sie besitzen nicht die Größe, um einen avaskulären, soliden Tumor mit seiner differenziellen Nährstoffversorgung und daraus resultierenden Zellheterogenität zu simulieren. Um diese Probleme zu umgehen und die klinische Relevanz des dreidimensionalen organotypischen Haut- bzw. Tumorsystems zu erhöhen, wurden hier Tumorsphäroide in ein funktionales Vollhautmodell, nicht nur in Kollagen [94, 243, 244], integriert. Dadurch konnten nicht nur die dreidimensionalen Strukturen der Vollhaut und des Tumorsphäroids miteinander vereint werden, auch besitzt der Tumor die für *in vivo* typische Zellheterogenität mit proliferierenden Zellen nahe der Nährstoffquelle und apoptotische / nekrotische Zellen im nährstoff- und sauerstoffentfernten Zentrum. Trotz der Integration von Tumorsphäroiden blieben die dermalen und epidermalen Strukturen sehr gut erhalten, wodurch die Grundvoraussetzung für eine Kommunikation zwischen Haut- und Tumorzellen gegeben war. Diese ist, wie bereits oben angedeutet, für das Mikromilieu des Tumors von

Wichtigkeit. So bilden tumorassoziierte bzw. aktivierte Fibroblasten, welche unter anderem durch die Expression von α -smooth-muscle actin gekennzeichnet sind [245], für die Tumorprogression wichtige Matrix-Proteine wie z.B. Laminine, Kollagene, Fibronectin, Hyaluron und Tenascin [60, 242, 246]. Diese Matrixproteine bieten nicht nur Grundlage für die Tumorprogression und Metastasierung, sondern können auch Tumorresistenz vermitteln. So konnte für uveale Melanomzellen gezeigt werden, dass eine Bindung an Fibronectin, Kollagen IV und Laminin die Sensitivität gegenüber Cisplatin verringert [247]. Um so bedeutender ist die Beobachtung, dass auch die ins Hautmodell integrierten Tumorsphäroide anscheinend kapselartig von einer „stromatösen, Matrix-ähnlichen“ Struktur umgeben waren. Ähnlich konnte es in einer Studie gezeigt werden, in der TGF- β 1 produzierende Melanomzellen Fibroblasten zu einer erhöhten Matrixproduktion um den Tumor anregten [246].

In vivo ist das Maligne Melanom weiterhin besonders gekennzeichnet durch eine hohe Chemo- und Radioresistenz, wobei die zu Grunde liegenden molekularen Mechanismen eine hohe Komplexität aufweisen. So führen z.B. die verstärkte Aktivierung des MAPK-, AKT- und NF κ B-Signalwegs, die Aufregulierung anti-apoptotischer Proteine wie XIAP, Bcl $_{-XL}$, BCL-2 und die Runterregulierung des pro-apoptotischen Proteins Apaf-1 zur Proliferation und Tumorprogression, sowie zu einer verstärkten Apoptoseresistenz des Malignen Melanoms [248–252]. Insbesondere die verstärkte Detektion von XIAP im Melanom und dessen Korrelation zur Melanomprogression [184, 253] unterstreicht die gezeigte Relevanz von XIAP als Vermittler der TRAIL-Resistenz. Neben genannten Resistenzmechanismen trägt auch der Prozess der Autophagie zum langfristigen Überleben, zur Aggressivität und zur Resistenz von Melanomzellen bei. So konnte z.B. Ma *et al.* anhand elektronenmikroskopischer Analysen von metastatischen Tumorbiopsien hohe Autophagieraten mit geringen Überlebensraten von Patienten korrelieren. Auch konnte in dieser Studie anhand von Tumorsphäroiden und Xenograft-Versuchen gezeigt werden, dass Autophagie mit der Aggressivität von Melanomzellen korreliert, wobei dieser Effekt unter 2D-Bedingungen so nicht zu beobachten war. Eine Inhibition der Autophagie führte zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum Temozolimid [172]. Auch wurde Autophagie in Verbindung mit der Radioresistenz des Malignen Melanoms gebracht. So schlug Romano *et al.* eine Hypothese vor, nach der es durch

Bestrahlung zu einer FKBP51-abhängigen Aktivierung von NF κ B kommt, welches wiederum XIAP und Beclin-1 aufreguliert, wodurch Apoptose gehemmt bzw. Autophagie induziert wird [173]. In der Melanomforschung und -therapie ebenfalls zunehmend an Interesse gewinnend, sind die im Melanom vorkommenden Subpopulationen von Zellen, die in der Lage sind einen Tumor zu initiieren bzw. das langfristige Tumorstadium aufrecht zu erhalten. So konnte von Roesch *et al.* gezeigt werden, dass langsam proliferierende, Jarid1B-positive Zellen zwar nicht zwingend für die Initiierung eines Tumors, aber für das langfristige Tumorstadium benötigt werden [174, 175]. Ein weiteres in diesem Zusammenhang untersuchtes Protein ist ABCB5. Ein zur p-Glykoproteinfamilie gehörender Membrantransporter, der 2003 von Frank *et al.* beschrieben wurde [254] und der durch das erhöhte Ausschleusen von Substanzen zur Chemoresistenz des Malignen Melanoms beiträgt und mit der Aggressivität des Tumors korreliert [176]. Auch für den Membrantransporter ABCB5 konnte gezeigt werden, dass er nicht nur mit anderen klassischen Stammzellmarkern wie CD133 und CD166 koexprimiert [176] wird, sondern selber in der Lage ist im Gegensatz zu ABCB5-negativen Zellen Tumore in immundefizienten Mäusen zu initiieren [255]. Als klassischer Stammzellmarker wird ABCB5 allerdings kontrovers diskutiert, da laut Studien von Quintana *et al.* auch ABCB5-negative Zellen Tumore entwickeln können [256]. Die kritische Rolle für ABCB5 als tumorinitiierendes Protein im Melanom, insbesondere im Zusammenhang mit der Wichtigkeit des Mikromilieus, konnte allerdings durch Funkunaga-Kalabis *et al.* 2010 nochmals unterstrichen werden. So vermittelt das im Melanom verstärkt gebildete Matrixprotein Tenascin [257] ein erhöhtes Wachstum von Melanomsphären, die Bildung von Lungenmetastasen und eine erhöhte Resistenz gegenüber Doxorubicin. Passend dazu konnte gezeigt werden, dass Tenascin die Aufrechterhaltung einer ABCB5-positiven Subpopulation mit einer erhöhten Ausschleusung des Farbstoffes Hoechst 33342 (engl. *side-population*) vermittelt [258]. Da tumorinitiierenden Zellen bzw. Zellen mit Stammzellcharakter zunehmend eine Rolle bei der Tumorinitiierung und -progression, sowie bei der hohen Resistenz gegenüber Therapiemodalitäten zugesprochen wird [259], besitzen sie eine hohe klinische Relevanz. Auch in dieser Arbeit konnten ABCB5-positive Melanomzellen nicht nur in einer kutanen Metastase, sondern auch in Tumorsphäroiden, die in Hautmodelle integriert waren, nachgewiesen werden. Dabei waren, passend zu

anderen Studien [255], nur ein Teil der Zellen ABCB5-positiv. Dabei scheint diese ABCB5-positive Subpopulation tumorspezifisch zu sein, denn Zellen eines dermalen Nävus wurden nicht gefärbt. Diese Ergebnisse unterstreichen wirkungsvoll, dass das entwickelte Tumor-Testsystem eine hohe Ähnlichkeit zu einem nativen Tumor besitzt.

Zusammenfassend kann also festgehalten werden, dass sich Melanomzellen nicht nur in der 2D-Zellkultur, sondern auch in dreidimensionalen Tumorsphäroiden und organotypischen Hautmodellen, gegenüber TRAIL sensitivieren lassen, indem sie mit TRAIL und Cisplatin bzw. UVB kostimuliert werden. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass in ein Hautmodell integrierte Tumorsphäroide nicht nur die dreidimensionale Struktur und die Zellheterogenität eines soliden, avaskulären Malignen Melanoms, sondern auch mögliche Langzeitresistenzen simulieren, wobei letztere einen wichtigen Stellenwert in der Therapie des Malignen Melanoms einnehmen. In das Hautmodell integrierte Tumorsphäroide zerstören dabei nicht die epidermale und dermale Struktur des Vollhautmodells, wodurch Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix und den darin enthaltenen Fibroblasten, sowie mit Keratinozyten kommunizieren können. Dieses neu etablierte organotypische Tumor-Testsystem bietet sich also als humanes, *in vivo* nahes, präklinisches Testsystem zur Evaluierung und Selektion von Substanzen oder Therapien für das Maligne Melanom an. Dabei ist der Vorteil einer spezifischen und feststehenden Tumorgröße zu Beginn der Evaluierung und einer möglichen Intervention durch den Experimentator gegeben. Auch wenn klassische und ethisch problematische Tierversuche für z.B. toxikologische und pharmakokinetische Studien in absehbarer Zeit weiterhin Bestand haben werden, so könnte dieses dreidimensionale Tumorsystem zur Reduktion dieser Tierversuche beitragen.

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|---------------|---|----|
| Abbildung 1: | Schematischer Aufbau der humanen Haut..... | 13 |
| Abbildung 2: | Aufbau der humanen Epidermis | 16 |
| Abbildung 3: | Kutanes Melanom | 18 |
| Abbildung 4: | Entwicklungsstadien des Malignen Melanoms | 20 |
| Abbildung 5: | Zelluläre Heterogenität eines Tumorsphäroids | 23 |
| Abbildung 6: | Humane und murine Haut, sowie Vollhautmodelle im Vergleich | 24 |
| Abbildung 7: | Schema des TRAIL-Signalwegs | 28 |
| Abbildung 8: | Aktivierung und Inhibierung der Caspase 3..... | 30 |
| Abbildung 9: | Schematische Darstellung zur Isolierung primärer Hautzellen sowie zur Herstellung eines organotypischen Hautmodells | 57 |
| Abbildung 10: | Herstellung eines organotypischen Hautmodells..... | 58 |
| Abbildung 11: | Herstellung von Hautmodellen mit 451-LU-Tumorsphäroiden..... | 59 |
| Abbildung 12: | Sensitivierung TRAIL-resistenter Melanomzelllinien durch Kostimulation mit TRAIL und Cisplatin bzw. UVB | 75 |
| Abbildung 13: | Sensitivierung von Melanomzelllinien gegenüber TRAIL korreliert mit der Depletion von XIAP, sowie der Aktivierung von Caspase 3 und indikativ mit der Aktivierung von NF κ B | 76 |
| Abbildung 14: | Herstellung von Tumorsphäroiden..... | 77 |
| Abbildung 15: | Stimulation von Tumorsphäroiden mit TRAIL in Kombination mit UVB oder Cisplatin führt zum erhöhten Sterben von Melanomzellen..... | 78 |
| Abbildung 16: | Die Sensitivierung von Tumorsphäroiden gegenüber TRAIL korreliert mit NF κ B-Aktivierung, XIAP-Depletion, sowie Caspase 3-Aktivierung | 80 |
| Abbildung 17: | Die Behandlung von Melanomzellen mit TRAIL in Kombination mit UVB oder Cisplatin ist tumorselektiv | 82 |
| Abbildung 18: | Aufbau eines Vollhautmodells, dass strukturell und funktionell sehr stark nativer Haut gleicht. | 83 |
| Abbildung 19: | Vollhautmodelle zeigen eine vollständig differenzierte Epidermis und eine funktionelle Basalmembran wird ausgebildet..... | 84 |
| Abbildung 20: | Integration von Melanomzelllinien verschiedener Progressionsstadien ins organotypische Vollhautmodell..... | 85 |
| Abbildung 21: | Reduktion der Größe von Melanomnestern durch eine kostimulatorische Behandlung mit TRAIL und Cisplatin bzw. UVB | 87 |
| Abbildung 22: | Statistische Auswertung der Tumornestgröße im Hautmodell..... | 88 |

| | | |
|---------------|--|----|
| Abbildung 23: | Behandlung von Melanomnestern im Hautmodell mit TRAIL in Kombination mit Cisplatin oder UVB führt zur selektiven Induktion von Apoptose | 89 |
| Abbildung 24: | Selektiver Nachweis von Apoptose in Melanomnestern nach Behandlung mit TRAIL in Kombination mit Cisplatin oder UVB | 90 |
| Abbildung 25: | Ins Vollhautmodell integrierte Tumorsphäroide simulieren die <i>in vivo</i> Situation eines soliden Tumors. Nachweis einer vitalen, proliferierenden und einer apoptotischen Zellsubpopulation | 92 |
| Abbildung 26: | Nachweis vitaler Zellen am Rand und apoptotischer bzw. nekrotischer Zellen im Zentrum von Tumorsphäroiden | 93 |
| Abbildung 27: | Durch TRAIL und Cisplatin sensitivierte Melanomzellen in Tumorsphäroiden zeigen ein morphologisches Merkmal der Apoptose | 95 |
| Abbildung 28: | Behandlung von Tumorsphäroiden mit TRAIL in Kombination mit Cisplatin reduziert die Anzahl proliferierende Melanomzellen im Sphäroid | 95 |
| Abbildung 29: | Behandlung von Tumorsphäroiden mit TRAIL in Kombination mit Cisplatin führt zur erhöhten Apoptose von Melanomzellen. Färbung auf aktive Caspase 3 | 96 |
| Abbildung 30: | Behandlung von Tumorsphäroiden mit TRAIL in Kombination mit Cisplatin führt zur erhöhten Apoptose von Melanomzellen. TUNEL-Nachweis | 96 |
| Abbildung 31: | Nachweis von ABCB5 im nativen Tumorgewebe und Tumorsphäroid .. | 97 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-------------|---|----|
| Tabelle 1: | Benötigte Medien zur Kultivierung primärer Hautzellen und Melanomzelllinien | 32 |
| Tabelle 2: | Zusätze für Standard-Zellkulturmedien und die Zellkulturmedien EGM und MM zur Herstellung von Hautmodellen | 33 |
| Tabelle 3: | Enzyme für zellbiologische Arbeiten | 33 |
| Tabelle 4: | Substanzen zur Stimulation von Melanomzelllinien und Tumorsphäroiden .. | 33 |
| Tabelle 5: | Farbstoffe bzw. flourophorgekoppelte Substanzen zur Färbung von Zellen zum Nacheis von apoptotischen bzw. nekrotischen Zellen | 34 |
| Tabelle 6: | Chemikalien und Substanzen für zellbiologische Arbeiten | 34 |
| Tabelle 7: | Benötigte Puffer und Lösungen für die Zellkultur | 35 |
| Tabelle 8: | Benötigte Geräte für zellbiologische Arbeiten | 35 |
| Tabelle 9: | Benötigte Plastikwaren für zellbiologische Arbeiten | 36 |
| Tabelle 10: | Benötigte Utensilien für zellbiologische Arbeiten | 36 |
| Tabelle 11: | Chemikalien und Substanzen für histologische Arbeiten | 37 |

| | |
|---|----|
| Tabelle 12: Lösungen und Puffer für histologische Arbeiten | 38 |
| Tabelle 13: Verwendete Mikroskope | 38 |
| Tabelle 14: Benötigte Geräte für histologische Arbeiten | 39 |
| Tabelle 15: Benötigtes Zubehör für histologische Arbeiten | 39 |
| Tabelle 16: Primärantikörper für immunhistologische Färbungen | 40 |
| Tabelle 17: Sekundärantikörper für immunhistologische Färbungen | 40 |
| Tabelle 18: Benötigte Substanzen und Kit zum Nachweis von Apoptose im Gewebe ... | 41 |
| Tabelle 19: Eindeckmedien für histologische Präparate..... | 41 |
| Tabelle 20: Kit zum quantitativen Nachweis von Apoptose in kultivierten Zellen | 41 |
| Tabelle 21: Proteinmarker | 41 |
| Tabelle 22: Primär- und Sekundärantikörper zum Nachweis von Proteinen auf einer Nitrocellulosemembran | 42 |
| Tabelle 23: Benötigte Geräte für biochemische Arbeiten | 42 |
| Tabelle 24: Benötigtes Zubehör für biochemische Arbeiten | 43 |
| Tabelle 25: Chemikalien und Substanzen für biochemische Arbeiten..... | 43 |
| Tabelle 26: Puffer und Lösungen für biochemische Arbeiten | 44 |
| Tabelle 27: Subkultivierung von Melanomzelllinien. Zellen wurden bei einer Konfluenz von ca. 80 % bzw. nach entsprechender Kultivierungsdauer passagiert. | 46 |
| Tabelle 28: Aussaat von Melanomzelllinien bzw. primären Hautzellen in 3,5 cm Petrischalen zur Stimulation bei einer Konfluenz von ca. 80 %..... | 52 |
| Tabelle 29: Zur Herstellung organotypischer Hautmodelle verwendete Zellen und ihre benötigte Zellzahl..... | 57 |
| Tabelle 30: Entfernung des Fixans und Einbettung von Hautmodellen in Paraffin mittels Einbettautomat (Shandon, Citadel 1000, Programm A) | 61 |
| Tabelle 31: Deparaffinierung, Hämatoxylin-Eosin-Färbung und Eindecken von Hautmodellen..... | 64 |
| Tabelle 32: Deparaffinierung und Hitzedemaskierung von Schnittpräparaten für folgende immunhistochemische Färbungen | 65 |
| Tabelle 33: Gegenfärbung immunhistochemisch gefärbter Schnitte mit Mayers Hämalaun..... | 66 |
| Tabelle 34: Benötigte Substanzen und deren Volumina für die Herstellung des Sammelgels für die SDS-PAGE..... | 72 |
| Tabelle 35: Benötigte Substanzen und deren Volumina für die Herstellung von Trenngelen mit unterschiedlichen Polyacrylamidkonzentrationen für die SDS-PAGE..... | 72 |

Literaturverzeichnis

- [1] W. Sterry et al., "Kurzlehrbuch Dermatologie." Thieme Verlag, Stuttgart 2011.
- [2] N. Boulais and L. Misery, "The epidermis: a sensory tissue." *European journal of dermatology : EJD*, vol. 18, no. 2, pp. 119-27, 2008.
- [3] I. Moll, "Duale Reihe Dermatologie." 7th ed. Thieme Verlag, Stuttgart 2010.
- [4] F. O. Nestle, P. Di Meglio, J.-Z. Qin, and B. J. Nickoloff, "Skin immune sentinels in health and disease." *Nature reviews. Immunology*, vol. 9, no. 10, pp. 679-91, Oct. 2009.
- [5] S. Böttcher-Haberzeth, T. Biedermann, and E. Reichmann, "Tissue engineering of skin." *Burns*, vol. 36, no. 4, pp. 450-60, Jun. 2010.
- [6] J. Kanitakis, "Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin." *European journal of dermatology : EJD*, vol. 12, no. 4, pp. 390-9; quiz 400-1, 2002.
- [7] C. L. Simpson, D. M. Patel, and K. J. Green, "Deconstructing the skin: cytoarchitectural determinants of epidermal morphogenesis." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 12, no. 9, pp. 565-580, Aug. 2011.
- [8] P. Fritsch, *Dermatologie, Venerologie: Grundlagen, Klinik, Atlas*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2004, p. 1101.
- [9] C. Pincelli and A. Marconi, "Keratinocyte stem cells: friends and foes." *Journal of cellular physiology*, vol. 225, no. 2, pp. 310-5, Nov. 2010.
- [10] A. Schreder, G. E. Pierard, P. Paquet, M.A. Reginster, C. Pierard-Franchimont, and P. Quatresooz, "Facing towards epidermal stem cells." *International Journal of Molecular Medicine*, pp. 171-174, 2010.
- [11] C. Blanpain and E. Fuchs, "Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin." *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 10, no. 3, pp. 207-17, Mar. 2009.
- [12] E. Candi, R. Schmidt, and G. Melino, "The cornified envelope: a model of cell death in the skin." *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 6, no. 4, pp. 328-40, Apr. 2005.
- [13] L. N. Marekov, P.M. Steinert, "Ceramides Are Bound to Structural Proteins of the Human Foreskin Epidermal Cornified Cell Envelope." *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 28, pp. 17763-17770, Jul. 1998.
- [14] M. Mao-Qiang, P. M. Elias, and K. R. Feingold, "Fatty acids are required for epidermal permeability barrier function." *The Journal of clinical investigation*, vol. 92, no. 2, pp. 791-8, Aug. 1993.
- [15] E. Proksch, J. M. Brandner, and J.M. Jensen, "The skin: an indispensable barrier." *Experimental Dermatology*, vol. 17, no. 12, pp. 1063-1072, Dec. 2008.

- [16] A. Sandilands, C. Sutherland, A. D. Irvine, and W. H. I. McLean, "Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease." *Journal of cell science*, vol. 122, no. 9, pp. 1285-94, May 2009.
- [17] E. Hoste et al., "Caspase-14 is required for filaggrin degradation to natural moisturizing factors in the skin." *The Journal of investigative dermatology*, vol. 131, no. 11, pp. 2233-41, Nov. 2011.
- [18] G. Denecker et al., "Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss." *Nature cell biology*, vol. 9, no. 6, pp. 666-74, Jun. 2007.
- [19] A. V. Rawlings and C. R. Harding, "Moisturization and skin barrier function." *Dermatologic therapy*, vol. 17 Suppl 1, pp. 43-8, Jan. 2004.
- [20] D. Breitkreutz, N. Mirancea, and R. Nischt, "Basement membranes in skin: unique matrix structures with diverse functions?" *Histochemistry and cell biology*, vol. 132, no. 1, pp. 1-10, Jul. 2009.
- [21] D. Villone, A. Fritsch, M. Koch, L. Bruckner-Tuderman, U. Hansen, and P. Bruckner, "Supramolecular interactions in the dermo-epidermal junction zone: anchoring fibril-collagen VII tightly binds to banded collagen fibrils." *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 36, pp. 24506-13, Sep. 2008.
- [22] M. Chen et al., "Interactions of the amino-terminal noncollagenous (NC1) domain of type VII collagen with extracellular matrix components. A potential role in epidermal-dermal adherence in human skin." *The Journal of biological chemistry*, vol. 272, no. 23, pp. 14516-22, Jun. 1997.
- [23] J. R. McMillan, M. Akiyama, and H. Shimizu, "Epidermal basement membrane zone components: ultrastructural distribution and molecular interactions." *Journal of dermatological science*, vol. 31, no. 3, pp. 169-77, May 2003.
- [24] B. Eckes, R. Nischt, and T. Krieg, "Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring." *Fibrogenesis & tissue repair*, vol. 3, no. 1, p. 4, Jan. 2010.
- [25] J.Y. Jung, J.H. Oh, Y. K. Kim, M. H. Shin, D. Lee, and J. H. Chung, "Acute UV Irradiation Increases Heparan Sulfate Proteoglycan Levels in Human Skin." *Journal of Korean medical science*, vol. 27, no. 3, pp. 300-6, Mar. 2012.
- [26] J. M. Sorrell and A. I. Caplan, "Fibroblast heterogeneity: more than skin deep." *Journal of cell science*, vol. 117, no. 5, pp. 667-75, Feb. 2004.
- [27] J. M. Sorrell and A. I. Caplan, "Fibroblasts a diverse population at the center of it all." *International review of cell and molecular biology*, vol. 276, pp. 161-214, Jan. 2009.
- [28] L. C. Junqueira, G. S. Montes, J. E. Martins, and P. P. Joazeiro, "Dermal collagen distribution. A histochemical and ultrastructural study." *Histochemistry*, vol. 79, no. 3, pp. 397-403, Sep. 1983.
- [29] J. Bennett and P. Hall, "Moles and melanoma : a history." *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, pp. 373-380, 1994.
- [30] A. J. Miller and M. C. Mihm, "Melanoma." *The New England journal of medicine*, vol. 355, no. 1, pp. 51-65, Jul. 2006.

- [31] C. Garbe et al., "Diagnosis and treatment of melanoma: European consensus-based interdisciplinary guideline." *European journal of cancer*, vol. 46, no. 2, pp. 270-83, Jan. 2010.
- [32] A.V. Gibling and J. M. Thomas, "Incidence, mortality and survival in cutaneous melanoma." *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery*, vol. 60, no. 1, pp. 32-40, Jan. 2007.
- [33] G.Husmann et al, *Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends.*, 7. Auflage, Robert Koch-Institut; Berlin 2010.
- [34] D. S. Rigel, J. Russak, and R. Friedman, "The evolution of melanoma diagnosis: 25 years beyond the ABCDs." *CA: a cancer journal for clinicians*, vol. 60, no. 5, pp. 301-16.
- [35] V. Bataille and E. de Vries, "Melanoma--Part 1: epidemiology, risk factors, and prevention." *BMJ (Clinical research ed.)*, vol. 337, p. a2249, Jan. 2008.
- [36] B. Bressac-de-Paillerets, M.F. Avril, A. Chompret and F. Demenais, "Genetic and environmental factors in cutaneous malignant melanoma." *Biochimie*, vol. 84, no. 1, pp. 67-74, Jan. 2002.
- [37] Z. A. Abdel-Malek, A. L. Kadekaro, and V. B. Swope, "Stepping up melanocytes to the challenge of UV exposure." *Pigment cell & melanoma research*, vol. 23, no. 2, pp. 171-86, Apr. 2010.
- [38] V. O. Melnikova and H. N. Ananthaswamy, "Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer." *Mutation research*, vol. 571, no. 1-2, pp. 91-106, Apr. 2005.
- [39] D. L. Narayanan, R. N. Saladi, and J. L. Fox, "Review: Ultraviolet radiation and skin cancer" *International Journal of Dermatology*, vol. 49, no. 9, pp. 978-986, Aug. 2010.
- [40] W. H. Clark, D. E. Elder, D. Guerry, M. N. Epstein, M. H. Greene and M. Van Horn, "A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma." *Human pathology*, vol. 15, no. 12, pp. 1147-65, Dec. 1984.
- [41] F. Meier et al., "Molecular events in melanoma development and progression." *Frontiers in bioscience*, vol. 3, pp. D1005-10, Sep. 1998.
- [42] W. H. Clark, "Human cutaneous malignant melanoma as a model for cancer." *Cancer metastasis reviews*, vol. 10, no. 2, pp. 83-8, Jun. 1991.
- [43] D. E. Elder, "Dysplastic naevi: an update." *Histopathology*, vol. 56, no. 1, pp. 112-20, Jan. 2010.
- [44] M.Y. Hsu, F. Meier, and M. Herlyn, "Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host." *Differentiation*, vol. 70, no. 9-10, pp. 522-36, Dec. 2002.
- [45] C. Bevona, W. Goggins, T. Quinn, J. Fullerton and H. Tsao, "Cutaneous melanomas associated with nevi." *Archives of dermatology*, vol. 139, no. 12, pp. 1620-4; discussion 1624, Dec. 2003.

- [46] S. E. Zabierowski and M. Herlyn, "Melanoma stem cells: the dark seed of melanoma." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 26, no. 17, pp. 2890-4, Jun. 2008.
- [47] N. K. Haass and M. Herlyn, "Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma." *The journal of investigative dermatology.*, vol. 10, no. 2, pp. 153-63, Nov. 2005.
- [48] S. Cooper, "The First Lines of the Theory And Practice of Surgery, Seventh Edition." pp. 360-363, 1840.
- [49] K. C. Kähler, F. Egberts, and A. Hauschild, "Current aspects of adjuvant therapy of malignant melanoma." *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete*, vol. 61, no. 6, pp. 523-31; quiz 532-3, Jun. 2010.
- [50] G. C. Jradi Zeinab, Eigentler Thomas Kurt, "Adjuvante Therapie des malignen Melanoms." *Arzneimitteltherapie*, vol. 2, pp. 46-52, 2012.
- [51] R. N. Amaria, K. D. Lewis, and R. Gonzalez, "Therapeutic options in cutaneous melanoma: latest developments." *Therapeutic advances in medical oncology*, vol. 3, no. 5, pp. 245-51, Sep. 2011.
- [52] S. Bhatia, S. S. Tykodi, and J. A. Thompson, "Treatment of metastatic melanoma: an overview." *Oncology*, vol. 23, no. 6, pp. 488-96, May 2009.
- [53] P. B. Chapman et al., "Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma." *Journal of clinical oncology*, vol. 17, no. 9, pp. 2745-51, Sep. 1999.
- [54] J. Tsai et al., "Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 8, pp. 3041-6, Feb. 2008.
- [55] K. S. Peggs, S. A. Quezada, A. J. Korman, and J. P. Allison, "Principles and use of anti-CTLA4 antibody in human cancer immunotherapy." *Current opinion in immunology*, vol. 18, no. 2, pp. 206-13, Apr. 2006.
- [56] F. S. Hodi et al., "Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma." *The New England journal of medicine*, vol. 363, no. 8, pp. 711-23, Aug. 2010.
- [57] C. Robert et al., "Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma." *The New England journal of medicine*, vol. 364, no. 26, pp. 2517-26, Jun. 2011.
- [58] P. B. Chapman et al., "Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation." *The New England journal of medicine*, vol. 364, no. 26, pp. 2507-16, Jun. 2011.
- [59] B. P. Lucey, W. A. Nelson-Rees, G. M. Hutchins, and H. Lacks, "Henrietta Lacks , HeLa Cells , and Cell Culture Contamination," *Archives of Pathology*, 1951.
- [60] E. H. Flach, V. W. Rebecca, M. Herlyn, K. S. M. Smalley, and A. R. A. Anderson, "Fibroblasts contribute to melanoma tumor growth and drug resistance." *Molecular pharmaceutics*, vol. 8, no. 6, pp. 2039-49, Dec. 2011.

- [61] A. Abbott, "Cell culture: biology's new dimension." *Nature*, vol. 424, no. 6951, pp. 870-2, Aug. 2003.
- [62] F. Pampaloni, E. G. Reynaud, and E. H. K. Stelzer, "The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue." *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 8, no. 10, pp. 839-45, Oct. 2007.
- [63] J. B. Kim, "Three-dimensional tissue culture models in cancer biology." *Seminars in cancer biology*, vol. 15, no. 5, pp. 365-77, Oct. 2005.
- [64] F. van Zijl and W. Mikulits, "Hepatospheres: Three dimensional cell cultures resemble physiological conditions of the liver." *World journal of hepatology*, vol. 2, no. 1, pp. 1-7, Jan. 2010.
- [65] L. A. Kunz-Schughart, J. P. Freyer, F. Hofstaedter, and R. Ebner, "The use of 3-D cultures for high-throughput screening: the multicellular spheroid model." *Journal of biomolecular screening*, vol. 9, no. 4, pp. 273-85, Jun. 2004.
- [66] R. M. Sutherland, "Cell and environment interactions in tumor microregions: the multicellular spheroid model." *Society*, 1988.
- [67] R. M. Sutherland, J. A. McCredie, and W. R. Inch, "Growth of multicell spheroids in tissue culture as a model of nodular carcinomas." *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 46, no. 1, pp. 113-20, Jan. 1971.
- [68] W. Mueller-Klieser, "Three-dimensional cell cultures: from molecular mechanisms to clinical applications." *The American journal of physiology*, vol. 273, no. 4 Pt 1, pp. C1109-23, Oct. 1997.
- [69] F. Hirschhaeuser, H. Menne, C. Dittfeld, J. West, W. Mueller-Klieser, and L.A. Kunz-Schughart, "Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again." *Journal of biotechnology*, vol. 148, no. 1, pp. 3-15, Jul. 2010.
- [70] C. D. Davies, H. Müller, I. Hagen, M. Gårseth, and M. H. Hjelstuen, "Comparison of extracellular matrix in human osteosarcomas and melanomas growing as xenografts, multicellular spheroids, and monolayer cultures." *Anticancer research*, vol. 17, no. 6, pp. 4317-26, 1997.
- [71] B. Glimelius, B. Norling, T. Nederman, and J. Carlsson, "Extracellular matrices in multicellular spheroids of human glioma origin: increased incorporation of proteoglycans and fibronectin as compared to monolayer cultures." *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*, vol. 96, no. 5, pp. 433-44, May 1988.
- [72] T. Nederman, B. Norling, and B. Glimelius, "Demonstration of an Extracellular Matrix in Multicellular Tumor Spheroids." *Cancer Research*, pp. 3090-3097, 1984.
- [73] J. C. Angello and H. L. Hosick, "Glycosaminoglycan synthesis by mammary tumor spheroids." *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 107, no. 3, pp. 1130-7, Aug. 1982.
- [74] T. T. Chang and M. Hughes-Fulford, "Monolayer and spheroid culture of human liver hepatocellular carcinoma cell line cells demonstrate distinct global gene expression patterns and functional phenotypes." *Tissue engineering. Part A*, vol. 15, no. 3, pp. 559-67, Mar. 2009.

- [75] P. C. De Witt Hamer et al., "The genomic profile of human malignant glioma is altered early in primary cell culture and preserved in spheroids." *Oncogene*, vol. 27, no. 14, pp. 2091-6, Mar. 2008.
- [76] L. Gaedtke, L. Thoenes, C. Culmsee, B. Mayer, and E. Wagner, "Proteomic analysis reveals differences in protein expression in spheroid versus monolayer cultures of low-passage colon carcinoma cells." *Journal of proteome research*, vol. 6, no. 11, pp. 4111-8, Nov. 2007.
- [77] M. T. Santini and G. Rainaldi, "Three-dimensional spheroid model in tumor biology." *Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, vol. 67, no. 3, pp. 148-57, 1999.
- [78] W. Mueller-Klieser, "Multicellular spheroids. A review on cellular aggregates in cancer research." *Journal of cancer research and clinical oncology*, vol. 113, no. 2, pp. 101-22, Jan. 1987.
- [79] R.Z. Lin, R.Z. Lin, and H.Y. Chang, "Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research." *Biotechnology journal*, vol. 3, no. 9-10, pp. 1172-84, Oct. 2008.
- [80] A. D. Conger and M. C. Ziskin, "Growth of Mammalian Multicellular Tumor Spheroids." *Cancer Research*, pp. 556-560, 1983.
- [81] A.K. Laird, "DYNAMICS OF TUMOR GROWTH." *British journal of cancer*, pp. 490-502, 1964.
- [82] F. Groeber, M. Holeiter, M. Hampel, S. Hinderer, and K. Schenke-Layland, "Skin tissue engineering--in vivo and in vitro applications." *Clinics in plastic surgery*, vol. 39, no. 1, pp. 33-58, Jan. 2012.
- [83] S. MacNeil, "Progress and opportunities for tissue-engineered skin." *Nature*, vol. 445, no. 7130, pp. 874-80, Feb. 2007.
- [84] T. Walles, M. Weimer, K. Linke, J. Michaelis, and H. Mertsching, "The potential of bioartificial tissues in oncology research and treatment." *Onkologie*, vol. 30, no. 7, pp. 388-94, Jul. 2007.
- [85] T. Welss, D. A. Basketter, and K. R. Schröder, "In vitro skin irritation: facts and future. State of the art review of mechanisms and models." *Toxicology in vitro: an international journal published in association with BIBRA*, vol. 18, no. 3, pp. 231-43, Jun. 2004.
- [86] M. K. Robinson, C. Cohen, A. d. B. de Fraissinette, M. Ponec, E. Whittle, and J. H. Fentem, "Non-animal testing strategies for assessment of the skin corrosion and skin irritation potential of ingredients and finished products." *Food and Chemical Toxicology*, vol. 40, no. 5, pp. 573-592, May 2002.
- [87] K. Ackermann, S. L. Borgia, H. C. Korting, K. R. Mewes, and M. Schäfer-Korting, "The Phenion full-thickness skin model for percutaneous absorption testing." *Skin pharmacology and physiology*, vol. 23, no. 2, pp. 105-12, Jan. 2010.
- [88] S. Gabbanini, E. Lucchi, M. Carli, E. Berliani, A. Minghetti, and L. Valgimigli, "In vitro evaluation of the permeation through reconstructed human epidermis of essential oils from cosmetic formulations." *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, vol. 50, no. 3, pp. 370-6, Oct. 2009.

- [89] F. Netzlaff, C.-M. Lehr, P. W. Wertz, and U. F. Schaefer, "The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport." *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceutics*, vol. 60, no. 2, pp. 167-78, Jul. 2005.
- [90] C. Grindon and R. Combes, "Introduction to the EU REACH legislation." *Alternatives to laboratory animals : ATLA*, vol. 36 Suppl 1, pp. 1-6, Oct. 2008.
- [91] J. C. Becker, R. Houben, D. Schrama, H. Voigt, S. Ugurel, and R. A. Reisfeld, "Mouse models for melanoma: a personal perspective." *Experimental dermatology*, vol. 19, no. 2, pp. 157-64, Feb. 2010.
- [92] L. Li, M. Fukunaga-Kalabis, and M. Herlyn, "The three-dimensional human skin reconstruct model: a tool to study normal skin and melanoma progression." *Journal of visualized experiments : JoVE*, no. 54, Jan. 2011.
- [93] C. A. Brohem, L. B. da S. Cardeal, M. Tiago, M. S. Soengas, S. B. de M. Barros, and S. S. Maria-Engler, "Artificial skin in perspective: concepts and applications." *Pigment cell & melanoma research*, vol. 24, no. 1, pp. 35-50, Feb. 2011.
- [94] K. S. M. Smalley, M. Lioni, and M. Herlyn, "Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension." *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, vol. 42, no. 8-9, pp. 242-7, 2006.
- [95] M. Pauwels and V. Rogiers, "Safety evaluation of cosmetics in the EU. Reality and challenges for the toxicologist." *Toxicology letters*, vol. 151, no. 1, pp. 7-17, Jun. 2004.
- [96] A. El Ghalbzouri, E. Lamme, and M. Ponc, "Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis." *Cell and tissue research*, vol. 310, no. 2, pp. 189-99, Nov. 2002.
- [97] A. El-Ghalbzouri, S. Gibbs, E. Lamme, C. A. Van Blitterswijk, and M. Ponc, "Effect of fibroblasts on epidermal regeneration." *The British journal of dermatology*, vol. 147, no. 2, pp. 230-43, Aug. 2002.
- [98] H.J. Stark, A. Szabowski, N. E. Fusenig, and N. Maas-Szabowski, "Organotypic cocultures as skin equivalents: A complex and sophisticated in vitro system." *Biological procedures online*, vol. 6, pp. 55-60, Jan. 2004.
- [99] K. Boehnke, N. Mirancea, A. Pavesio, N. E. Fusenig, P. Boukamp, and H.J. Stark, "Effects of fibroblasts and microenvironment on epidermal regeneration and tissue function in long-term skin equivalents." *European journal of cell biology*, vol. 86, no. 11-12, pp. 731-46, Dec. 2007.
- [100] S. Muffler et al., "A stable niche supports long-term maintenance of human epidermal stem cells in organotypic cultures." *Stem cells (Dayton, Ohio)*, vol. 26, no. 10, pp. 2506-15, Oct. 2008.
- [101] G. Andrei, S. Duraffour, J. Van den Oord, and R. Snoeck, "Epithelial raft cultures for investigations of virus growth, pathogenesis and efficacy of antiviral agents." *Antiviral research*, vol. 85, no. 3, pp. 431-49, Mar. 2010.

- [102] V. Facy, V. Flouret, M. Régnier, and R. Schmidt, "Reactivity of Langerhans cells in human reconstructed epidermis to known allergens and UV radiation." *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*, vol. 19, no. 6, pp. 787-95, Sep. 2005.
- [103] J. Garlick, "*Engineering Skin to Study Human Disease - Tissue Models for Cancer.*" *Biology and Wound Repair*, vol. 103. Springer Berlin Heidelberg, 2007, pp. 207-239.
- [104] C. Egles, J. A. Garlick, and Y. Shamis, "Three-dimensional human tissue models of wounded skin." *Methods in molecular biology*, vol. 585, pp. 345-59, Jan. 2010.
- [105] V. Falanga et al., "Wounding of bioengineered skin: cellular and molecular aspects after injury." *The Journal of investigative dermatology*, vol. 119, no. 3, pp. 653-60, Sep. 2002.
- [106] F. Bernerd and D. Asselineau, "UVA exposure of human skin reconstructed in vitro induces apoptosis of dermal fibroblasts: subsequent connective tissue repair and implications in photoaging." *Cell death and differentiation*, vol. 5, no. 9, pp. 792-802, Sep. 1998.
- [107] F. Bernerd and D. Asselineau, "An organotypic model of skin to study photodamage and photoprotection in vitro." *Journal of the American Academy of Dermatology*, vol. 58, no. 5 Suppl 2, pp. S155-9, May 2008.
- [108] F. Berthod, L. Germain, N. Tremblay, and F. A. Auger, "Extracellular matrix deposition by fibroblasts is necessary to promote capillary-like tube formation in vitro." *Journal of cellular physiology*, vol. 207, no. 2, pp. 491-8, May 2006.
- [109] V. Hudon, F. Berthod, A. F. Black, O. Damour, L. Germain, and F. A. Auger, "A tissue-engineered endothelialized dermis to study the modulation of angiogenic and angiostatic molecules on capillary-like tube formation in vitro." *The British journal of dermatology*, vol. 148, no. 6, pp. 1094-104, Jun. 2003.
- [110] M.-H. Rochon et al., "Normal human epithelial cells regulate the size and morphology of tissue-engineered capillaries." *Tissue engineering. Part A*, vol. 16, no. 5, pp. 1457-68, May 2010.
- [111] P. Saiag, B. Coulomb, C. Lebreton, E. Bell, and L. Dubertret, "Psoriatic fibroblasts induce hyperproliferation of normal keratinocytes in a skin equivalent model in vitro." *Science (New York, N.Y.)*, vol. 230, no. 4726, pp. 669-72, Nov. 1985.
- [112] G. Tjabringa, M. Bergers, D. van Rens, R. de Boer, E. Lamme, and J. Schalkwijk, "Development and validation of human psoriatic skin equivalents." *The American journal of pathology*, vol. 173, no. 3, pp. 815-23, Sep. 2008.
- [113] C. L. Barker et al., "The development and characterization of an in vitro model of psoriasis." *The Journal of investigative dermatology*, vol. 123, no. 5, pp. 892-901, Nov. 2004.
- [114] F. Meier et al., "Human melanoma progression in skin reconstructs : biological significance of bFGF." *The American journal of pathology*, vol. 156, no. 1, pp. 193-200, Jan. 2000.

- [115] S. K. Dekker, R. van Doorn, J. Kempenaar, N. A. Gruis, B. J. Vermeer, and M. Ponc, "Skin equivalent: an attractive model to evaluate early melanoma metastasis." *Melanoma research*, vol. 10, no. 2, pp. 127-40, Apr. 2000.
- [116] N. Bechetoille, M. Haftek, M. J. Staquet, A. J. Cochran, D. Schmitt, and O. Berthier-Vergnes, "Penetration of human metastatic melanoma cells through an authentic dermal-epidermal junction is associated with dissolution of native collagen types IV and VII." *Melanoma research*, vol. 10, no. 5, pp. 427-34, Oct. 2000.
- [117] C. Berking and M. Herlyn, "Human skin reconstruct models: a new application for studies of melanocyte and melanoma biology." *Histology and histopathology*, vol. 16, no. 2, pp. 669-74, Apr. 2001.
- [118] J. F. Kerr, A. H. Wyllie, and A. R. Currie, "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." *British journal of cancer*, vol. 26, no. 4, pp. 239-57, Aug. 1972.
- [119] S. Elmore, "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicologic pathology*, vol. 35, no. 4, pp. 495-516, Jun. 2007.
- [120] E. Ulukaya, C. Acilan, and Y. Yilmaz, "Apoptosis: why and how does it occur in biology?" *Cell biochemistry and function*, vol. 29, no. 6, pp. 468-80, Aug. 2011.
- [121] K. R. Molhoek, D. L. Brautigan, and C. L. Slingluff, "Synergistic inhibition of human melanoma proliferation by combination treatment with B-Raf inhibitor BAY43-9006 and mTOR inhibitor Rapamycin." *Journal of translational medicine*, vol. 3, p. 39, Oct. 2005.
- [122] K. S. Smalley, N. K. Haass, P.A. Brafford, M. Lioni, K. T. Flaherty, and M. Herlyn, "Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases." *Molecular cancer therapeutics*, vol. 5, no. 5, pp. 1136-44, May 2006.
- [123] F. Meier et al., "Combined targeting of MAPK and AKT signalling pathways is a promising strategy for melanoma treatment." *The British journal of dermatology*, vol. 156, no. 6, pp. 1204-13, Jun. 2007.
- [124] H. Niessner et al., "The farnesyl transferase inhibitor lonafarnib inhibits mTOR signaling and enforces sorafenib-induced apoptosis in melanoma cells." *The Journal of investigative dermatology*, vol. 131, no. 2, pp. 468-79, Feb. 2011.
- [125] T. Sinnberg et al., "Inhibition of PI3K-AKT-mTOR signaling sensitizes melanoma cells to cisplatin and temozolomide." *The Journal of investigative dermatology*, vol. 129, no. 6, pp. 1500-15, Jun. 2009.
- [126] R. M. Pitti, S. A. Marsters, S. Ruppert, C. J. Donahue, A. Moore, and A. Ashkenazi, "Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family." *The Journal of biological chemistry*, vol. 271, no. 22, pp. 12687-90, May 1996.
- [127] S. R. Wiley et al., "Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis." *Immunity*, vol. 3, no. 6, pp. 673-82, Dec. 1995.
- [128] T. Newsom-Davis, S. Prieske, and H. Walczak, "Is TRAIL the holy grail of cancer therapy?" *Apoptosis*, vol. 14, no. 4, pp. 607-23, Apr. 2009.

- [129] J. Gerspach, K. Pfizenmaier, and H. Wajant, "Therapeutic targeting of CD95 and the TRAIL death receptors." *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, vol. 6, no. 3, pp. 294-310, Sep. 2011.
- [130] C. Falschlehner, U. Schaefer, and H. Walczak, "Following TRAIL's path in the immune system." *Immunology*, vol. 127, no. 2, pp. 145-54, Jun. 2009.
- [131] A. Ashkenazi et al., "Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand." *The Journal of clinical investigation*, vol. 104, no. 2, pp. 155-62, Jul. 1999.
- [132] H. Walczak et al., "Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo." *Nature medicine*, vol. 5, no. 2, pp. 157-63, Feb. 1999.
- [133] G. J. Atkins et al., "Human osteoblasts are resistant to Apo2L/TRAIL-mediated apoptosis." *Bone*, vol. 31, no. 4, pp. 448-56, Oct. 2002.
- [134] B. Bonavida, C. P. Ng, A. Jazirehi, G. Schiller, and Y. Mizutani, "Selectivity of TRAIL-mediated apoptosis of cancer cells and synergy with drugs: the trail to non-toxic cancer therapeutics." *International journal of oncology*, vol. 15, no. 4, pp. 793-802, Oct. 1999.
- [135] F. C. Kischkel et al., "Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor." *The EMBO journal*, vol. 14, no. 22, pp. 5579-88, Nov. 1995.
- [136] A. Ashkenazi and V. M. Dixit, "Death receptors: signaling and modulation." *Science (New York, N.Y.)*, vol. 281, no. 5381, pp. 1305-8, Aug. 1998.
- [137] D. R. Green and J. C. Reed, "Mitochondria and apoptosis." *Science (New York, N.Y.)*, vol. 281, no. 5381, pp. 1309-12, Aug. 1998.
- [138] H. Li, H. Zhu, C. J. Xu, and J. Yuan, "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." *Cell*, vol. 94, no. 4, pp. 491-501, Aug. 1998.
- [139] P. Li et al., "Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade." *Cell*, vol. 91, no. 4, pp. 479-89, Nov. 1997.
- [140] H. Zou, Y. Li, X. Liu, and X. Wang, "An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9." *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 17, pp. 11549-56, Apr. 1999.
- [141] T. Ozaki and A. Nakagawara, "p53: the attractive tumor suppressor in the cancer research field." *Journal of biomedicine & biotechnology*, vol. 2011, p. 603925, Jan. 2011.
- [142] R. Kim, M. Emi, and K. Tanabe, "Role of mitochondria as the gardens of cell death." *Cancer chemotherapy and pharmacology*, vol. 57, no. 5, pp. 545-53, May 2006.
- [143] C. Falschlehner, C. H. Emmerich, B. Gerlach, and H. Walczak, "TRAIL signalling: decisions between life and death." *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 39, no. 7-8, pp. 1462-75, Jan. 2007.

- [144] T. S. Griffith and D. H. Lynch, "TRAIL: a molecule with multiple receptors and control mechanisms." *Current opinion in immunology*, vol. 10, no. 5, pp. 559-63, Oct. 1998.
- [145] R. Koschny, H. Walczak, and T. M. Ganten, "The promise of TRAIL--potential and risks of a novel anticancer therapy." *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*, vol. 85, no. 9, pp. 923-35, Sep. 2007.
- [146] K. Papenfuss, S. Prieske, and H. Walczak, "TRAIL-Rezeptor-Agonisten, eine neue Klasse proapoptotischer Krebstherapeutika." *Onkopipeline*, vol. 3, no. 1, pp. 11-23, Mar. 2010.
- [147] L. Zhang and B. Fang, "Mechanisms of resistance to TRAIL-induced apoptosis in cancer." *Cancer gene therapy*, vol. 12, no. 3, pp. 228-37, Mar. 2005.
- [148] A. Krueger, S. Baumann, P. H. Krammer, and S. Kirchhoff, "FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis." *Molecular and cellular biology*, vol. 21, no. 24, pp. 8247-54, Dec. 2001.
- [149] N. Roy, Q. L. Deveraux, R. Takahashi, G. S. Salvesen, and J. C. Reed, "The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspases." *The EMBO journal*, vol. 16, no. 23, pp. 6914-25, Dec. 1997.
- [150] E. N. Shiozaki et al., "Mechanism of XIAP-mediated inhibition of caspase-9." *Molecular cell*, vol. 11, no. 2, pp. 519-27, Mar. 2003.
- [151] F. L. Scott, J.B. Denault, S. J. Riedl, H. Shin, M. Renatus, and G. S. Salvesen, "XIAP inhibits caspase-3 and -7 using two binding sites: evolutionarily conserved mechanism of IAPs." *The EMBO journal*, vol. 24, no. 3, pp. 645-55, Feb. 2005.
- [152] B. Leibowitz and J. Yu, "Mitochondrial signaling in cell death via the Bcl-2 family." *Cancer biology & therapy*, vol. 9, no. 6, pp. 417-22, Mar. 2010.
- [153] M. S. Ola, M. Nawaz, and H. Ahsan, "Role of Bcl-2 family proteins and caspases in the regulation of apoptosis." *Molecular and cellular biochemistry*, vol. 351, no. 1-2, pp. 41-58, May 2011.
- [154] J. G. Clohessy, J. Zhuang, J. de Boer, G. Gil-Gómez, and H. J. M. Brady, "Mcl-1 interacts with truncated Bid and inhibits its induction of cytochrome c release and its role in receptor-mediated apoptosis." *The Journal of biological chemistry*, vol. 281, no. 9, pp. 5750-9, Mar. 2006.
- [155] M. A. Degli-Esposti, W. C. Dougall, P. J. Smolak, J. Y. Waugh, C. A. Smith, and R. G. Goodwin, "The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain." *Immunity*, vol. 7, no. 6, pp. 813-20, Dec. 1997.
- [156] M. E. Guicciardi and G. J. Gores, "Life and death by death receptors." *FASEB journal*, vol. 23, no. 6, pp. 1625-37, Jun. 2009.
- [157] S. Shirley, A. Morizot, and O. Micheau, "Regulating TRAIL receptor-induced cell death at the membrane : a deadly discussion." *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, vol. 6, no. 3, pp. 311-23, Sep. 2011.

- [158] D. Mahalingam, E. Szegezdi, M. Keane, S. de Jong, and A. Samali, "TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL?" *Cancer treatment reviews*, vol. 35, no. 3, pp. 280-8, May 2009.
- [159] Z. Mahmood and Y. Shukla, "Death receptors: targets for cancer therapy." *Experimental cell research*, vol. 316, no. 6, pp. 887-99, Apr. 2010.
- [160] T. J. Sayers, "Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy." *Cancer immunology, immunotherapy : CII*, vol. 60, no. 8, pp. 1173-80, Aug. 2011.
- [161] B. Thayaparasingham, A. Kunz, N. Peters, and D. Kulms, "Sensitization of melanoma cells to TRAIL by UVB-induced and NF-kappaB-mediated downregulation of XIAP." *Oncogene*, vol. 28, no. 3, pp. 345-62, Jan. 2009.
- [162] M. Hörnle, N. Peters, B. Thayaparasingham, H. Vörsmann, H. Kashkar, and D. Kulms, "Caspase-3 cleaves XIAP in a positive feedback loop to sensitize melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis." *Oncogene*, vol. 30, no. 5, pp. 575-87, Feb. 2011.
- [163] C. S. Chen, R. M. Lavker, U. Rodeck, B. Risse, and P. J. Jensen, "Use of a serum-free epidermal culture model to show deleterious effects of epidermal growth factor on morphogenesis and differentiation." *The Journal of investigative dermatology*, vol. 104, no. 1, pp. 107-12, Jan. 1995.
- [164] K. Satyamoorthy, F. Meier, M. Y. Hsu, C. Berking, and M. Herlyn, "Human xenografts, human skin and skin reconstructs for studies in melanoma development and progression." *Cancer metastasis reviews*, vol. 18, no. 3, pp. 401-5, Jan. 1999.
- [165] G. M. Keller, "In vitro differentiation of embryonic stem cells." *Current opinion in cell biology*, vol. 7, no. 6, pp. 862-9, Dec. 1995.
- [166] A. Godwin, "Histochemical Uses Of Haematoxylin - A Review." *JPCS*, vol. 1, no. June, pp. 24-34, 2011.
- [167] Y. Gavrieli, Y. Sherman, and S. A. Ben-Sasson, "Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation." *The Journal of cell biology*, vol. 119, no. 3, pp. 493-501, Nov. 1992.
- [168] A. R. Spurr, "A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy." *Journal of ultrastructure research*, vol. 26, no. 1, pp. 31-43, Jan. 1969.
- [169] E. S. REYNOLDS, "The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy." *The Journal of cell biology*, vol. 17, pp. 208-12, Apr. 1963.
- [170] U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*, vol. 227, no. 5259, pp. 680-5, Aug. 1970.
- [171] M. L. Marino et al., "Proton pump inhibition induces autophagy as a survival mechanism following oxidative stress in human melanoma cells." *Cell death & disease*, vol. 1, p. e87, Jan. 2010.

- [172] X.-H. Ma et al., "Measurements of tumor cell autophagy predict invasiveness, resistance to chemotherapy, and survival in melanoma." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 17, no. 10, pp. 3478-89, May 2011.
- [173] S. Romano et al., "Role of FK506-binding protein 51 in the control of apoptosis of irradiated melanoma cells." *Cell Death and Differentiation*, vol. 17, no. 1, pp. 145-157, Aug. 2009.
- [174] A. Roesch, A. M. Mueller, T. Stempfl, C. Moehle, M. Landthaler, and T. Vogt, "RBP2-H1/JARID1B is a transcriptional regulator with a tumor suppressive potential in melanoma cells." *International journal of cancer.*, vol. 122, no. 5, pp. 1047-57, Mar. 2008.
- [175] A. Roesch et al., "A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth." *Cell*, vol. 141, no. 4, pp. 583-94, May 2010.
- [176] N. Y. Frank et al., "ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma." *Cancer research*, vol. 65, no. 10, pp. 4320-33, May 2005.
- [177] C. Lemech, J. Infante, and H.T. Arkenau, "The potential for BRAF V600 inhibitors in advanced cutaneous melanoma: rationale and latest evidence." *Therapeutic advances in medical oncology*, vol. 4, no. 2, pp. 61-73, Mar. 2012.
- [178] K. Gowrishankar, S. Snoyman, G. M. Pupo, T. M. Becker, R. F. Kefford, and H. Rizos, "Acquired Resistance to BRAF Inhibition Can Confer Cross-Resistance to Combined BRAF/MEK Inhibition." *The Journal of investigative dermatology*, Mar. 2012.
- [179] I. V. Fedorenko, K. H. Paraiso, and K. S. Smalley, "Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma." *Biochemical pharmacology*, vol. 82, no. 3, pp. 201-9, Aug. 2011.
- [180] A. Panner, C. D. James, M. S. Berger, and R. O. Pieper, "mTOR controls FLIPS translation and TRAIL sensitivity in glioblastoma multiforme cells." *Molecular and cellular biology*, vol. 25, no. 20, pp. 8809-23, Oct. 2005.
- [181] K. Clodi et al., "Expression of tumour necrosis factor (TNF)-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptors and sensitivity to TRAIL-induced apoptosis in primary B-cell acute lymphoblastic leukaemia cells." *British journal of haematology*, vol. 111, no. 2, pp. 580-6, Nov. 2000.
- [182] A. Trauzold et al., "TRAIL promotes metastasis of human pancreatic ductal adenocarcinoma." *Oncogene*, vol. 25, no. 56, pp. 7434-9, Nov. 2006.
- [183] T. Nguyen, X. D. Zhang, and P. Hersey, "Relative resistance of fresh isolates of melanoma to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis." *Clinical cancer research*, vol. 7, no. 3, p. 966s-973s, Mar. 2001.
- [184] H. M. Kluger et al., "The X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) is up-regulated in metastatic melanoma, and XIAP cleavage by Phenoxodiol is associated with Carboplatin sensitization." *Journal of translational medicine*, vol. 5, p. 6, Jan. 2007.

- [185] E. Zeise, M. Weichenthal, T. Schwarz, and D. Kulms, "Resistance of human melanoma cells against the death ligand TRAIL is reversed by ultraviolet-B radiation via downregulation of FLIP." *The Journal of investigative dermatology*, vol. 123, no. 4, pp. 746-54, Oct. 2004.
- [186] X. D. Zhang, A. V. Franco, T. Nguyen, C. P. Gray, and P. Hersey, "Differential localization and regulation of death and decoy receptors for TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in human melanoma cells." *Journal of immunology*, vol. 164, no. 8, pp. 3961-70, Apr. 2000.
- [187] D. Lecis et al., "Novel SMAC-mimetics synergistically stimulate melanoma cell death in combination with TRAIL and Bortezomib." *British journal of cancer*, vol. 102, no. 12, pp. 1707-16, Jun. 2010.
- [188] J.Z. Qin et al., "Proteasome inhibitors trigger NOXA-mediated apoptosis in melanoma and myeloma cells." *Cancer research*, vol. 65, no. 14, pp. 6282-93, Jul. 2005.
- [189] J. M. Seeger et al., "The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes melanoma cells toward adoptive CTL attack." *Cancer research*, vol. 70, no. 5, pp. 1825-34, Mar. 2010.
- [190] M. A. Shahshahan, M. N. Beckley, and A. R. Jazirehi, "Potential usage of proteasome inhibitor bortezomib (Velcade, PS-341) in the treatment of metastatic melanoma: basic and clinical aspects." *American journal of cancer research*, vol. 1, no. 7, pp. 913-24, Jan. 2011.
- [191] E. Strozyk, B. Pöppelmann, T. Schwarz, and D. Kulms, "Differential effects of NF-kappaB on apoptosis induced by DNA-damaging agents: the type of DNA damage determines the final outcome." *Oncogene*, vol. 25, no. 47, pp. 6239-51, Oct. 2006.
- [192] B. Pöppelmann, K. Klimmek, E. Strozyk, R. Voss, T. Schwarz, and D. Kulms, "NF{kappa}B-dependent down-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated proteins contributes to interleukin-1-mediated enhancement of ultraviolet B-induced apoptosis." *The Journal of biological chemistry*, vol. 280, no. 16, pp. 15635-43, Apr. 2005.
- [193] X. D. Zhang, X. Y. Zhang, C. P. Gray, T. Nguyen, and P. Hersey, "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis of human melanoma is regulated by smac/DIABLO release from mitochondria." *Cancer research*, vol. 61, no. 19, pp. 7339-48, Oct. 2001.
- [194] A. M. Verhagen et al., "Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins." *Cell*, vol. 102, no. 1, pp. 43-53, Jul. 2000.
- [195] C. Du, M. Fang, Y. Li, L. Li, and X. Wang, "Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition." *Cell*, vol. 102, no. 1, pp. 33-42, Jul. 2000.
- [196] T. M. Ganten et al., "Preclinical differentiation between apparently safe and potentially hepatotoxic applications of TRAIL either alone or in combination with chemotherapeutic drugs." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 12, no. 8, pp. 2640-6, Apr. 2006.

- [197] M. Leverkus et al., "Proteasome inhibition results in TRAIL sensitization of primary keratinocytes by removing the resistance-mediating block of effector caspase maturation." *Molecular and cellular biology*, vol. 23, no. 3, pp. 777-90, Feb. 2003.
- [198] M. Leverkus et al., "Regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand sensitivity in primary and transformed human keratinocytes." *Cancer research*, vol. 60, no. 3, pp. 553-9, Feb. 2000.
- [199] B. J. Jansen et al., "Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand triggers apoptosis in dividing but not in differentiating human epidermal keratinocytes." *The Journal of investigative dermatology*, vol. 121, no. 6, pp. 1433-9, Dec. 2003.
- [200] D. Lawrence et al., "Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions." *Nature medicine*, vol. 7, no. 4, pp. 383-5, Apr. 2001.
- [201] D. Kulms and T. Schwarz, "Molecular mechanisms of UV-induced apoptosis." *Photodermatology, photoimmunology & photomedicine*, vol. 16, no. 5, pp. 195-201, Oct. 2000.
- [202] D. E. Brash, A. Ziegler, A. S. Jonason, J. A. Simon, S. Kunala, and D. J. Leffell, "Sunlight and sunburn in human skin cancer: p53, apoptosis, and tumor promotion." *The journal of investigative dermatology.*, vol. 1, no. 2, pp. 136-42, Apr. 1996.
- [203] A. Van Laethem, S. Claerhout, M. Garmyn, and P. Agostinis, "The sunburn cell: regulation of death and survival of the keratinocyte." *The international journal of biochemistry & cell biology*, vol. 37, no. 8, pp. 1547-53, Aug. 2005.
- [204] A. Plettenberg et al., "Human melanocytes and melanoma cells constitutively express the Bcl-2 proto-oncogene in situ and in cell culture." *The American journal of pathology*, vol. 146, no. 3, pp. 651-9, Mar. 1995.
- [205] S. F. Wong, D. Y. No, Y. Y. Choi, D. S. Kim, B. G. Chung, and S.H. Lee, "Concave microwell based size-controllable hepatosphere as a three-dimensional liver tissue model." *Biomaterials*, vol. 32, no. 32, pp. 8087-96, Nov. 2011.
- [206] L. Xia et al., "Tethered spheroids as an in vitro hepatocyte model for drug safety screening." *Biomaterials*, vol. 33, no. 7, pp. 2165-76, Mar. 2012.
- [207] I. F. Tannock, C. M. Lee, J. K. Tunggal, D. S. Cowan, and M. J. Egorin, "Limited penetration of anticancer drugs through tumor tissue: a potential cause of resistance of solid tumors to chemotherapy." *Clinical cancer research*, vol. 8, no. 3, pp. 878-84, Mar. 2002.
- [208] J. K. Tunggal, D. S. Cowan, H. Shaikh, and I. F. Tannock, "Penetration of anticancer drugs through solid tissue: a factor that limits the effectiveness of chemotherapy for solid tumors." *Clinical cancer research*, vol. 5, no. 6, pp. 1583-6, Jun. 1999.
- [209] D. J. Kerr and S. B. Kaye, "Aspects of cytotoxic drug penetration, with particular reference to anthracyclines." *Cancer chemotherapy and pharmacology*, vol. 19, no. 1, pp. 1-5, Jan. 1987.

- [210] N. Rohwer and T. Cramer, "Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways.," *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, vol. 14, no. 3, pp. 191-201, Jun. 2011.
- [211] D. L. Roberts et al., "Contribution of HIF-1 and drug penetrance to oxaliplatin resistance in hypoxic colorectal cancer cells." *British journal of cancer*, vol. 101, no. 8, pp. 1290-7, Oct. 2009.
- [212] J. T. Erler et al., "Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance." *Molecular and cellular biology*, vol. 24, no. 7, pp. 2875-89, Apr. 2004.
- [213] T.M. Yang, D. Barbone, D. A. Fennell, and V. C. Broaddus, "Bcl-2 family proteins contribute to apoptotic resistance in lung cancer multicellular spheroids." *American journal of respiratory cell and molecular biology*, vol. 41, no. 1, pp. 14-23, Jul. 2009.
- [214] J. Holtfreter, "A study of the mechanics of gastrulation." *Journal of Experimental Zoology*, pp. 171-212, 1944.
- [215] R. M. Sutherland and R. E. Durand, "Growth and cellular characteristics of multicell spheroids." *Recent results in cancer research*. vol. 95, pp. 24-49, Jan. 1984.
- [216] A. Moscona, "The development in vitro of chimeric aggregates of dissociated embryonic chick and mouse cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, pp. 184-194, 1957.
- [217] A. Moscona, "Rotation-mediated histogenic aggregation of dissociated cells." *Exp Cell Res*, pp. 455-475, 1961.
- [218] L. A. Kunz-Schughart, P. Heyder, J. Schroeder, and R. Knuechel, "A heterologous 3-D coculture model of breast tumor cells and fibroblasts to study tumor-associated fibroblast differentiation." *Experimental cell research*, vol. 266, no. 1, pp. 74-86, May 2001.
- [219] S. Krueger, T. Kalinski, H. Wolf, U. Kellner, and A. Roessner, "Interactions between human colon carcinoma cells, fibroblasts and monocytic cells in coculture--regulation of cathepsin B expression and invasiveness." *Cancer letters*, vol. 223, no. 2, pp. 313-22, Jun. 2005.
- [220] S. Hauptmann, G. Zwadlo-Klarwasser, M. Jansen, B. Klosterhalfen, and C. J. Kirkpatrick, "Macrophages and multicellular tumor spheroids in co-culture: a three-dimensional model to study tumor-host interactions. Evidence for macrophage-mediated tumor cell proliferation and migration." *The American journal of pathology*, vol. 143, no. 5, pp. 1406-15, Nov. 1993.
- [221] N. E. Timmins, S. Dietmair, and L. K. Nielsen, "Hanging-drop multicellular spheroids as a model of tumour angiogenesis." *Angiogenesis*, vol. 7, no. 2, pp. 97-103, Jan. 2004.
- [222] S. Ghosh et al., "Use of multicellular tumor spheroids to dissect endothelial cell-tumor cell interactions: a role for T-cadherin in tumor angiogenesis." *FEBS letters*, vol. 581, no. 23, pp. 4523-8, Sep. 2007.

- [223] A. F. Black, F. Berthod, N. L'heureux, L. Germain, and F. A. Auger, "In vitro reconstruction of a human capillary-like network in a tissue-engineered skin equivalent." *The FASEB journal*, vol. 12, no. 13, pp. 1331-40, Oct. 1998.
- [224] I. Montañó et al., "Formation of human capillaries in vitro: the engineering of prevascularized matrices." *Tissue engineering. Part A*, vol. 16, no. 1, pp. 269-82, Jan. 2010.
- [225] M. Ponec, A. El Ghalbzouri, R. Dijkman, J. Kempenaar, G. van der Pluijm, and P. Koolwijk, "Endothelial network formed with human dermal microvascular endothelial cells in autologous multicellular skin substitutes." *Angiogenesis*, vol. 7, no. 4, pp. 295-305, Jan. 2004.
- [226] M. Régnier, A. Patwardhan, A. Scheynius, and R. Schmidt, "Reconstructed human epidermis composed of keratinocytes, melanocytes and Langerhans cells." *Medical & biological engineering & computing*, vol. 36, no. 6, pp. 821-4, Nov. 1998.
- [227] M. Régnier, M. J. Staquet, D. Schmitt, and R. Schmidt, "Integration of Langerhans cells into a pigmented reconstructed human epidermis." *The Journal of investigative dermatology*, vol. 109, no. 4, pp. 510-2, Oct. 1997.
- [228] N. Bechetoille et al., "A new organotypic model containing dermal-type macrophages." *Experimental dermatology*, vol. 20, no. 12, pp. 1035-7, Dec. 2011.
- [229] S. Bessou, J. E. Surlève-Bazeille, C. Pain, P. Donatien, and A. Taïeb, "Ex vivo study of skin phototypes." *The Journal of investigative dermatology*, vol. 107, no. 5, pp. 684-8, Nov. 1996.
- [230] S. J. Hedley et al., "Fibroblasts play a regulatory role in the control of pigmentation in reconstructed human skin from skin types I and II." *Pigment cell research* vol. 15, no. 1, pp. 49-56, Feb. 2002.
- [231] N. K. Haass and M. Herlyn, "Normal human melanocyte homeostasis as a paradigm for understanding melanoma." *The journal of investigative dermatology.*, vol. 10, no. 2, pp. 153-63, Nov. 2005.
- [232] T. B. FITZPATRICK and A. S. BREATHNACH, "[THE EPIDERMAL MELANIN UNIT SYSTEM]." *Dermatologische Wochenschrift*, vol. 147, pp. 481-9, May 1963.
- [233] M. Y. Hsu et al., "E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors." *The American journal of pathology*, vol. 156, no. 5, pp. 1515-25, May 2000.
- [234] D.Y. Lee and K.H. Cho, "The effects of epidermal keratinocytes and dermal fibroblasts on the formation of cutaneous basement membrane in three-dimensional culture systems." *Archives of dermatological research*, vol. 296, no. 7, pp. 296-302, Jan. 2005.
- [235] F. Andriani, A. Margulis, N. Lin, S. Griffey, and J. A. Garlick, "Analysis of microenvironmental factors contributing to basement membrane assembly and normalized epidermal phenotype." *The Journal of investigative dermatology*, vol. 120, no. 6, pp. 923-31, Jun. 2003.

- [236] N. Maas-Szabowski, A. Shimotoyodome, and N. E. Fusenig, "Keratinocyte growth regulation in fibroblast cocultures via a double paracrine mechanism." *Journal of cell science*, vol. 112 Pt 1, pp. 1843-53, Jun. 1999.
- [237] N. Maas-Szabowski, H. J. Stark, and N. E. Fusenig, "Keratinocyte growth regulation in defined organotypic cultures through IL-1-induced keratinocyte growth factor expression in resting fibroblasts." *The Journal of investigative dermatology*, vol. 114, no. 6, pp. 1075-84, Jun. 2000.
- [238] K. G. Lasithiotakis et al., "Combined inhibition of MAPK and mTOR signaling inhibits growth, induces cell death, and abrogates invasive growth of melanoma cells." *The Journal of investigative dermatology*, vol. 128, no. 8, pp. 2013-23, Aug. 2008.
- [239] J. W. Van Kilsdonk, M. Bergers, L. C. Van Kempen, J. Schalkwijk, and G. W. Swart, "Keratinocytes drive melanoma invasion in a reconstructed skin model." *Melanoma research*, vol. 20, no. 5, pp. 372-80, Oct. 2010.
- [240] G. Li, K. Satyamoorthy, F. Meier, C. Berking, T. Bogenrieder, and M. Herlyn, "Function and regulation of melanoma-stromal fibroblast interactions: when seeds meet soil." *Oncogene*, vol. 22, no. 20, pp. 3162-71, May 2003.
- [241] J. T. Lee and M. Herlyn, "Microenvironmental influences in melanoma progression." *Journal of cellular biochemistry*, vol. 101, no. 4, pp. 862-72, Jul. 2007.
- [242] A. Willenberg, A. Saalbach, J. C. Simon, and U. Anderegg, "Melanoma cells control HA synthesis in peritumoral fibroblasts via PDGF-AA and PDGF-CC: impact on melanoma cell proliferation." *The Journal of investigative dermatology*, vol. 132, no. 2, pp. 385-93, Feb. 2012.
- [243] H. Dolznig et al., "Modeling colon adenocarcinomas in vitro a 3D co-culture system induces cancer-relevant pathways upon tumor cell and stromal fibroblast interaction." *The American journal of pathology*, vol. 179, no. 1, pp. 487-501, Jul. 2011.
- [244] P. Correa de Sampaio et al., "A heterogeneous in vitro three dimensional model of tumour-stroma interactions regulating sprouting angiogenesis." *PloS one*, vol. 7, no. 2, p. e30753, Jan. 2012.
- [245] R. Kalluri and M. Zeisberg, "Fibroblasts in cancer." *Nature reviews. Cancer*, vol. 6, no. 5, pp. 392-401, May 2006.
- [246] C. Berking et al., "Transforming growth factor-beta1 increases survival of human melanoma through stroma remodeling." *Cancer research*, vol. 61, no. 22, pp. 8306-16, Nov. 2001.
- [247] M. Bérubé et al., "Role of the extracellular matrix proteins in the resistance of SP6.5 uveal melanoma cells toward cisplatin." *International journal of oncology*, vol. 26, no. 2, pp. 405-13, Feb. 2005.
- [248] I. Yajima et al., "RAS/RAF/MEK/ERK and PI3K/PTEN/AKT Signaling in Malignant Melanoma Progression and Therapy." *Dermatology research and practice*, vol. 2012, p. 354191, Jan. 2012.

- [249] A. Anichini, R. Mortarini, M. Sensi, and M. Zanon, "APAF-1 signaling in human melanoma." *Cancer letters*, vol. 238, no. 2, pp. 168-79, Jul. 2006.
- [250] G. Madonna, C. D. Ullman, G. Gentilcore, G. Palmieri, and P. A. Ascierto, "NF- κ B as potential target in the treatment of melanoma." *Journal of translational medicine*, vol. 10, no. 1, p. 53, Jan. 2012.
- [251] R. A. Anvekar, J. J. Asciolla, D. J. Missert, and J. E. Chipuk, "Born to be alive: a role for the BCL-2 family in melanoma tumor cell survival, apoptosis, and treatment." *Frontiers in oncology*, vol. 1, no. 34, Oct. 2011.
- [252] A. R. Jazirehi, P. B. Wenn, and M. Damavand, "Therapeutic implications of targeting the PI3Kinase/AKT/mTOR signaling module in melanoma therapy." *American journal of cancer research*, vol. 2, no. 2, pp. 178-91, Jan. 2012.
- [253] P. O. M. Emanuel, R. G. Phelps, A. Mudgil, M. Shafir, and D. E. Burstein, "Immunohistochemical detection of XIAP in melanoma." *Journal of cutaneous pathology*, vol. 35, no. 3, pp. 292-7, Mar. 2008.
- [254] N. Y. Frank, "Regulation of Progenitor Cell Fusion by ABCB5 P-glycoprotein, a Novel Human ATP-binding Cassette Transporter" *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, no. 47, pp. 47156-47165, Aug. 2003.
- [255] T. Schatton et al., "Identification of cells initiating human melanomas." *Nature*, vol. 451, no. 7176, pp. 345-9, Jan. 2008.
- [256] E. Quintana et al., "Phenotypic heterogeneity among tumorigenic melanoma cells from patients that is reversible and not hierarchically organized." *Cancer cell*, vol. 18, no. 5, pp. 510-23, Nov. 2010.
- [257] M. Herlyn et al., "Characterization of tenascin secreted by human melanoma cells." *Cancer research*, vol. 51, no. 18, pp. 4853-8, Sep. 1991.
- [258] M. Fukunaga-Kalabis et al., "Tenascin-C promotes melanoma progression by maintaining the ABCB5-positive side population." *Oncogene*, vol. 29, no. 46, pp. 6115-24, Nov. 2010.
- [259] T. Schatton and M. H. Frank, "Cancer stem cells and human malignant melanoma." *Pigment cell & melanoma research*, vol. 21, no. 1, pp. 39-55, Feb. 2008.

Veröffentlichungen

H. Voersmann, D. Kulms, "Three dimensional melanoma treatment."

Poster, 21. Deutscher Hautkrebskongress

M. Hörnle, N. Peters, B. Thayaparasingham, H. Vörsmann, H. Kashkar, and D.

Kulms, "Caspase-3 cleaves XIAP in a positive feedback loop to sensitize melanoma cells to TRAIL-induced apoptosis." *Oncogene*, vol. 30, no. 5, pp. 575-87, Feb. 2011.

H. Sorg, H. Voersmann, B. Vollmar, "Hydrogen sulfide (H₂S) mediates anti-

coagulatory effects by a downregulation of P-selectin expression." *Langenbecks Arch Surg* / (2008) 393:795–796

O. Schilling, C. Herzberg, T. Hertrich, H. Voersmann et al., "Keeping signals

straight in transcription regulation: specificity determinants for the interaction of a family of conserved bacterial RNA-protein couples." *Nucleic acids research*, vol. 34, no. 21, pp. 6102-15, Jan. 2006.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen meiner Promotion beigetragen und mich auf vielfältige Weise unterstützt haben.

Als erstes danke ich ganz besonders Frau PD Dr. Dagmar Kulms, dass sie mir die Möglichkeit gab, unter ihrer Betreuung auf diesem interessanten Forschungsgebiet zu arbeiten. Mir hat es wirklich sehr viel Spaß gemacht die Grundlagen- mit der angewandten Forschung zu verknüpfen. Ich bedanke mich für die vielen Anregungen und für die tatkräftige Unterstützung bei der Arbeit.

Ich danke Frau Prof. Dr. Heike Walles, dass dieses Projekt in Kooperation mit der von ihr geleiteten Abteilung Zellsysteme des Fraunhofer IGB Stuttgart bearbeitet werden konnte. Die fachliche, materielle und räumliche Unterstützung hat einen sehr großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier, Leiter des Institutes für Zellbiologie und Immunologie (IZI) der Universität Stuttgart, danke ich für die Übernahme der Hauptberichterstattung.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Dr. Silke Busch für das unkomplizierte und vertrauensvolle Bereitstellen ihrer Expertise auf dem Gebiet der Herstellung von Hautmodellen bedanken. Ihre Tipps trugen entscheidend zur erfolgreichen und qualitativ hochwertigen Herstellung dieser bei.

PD Dr. Michael Schweikert danke ich für die Hilfestellung bei der Elektronenmikroskopie.

Was wäre bloß eine Promotion ohne die vielen Kollegen, mit denen man nicht nur über die Arbeit diskutiert, sondern auch Freud, Frust und Leid teilt?

Ich möchte mich bei den Mitarbeitern des IZI für die nette Arbeitsatmosphäre bedanken. Insbesondere danke ich Nathalie Peters, der guten Seele unseres Labors. Bei meinen Kollegen und Freunden Christine, Vanessa und Nora möchte ich mich zutiefst für die emotionale Unterstützung, für das gemeinsame (Über)leben des Laboralltags und vor allem für die vielen witzigen und ausgearteten Momente außerhalb des Labors bedanken.

Den Mitarbeitern der Abteilung Zellsysteme des Fraunhofer IGB möchte ich einen großen Dank für die ausgesprochen gute Arbeitsatmosphäre, die Herzlichkeit und Hilfsbereitschaft, die mir als „externe“ Doktorandin entgegen gebracht wurde, aussprechen. Nicht nur bekam ich von Florian Groeber für meine Arbeit entscheidende Ideen, ich hatte auch sonst viele gute fachliche Diskussionen, nette und lustige Momente mit einer Vielzahl an Mitarbeitern. Es war mir eine sehr große Freude.

Mein letzter und größter Dank gilt meiner Familie für ihre grenzenlose Unterstützung, sei es mit Esspaketen, dem Korrekturlesen, Wellness-Programmen und der Umzugshilfe. Danke für die so wichtigen aufbauenden und motivierenden Worte. DANKE!!!!