

Etablierung einer In-vitro-Plattform für das Therapiescreening: Patient-Derived Organoids von Melanom-Hirnmetastasen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Saif-Eldin Abedellatif

aus Gaza/Palästina

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Prof. Dr. Marieta Ioana Toma
2. Gutachter: Prof. Dr. Tobias Bald

Tag der mündlichen Prüfung: 08.09.2025

Aus dem Institut für Pathologie

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	5
1.	Deutsche Zusammenfassung	7
1.1	Einleitung	7
1.1.1	Hirnmetastasen	7
1.1.2	Hirnmetastasen beim malignen Melanom	8
1.1.3	Patient-Derived Organoids	10
1.1.4	Zielsetzung der Arbeit	12
1.2	Material und Methoden	12
1.3	Ergebnisse	19
1.3.1	Melanom-Hirnmetastasen Patient-Derived Organoids	19
1.3.2	MBM-PDOs bewahren ihren histologischen Merkmalen ihrer Ursprungstumoren	23
1.3.3	MBM-PDOs reflektieren die Mutationsprofile ihrer Ursprungstumoren	24
1.3.4	MBM-PDOs zeigen Therapieantwort auf die zielgerichtete Therapie gemäß ihren Mutationen	25
1.4	Diskussion	27
1.5	Zusammenfassung	30
1.6	Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung	30
2.	Veröffentlichung	37
3.	Erklärung zum Eigenanteil	38

4. Danksagung

39

Abkürzungsverzeichnis

3D	dreidimensional
Abb.	Abbildung
aSCs	adult stem cells (adulte Stammzellen)
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4
ES	Pluripotent embryonic stem cell
GPA	Graded Prognostic Assessment
H&E	Hämatoxylin-Eosin
ICH	Immunhistochemie
iPS	Induced pluripotent stem cell (Induzierte pluripotente Stammzellen)
KPS	Karnofsky-Performance-Status
MBM	Melanoma brain metastasis (Melanom-Hirnmetastasen)
MBM-PDOs	Patient-derived organoids from melanoma brain metastases
M	Metastasen
MRT	Magnetresonanztomographie
N	Nodus
NGS	Next-Generation sequencing
Nr.	Nummer
PD-1	Programmed cell death protein 1
PDOs	Patient-Derived Organoids (von Patienten stammende Organoiden)
RPA	Recursive Partitioning Analysis (Rekursive Partitionierungsanalyse)

SRS	Stereotactic radiosurgery (Stereotaktische Radiochirurgie)
Tab.	Tabelle
T	Tumor
TME	Tumor microenvironment (Tumormikroumgebung)
ULA	Ultra-Low Attachment
WBXRT	Whole-brain radiation therapy (Ganzhirnbestrahlung)
ZNS	Zentralnervensystem

1. Deutsche Zusammenfassung

1.1 Einleitung

1.1.1 Hirnmetastasen

Hirnmetastasen stellen die häufigste Form von malignem Tumor des Gehirns im Erwachsenenalter dar und schätzungsweise 20 % aller Patienten entwickeln Hirnmetastasen im Verlauf einer malignen Erkrankung (Achrol et al., 2019). Sie resultieren aus der hämatogenen Verbreitung der malignen Zellen, die vom Primärtumor ausgehen und im ZNS ansiedeln. Aufgrund der besseren Kontrolle der Grunderkrankung und der extrakraniellen Metastasen sowie der verbesserten diagnostischen Maßnahmen (MRT) ist die Inzidenz der Hirnmetastasen in den letzten Jahren gestiegen. In den USA beträgt die jährliche Inzidenz der Hirnmetastasen bis zu 170.000, während es bei primären Hirntumoren etwa 17.000 Fälle sind (Nathoo et al., 2004). Bevölkerungsbasierte Studien (Fox et al., 2011; Nayak et al., 2012) berichten über eine Inzidenzrate von Hirnmetastasen, die zwischen 2,8 und 14,3 Fällen pro 100.000 Einwohner liegt. Die Inzidenz von Hirnmetastasen zeigt eine deutliche Altersabhängigkeit in Bezug auf die häufigsten malignen Tumoren. Bei Patienten im Alter von 20 bis 39 Jahren treten überwiegend Mammakarzinome auf, bei denen von 40 bis 49 Jahren sind es vorwiegend Bronchialkarzinome, und bei den 50- bis 59-Jährigen sind häufiger Nierenzellkarzinome, maligne Melanome und kolorektale Karzinome zu beobachten (Barnholtz-Sloan et al., 2004). Das Durchschnittsalter bei der Diagnose einer Hirnmetastase liegt bei 67 Jahren für Männer und bei 64 Jahren für Frauen (Smedby et al., 2009). Die häufigsten Tumoren, die in das Gehirn metastasieren, sind an erster Stelle Bronchialkarzinome (41 %), gefolgt von Mammakarzinomen (19 %), malignen Melanomen (6-11 %), kolorektale Karzinome und Nierenzellkarzinome (Nayak et al., 2012; Stelzer, 2013). Erwähnenswert ist es, dass bei 10-15 % aller Hirnmetastasen der Ort und die Art des Primärtumors unbekannt bleibt (Soffietti et al., 2002). Hirnmetastasen treten zu 80 % bis 85 % supratentoriell und zu 15% infratentoriell auf (Delattre et al., 1988). Je nach Lokalisation der Hirnmetastase können unterschiedliche neurologische Symptome auftreten. Am häufigsten sind Symptome, die durch einen erhöhten Hirndruck verursacht werden, wie Kopfschmerzen, Schwindel,

Erbrechen sowie weitere neurologische Ausfälle. Bei Verdacht auf eine Hirnmetastase oder im Rahmen der Tumor-Staging ist die Magnetresonanztomographie (MRT) mit Kontrastmittel (Gadolinium) die primäre diagnostische Methode. Diese Technik ermöglicht die Detektion von Metastasen bereits bei einer Größe von 3-5 mm (Derks et al., 2022). Die Metastasen erscheinen typischerweise als hyperintense, rundliche, scharf begrenzte Läsionen, seltener auch unregelmäßig zystisch, und sind oft von peritumoralem Ödem umgeben (Derks et al., 2022). Die Wahl der Therapie bei Hirnmetastasen erfolgt individuell, basierend auf der Anzahl und Lokalisation der Metastasen sowie den prognostischen Faktoren des Patienten. Zu den zentralen Therapiemöglichkeiten gehören die mikrochirurgische Resektion, die stereotaktische Radiochirurgie, die Ganzhirnbestrahlung und die systemische medikamentöse Therapie. Letztere umfasst Chemotherapie, zielgerichtete Therapien und Immuntherapie (Ramos et al., 2022). Trotz fortschrittlicher Behandlungsmöglichkeiten bleibt die Prognose von Patienten mit Hirnmetastasen insgesamt schlecht, und die 1-Jahres-Überlebensrate liegt bei 10-20% (Boogerd et al., 1993; Murray et al., 2000; Smedby et al., 2009; Stelzer, 2013). Um das Überleben von Patienten mit Hirnmetastasen besser vorhersagen und gezielte Therapieentscheidungen treffen zu können, wurden verschiedene prognostische Scores entwickelt. Diese Scores berücksichtigen unterschiedliche klinische und pathologische Faktoren, um das individuelle Risiko und die Prognose zu bewerten. Zwei wesentliche Modelle sind der Recursive Partitioning Analysis (RPA)-Index, der Patienten in drei Klassen (I-III) anhand von Faktoren wie Alter des Patienten, KPS, Vorhandensein extrakranialer Metastasen und Primärtumorkontrolle unterteilt (Gaspar et al., 1997), und die Graded Prognostic Assessment (GPA) Score, der je nach Tumorart die vier zentralen Faktoren (Alter des Patienten, KPS, Anzahl der Hirnmetastasen und Vorhandensein extrakranialer Metastasen) unterschiedlich wichtet und dadurch eine präzisere und individuellere Prognose liefert (Sperduto et al., 2010).

1.1.2 Hirnmetastasen beim malignen Melanom

Bis zu 60 % der Patienten, bei denen ein malignes Melanom diagnostiziert wurde, entwickeln im Verlauf ihrer Erkrankung Hirnmetastasen. Das maligne Melanom ist die dritthäufigste Ursache für Hirnmetastasen (Bander et al., 2021; Lamba et al., 2021; Sandhu et al., 2021; Tadros und Ray-Chaudhury, 2020). Die Inzidenz des malignen

Melanoms ist in den letzten Jahren gestiegen, was auf ein zunehmend vermehrte Sonnenexposition und etablierte Hautkrebsscreenings zurückzuführen ist. Dadurch nimmt auch die Häufigkeit von Hirnmetastasen vom malignen Melanom zu (Skeie et al., 2011). Das erhöhte Risiko für die Entwicklung von Hirnmetastasen im Rahmen eines malignen Melanoms wurde in einem experimentellen Tierversuch bestätigt, bei dem Tiere nach der Injektion von Zellen eines malignen Melanoms intraparenchymatöse Hirnmetastasen entwickelten (Schackert und Fidler, 1988). Melanom-Hirnmetastasen neigen im Vergleich zu anderen Hirnmetastasen verstärkt zu intratumoralen Blutungen, was zu zahlreichen prä-, intra- und postoperativen Komplikationen führen kann und mit einer schlechten Prognose verbunden ist (Kondziolka et al., 1987). Die Behandlung von Melanom-Hirnmetastasen erfordert ein multidisziplinäres Vorgehen, das chirurgische, strahlentherapeutische und systemische Ansätze kombiniert. Die mikroneurochirurgische Resektion ist eine wichtige Behandlungsoption für Patienten mit 1-4 ZNS-Metastasen, die vollständig resezierbar sind und bei denen keine oder nur langsam fortschreitende systemische Erkrankungen vorliegen. Diese Methode kann je nach Größe und Lage der Metastasen das Langzeitüberleben der Patienten verbessern. Auch wenn eine vollständige Entfernung der Metastasen nicht möglich ist oder eine unkontrollierte systemische Erkrankung besteht, kann eine chirurgische Intervention aus palliativen Gründen erwogen werden, wie z.B. zur Symptomlinderung bei schmerzhaftem Druck, Entlastung bei lebensbedrohlichen Läsionen in kritischen Bereichen wie der hinteren Schädelgrube mit Kompression des vierten Ventrikels oder bei hämorrhagischen Läsionen zur Massenreduktion von Blutgerinnseln. Eine weitere Behandlungsoption ist die Ganzhirnbestrahlung (WBXRT). Obwohl Melanom-Zellen typischerweise strahlenresistent sind, kann diese Therapieform einen Überlebensvorteil von 2-3 Monaten bieten und kommt insbesondere bei Patienten mit multiplen Metastasen infrage, bei denen weder eine vollständige Exzision noch eine stereotaktische Radiochirurgie (SRS) möglich ist. Die Stereotaktische Radiochirurgie (SRS) ist besonders geeignet für Patienten mit bis zu vier Läsionen, die jeweils einen Durchmesser von ≤ 3 cm haben und chirurgisch nicht zugänglich sind, vorausgesetzt, dass die systemische Erkrankung begrenzt oder stabil ist. SRS sollte jedoch bei hämorrhagischen Läsionen oder solchen mit erheblicher Massenwirkung vermieden werden. Chemotherapeutische Optionen umfassen Alkylierungsmittel wie Dacarbazin, das früher als Standardtherapie für Melanome galt

(Middleton et al., 2000). Ein alternatives Medikament ist Temozolomid, das oral verabreicht wird und ähnlich effektiv ist (Quirbt et al., 2007). Ein weiteres Mittel, Fotemustin (Avril et al., 2004), zeigte in frühen Studien vielversprechende Ergebnisse, jedoch war die Ansprechrate in späteren Studien gering. Eine der häufigsten genetischen Veränderungen beim malignem Melanom ist die *BRAF*-Punktmutation, die bei etwa 60% der Fälle auftritt und zu einer Aktivierung des *MAPK*-Signalwegs führt, was die Tumorprogression fördert (Davies et al., 2002). Diese Mutation bietet gleichzeitig ein molekulares Angriffsziel für die zielgerichtete Therapie mit *BRAF*- und *MEK*-Inhibitoren, die den *MAPK*-Signalweg direkt hemmen, und die bei Patienten mit *BRAF*-mutiertem Melanom Ansprechraten von bis zu 76 % gezeigt haben (Ascierto et al., 2016; Robert et al., 2015). Zusätzlich zur zielgerichteten Therapie hat sich die Immuntherapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren etabliert. Insbesondere haben sich die PD-1-Inhibitoren (Nivolumab und Pembrolizumab) sowie dem CTLA-4-Antikörper (Ipilimumab) in der Kombinationstherapie als wirksame Behandlungsoption für fortgeschrittenes und metastasiertes Melanom erwiesen (Larkin et al., 2019; Robert et al., 2019b). Trotz der Verbesserungen im Langzeitüberleben durch die Kombinationstherapie mit PD-1-Inhibitoren und CTLA-4-Antikörpern, unabhängig vom *BRAF*-Mutationsstatus, zeigt jedoch nur eine Teilgruppe der Patienten, die im Voraus nicht identifiziert werden kann, ein dauerhaftes Ansprechen auf die Therapie (Robert et al., 2023). Trotz der Fortschritte in der Therapie bleibt die Prognose bei Hirnmetastasen durch malignes Melanom schlecht. Es gibt jedoch Prädiktoren für ein ungünstiges Outcome, wie zum Beispiel mehr als drei Hirnmetastasen, die Entwicklung von Hirnmetastasen nach der Diagnose einer extrakraniellen Erkrankung, erhöhte Laktatdehydrogenase-Werte von mehr als dem Doppelten des Normalwerts, das Vorhandensein von Knochenmetastasen, multiple Hirnmetastasen und eine ausgedehnte viszerale Erkrankung (Davies et al., 2011; Staudt et al., 2010).

1.1.3 Patient-Derived Organoids

In der Krebsforschung wurden über Jahrzehnte hinweg Tiermodelle und konventionelle zweidimensionale (2D) Zelllinien eingesetzt. Diese Methoden weisen jedoch erhebliche Einschränkungen auf, wie das Fehlen der komplexen Immunbiologie des menschlichen Körpers bei Mausmodellen sowie das Fehlen der Zell-Zell- und Zell-extrazellulären Matrix-

Interaktionen und den Verlust der genetischen Heterogenität bei 2D-Zelllinien (Bar-Ephraim et al., 2020; Xu et al., 2021; Yuki et al., 2020). In diesem Kontext haben die 3D-Kulturen Technologien in den letzten Jahren als ein innovatives Werkzeug etabliert, die genetische, morphologische und physiologische Komplexität des ursprünglichen Gewebes weitgehend bewahren (Rossi et al., 2018; Xu et al., 2018). Ein Organoid wird als ein vereinfachtes, organähnliches Modell, das aus organspezifischen Stammzellen in einer *in vitro* 3D-Umgebung wächst, definiert. Unter bestimmten Kultivierungsbedingungen, welche denen des menschlichen Körpers deutlich ähnlich sind, haben diese Stammzellen die Fähigkeit, sich in spezifische Zelltypen oder Gewebearten zu differenzieren, und sich durch Zellsortierung und räumlich begrenzte Zell-Zell-Interaktionen zu organisieren (Clevers, 2016; Eiraku und Sasai, 2012; Lancaster und Knoblich, 2014). Die Grundlage aller Organoide bilden zunächst die Stammzellen, die in zwei Haupttypen unterteilt werden: pluripotente embryonale Stammzellen (ES) und ihre synthetischen, induzierten pluripotenten Stammzellen (iPS-Zellen) sowie adulte Stammzellen (aSCs) (Clevers, 2016). Diese Stammzellen benötigen spezifische Wachstumsfaktoren, die mikroumgebende Bedingungen (Stammzellnische) der verschiedenen Organe nachbilden und so die Differenzierung und Organisation der Stammzellen unterstützen (Clevers, 2016). Darüber hinaus spielt die extrazelluläre Matrix eine entscheidende Rolle, indem sie die Zellen einbettet, deren Zelladhäsion und -migration unterstützt und zur Bildung organähnlicher Strukturen beiträgt (Clevers, 2016; Drost und Clevers, 2018; Huh et al., 2011; Kleinman et al., 1986). Die 3D-Zellmodelle stellen eine vielversprechende Plattform für klinische Anwendungen und die Krebsforschung dar. Sie ermöglichen die Untersuchung der Krankheitsprogression (Huch et al., 2017; Li et al., 2014), Krebsmodellierung, RNA- und Exom-Sequenzierung, proteomische Analysen sowie die Entwicklung und Testung von Arzneimitteln, einschließlich der personalisierten Medizin (Fan et al., 2019; Goto, 2020; Xia et al., 2019). Bis heute wurden Organoid-Modelle erfolgreich für eine Vielzahl von Krebsarten entwickelt, darunter Mammakarzinom (Li et al., 2020; Sachs et al., 2018), kolorektale und gastrointestinale Tumoren (Fujii et al., 2016; Schütte et al., 2017; Vlachogiannis et al., 2018; Weeber et al., 2015), hepatozelluläres Karzinom (Broutier et al., 2017; Fong et al., 2018), Pankreaskarzinom (Huang et al., 2015; Seino et al., 2018), Urothelkarzinom (Lee et al., 2018) und viele weitere Tumorarten. Diese Modelle bieten ein hohes Maß an

biologischer Relevanz, da sie die intratumorale Heterogenität und die patientenspezifischen Eigenschaften besser abbilden als traditionelle Zelllinienmodelle, was sie zu einem wertvollen Werkzeug in der translationalen Forschung und für präklinische Studien macht.

1.1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das grundsätzliche Ziel dieser Arbeit ist es, die komplexe Natur von Melanom-Hirnmetastasen durch die Etablierung eines repräsentativen Modells besser zu verstehen. Dieses Modell soll effizient generiert werden und die genetischen sowie histologischen Eigenschaften des Ursprungstumors, einschließlich der intratumoralen Heterogenität, bewahren und rekapitulieren. Dadurch soll es in Zukunft möglich sein, neue Therapieansätze an diesem Modell zu testen und individuelle Vorhersagen über die Therapieantwort bei Patienten zu treffen. Patient-Derived Organoids (PDOs) weisen diese gewünschten Eigenschaften auf. Aufgrund des Mangels an Daten zur Etablierung von PDO-Kulturen aus Melanom-Hirnmetastasen war es unser Ziel, Organoide aus Resektionsproben von Melanom-Hirnmetastasen zu etablieren, diese histologisch und genetisch zu charakterisieren und mit ihren Ursprungstumoren zu vergleichen. Darüber hinaus soll das Potenzial dieses Modells genutzt werden, um eine In-vitro-Plattform für Medikamentenscreening-Experimente zu etablieren.

1.2 Material und Methoden

1.2.1 Probengewinnung

Zur Gewinnung von den Tumorproben wurden, in Kooperation mit der neurochirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Bonn, 8 Patienten*innen ausgewählt. Diese hatten eine histologisch Nachgewiesene Metastase eines malignen Melanoms und erhielten eine komplette Resektion des Tumors.

Die Einverständniserklärungen der Patienten, sowie das positive Votum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn (#417/17 mit Änderung vom 2020; #169/23) lagen vor.

1.2.2 Kultivierung der PDOs von den Melanom-Hirnmetastasen

Die Tumorproben wurden direkt nach der Resektion der Metastase in einem Collection-Medium (Tab. 1) in das Labor (Institut für Pathologie, UK Bonn) transportiert und bei -4 °C (nicht länger als 12 Stunden) gekühlt.

Tab. 1: Zusammenstellung des Collection-Mediums

Reagenzien	Firmen
Advanced DMEM F12	Acros Organics, Geel, Belgium, ThermoFisherScientific
1x GlutaMax	Acros Organics, Geel, Belgium, ThermoFisherScientific
10 mM HEPES solution	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
100 µg/mL Normocin	InvivoGen, San Diego CA, USA
2,5 µg/mL Amphotericin B	Biowest, Nuaillé, France

Zunächst wurden die Tumorgewebe, am besten direkt nach dem Ankommen der Probe, mithilfe einer Schere in einer Petrischale in kleinen Tumorstücke (1 bis 2 mm) geschnitten. Die mit der Schere zerkleinerten Proben wurden in eins gentleMACS-Tube mit 5 ml Collection-Medium transportiert und mithilfe von gentleMACS-Dissociator mechanisch zerkleinert. Nach der mechanischen Zerkleinerung wurde die Probe mithilfe einer 1000 µm Filter in einem 50 ml Tube gefiltert, mit 10 ml Collection-Medium gewaschen und dann für 5 min bei 400 g runterzentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt. Wenn das Zellpellet blutig erschien, wird das Zellpellet in 5 ml RBC lysis buffer für 3 min auf Eis inkubiert, mit 20 ml DPBS (1X) gewaschen, dann für 5 min bei 400 g runterzentrifugiert. Es folgte die enzymatische Behandlung (Tab. 2).

Tab. 2: Zusammenstellung der enzymatischen Behandlung

Reagenzien	Firmen
1 mg/ml Collagenase IV	Rockland Immunochemicals, Limerick, PA, USA

15 µg/ml DNase 1	ThermoFisherScientific, Waltham MA, USA
10 µM Y-27632-HCL Rock inhibitor	Biogems, Westlake Village, CA, USA

Das Volumen der Enzymmischung wurde so eingestellt, dass das Tumervolumen nicht mehr als 1/10 des Gesamtvolumens betrug. Das Gewebe wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert, wobei alle 20 min mit einer 5 ml Pipette gemischt wurde. Nach der enzymatischen Behandlung wurde die Probe gewaschen und für 5 min bei 400 g runterzentrifugiert. Es folgte die Zugabe von 3-5 ml TrypLE™ Express Enzyme (1X) und Inkubation bei 37°C für 15 min. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet mit 10 ml Collection-Medium mithilfe einer 50 µm Filter in einem 50 Tube gefiltert. Das filtrierte und runterzentrifugierte Zellpellet wurde in 9 ml MBM-PDOs-Medium resuspendiert und in Ultra-Low Attachment 6-Well-Platten (1,5 ml für jedes Well-Platt) ausplattiert.

1.2.3 Melanom-Hirnmetastasen-Patient-Derived Organoids (MBM-PDOs) Kulturen

Die MBM-PDOs-Kulturen wurden 2- bis 3-mal pro Woche unter dem Mikroskop evaluiert und fotografisch dokumentiert. Darüber hinaus wurden die Organoide in der Regel alle zwei bis vier Wochen passagiert.

1.2.4 MBM-PDOs-Medium

Das MBM-PDOs-Medium (Tab. 4) besteht aus 25 ml Organoid-Basis-Medium (Tab. 3) und 25 ml WRN conditioned medium mit 50 ng/ml h-EFG, 10 µM SB202190, 0,5 µM A83-01, 100 µg/ml Normocin, und 10 µM Y27632.

Tab. 3: Zusammenstellung des Organoid-Basis-Mediums

Reagenzien	Firma
Advanced DMEM F12	Acros Organics, Geel, Belgium, ThermoFisherScientific
2x Penicillin Streptomycin (100x)	Acros Organics, Geel, Belgium, ThermoFisherScientific
2x GlutaMax (100x)	Acros Organics, Geel, Belgium, ThermoFisherScientific

2x 10 mM HEPES (1M)	Carl Roth, Karlsruhe, Germany
2x (1:50) B27 supplement (without Vitamin A)	Merck, Darmstadt, Germany
2x (1:100) N2 supplement (100x)	Merck, Darmstadt, Germany
2x 1.25 mM n-Acetyl-L-Cysteine	Acros Organics, Geel, Belgium, ThermoFisherScientific
2x 10 mM Nicotinamide	Sigma-Aldrich, St. Louis MI, USA
2x 10 nM recombinant human-Gastrin L	Merck, Darmstadt, Germany

Tab. 4: Zusammenstellung des MBM-PDOs-Mediums

Reagenzien	Firma
25 ml Basis Media	
25 ml L-WRN konditioniertes Medium	ATCC, Virginia, USA
50 ng/ml EFG	PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA
10 μ M SB202190	Peprtech, Rocky Hill, NJ, USA
0,5 μ M A83-01	Sigma-Aldrich, St. Louis MI, USA
100 μ g/ml Normocin	InvivoGen, San Diego CA, USA
10 μ M Y27632	Biogems, Westlake Village, CA, USA

1.2.5 Passagierung ("Splitting") von den MBM-PDOs-Kulturen

Um die PDOs zu splitten, wurden sie mit ihrem Medium aus ULA 6-Well-Platte in einer 15 ml Falcon Tube gesammelt, und für 5 min bei 400 g runterzentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und 3-5 ml TrypLE Express hinzugegeben, mit einer 5 ml Pipette gemischt und dann für 15 min bei 37°C inkubiert, zentrifugiert und mehrmals gewaschen. Das MBMOs-Kultur-Medium wurde zu dem Zellpellet so zugegeben, dass die Zellen der PDOs gleichmäßig im Medium verteilt sind. Am Ende kam 9 ml vom MBMOs-Kultur-

Medium mit den dissoziierten Zellen der PDOs auf ULA 6-Well-Platte (1,5 ml für jedes Well)

1.2.6 Einfrieren von den MBM-PDOs

Um die PDOs einzufrieren, wurde CryoStor CS10 Cell Cryopreservation-Medium benutzt. Die PDOs wurden mit ihrem Medium aus 6-Well-Platt in einer 15 ml Falcon Tube gesammelt und für 5 min bei 400 g runterzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und mit dem Cryopreservation Medium (1 ml für eine Cryovial Tube) vermischt. Von der hergestellten Suspension wurden je 1 ml auf ein Cryovial verteilt. Die Cryovials wurden in einen Freezing Vial Containers (Corning™ CoolCell™ LX Cell) gestellt und auf -80 °C gebracht. Nach mindestens 48 h und spätestens einer Woche bei -80 °C wurden Cryovials aus den Freezing Vial Containers in flüssigen Stickstoff überführt.

1.2.7 Fixierung, Einbetten von den MBM-PDOs in den Histogel und Paraffinschnitte

Um die PDOs zu konservieren, für weitere Versuche und Analysen zu erhalten, und für spätere Schnitte vorzubereiten wurden sie aus dem ULA 6-Well-Platte in einer 15 ml Falcon Tube gesammelt und für 5 min bei 400 g runterzentrifugiert. Dann wurden 2-3 ml 4 % Paraformaldehyd (PFA) mit dem Zellpellet vermischt, und für eine Stunde bis einen Tag im 4 °C Kühlschrank inkubiert, um die Organoide zu fixieren. Nach mehreren Waschschritte wurde der Zellpellet mit 1 ml Histogel vermischt und in Tissue-Teck Cryomold (intermediate) eingebettet. Die im Tissue-Teck Cryomold eingebetteten Organoide wurde für 2-24 Stunden im Kühlschrank inkubiert, sodass ein flacher fester Chip entstand, welcher die Organoide zentral fixiert enthielt. Danach wurden die Organoide in die Einbettungskassetten transferiert und im diagnostischen Labor nach dem Standardprotokoll in Paraffinblöcke eingebettet.

1.2.8 Immunhistochemie-Färbung

Die immunhistochemischen Schnitten wurden nach standardisierten Protokollen durchgeführt. Kurz zusammengefasst wurden 2-3 µm Schnitte auf TOMO-Adhäsionsmikroskop-Objektträger (Matsunami Glass Ind. LTD, Osaka, Japan) aufgezogen, mit Xylol entparaffiniert (2 x 15 min, VWR International, Fontenay-sous-Bois, Frankreich) und mit abnehmenden Konzentrationen von Ethanol (Berkel AHK,

Ludwigshafen, Deutschland) bis Wasser (B. Braun, Melsungen, Deutschland) rehydriert. Die Antikörper, die verwendet wurden, um die Melanom-Organoiden zu charakterisieren, waren:

1. Melan A (Agilent, clone A103, dilution 1:100)
2. S100 (Medac/Cell Marque, clone 4C4.9, dilution 1:2000)
3. HMB45 (Agilent, clone HMB45, dilution 1:400)
4. CD4 (Roche, clone SP35, ready-to-use-antibody)
5. CD8 (Agilent; clone C8/144B, dilution 1:50)
6. Ki67 (Zytomed, mouse anti-human, dilution 1:250, clone K-2)

1.2.9 DNA-Extraktion aus den PDOs

Um den Mutationsprofil der MBM-PODs zu analysieren und dann mit den aus dem Primärtumor zu vergleichen, wurde DNA aus den PDOs extrahiert. Dafür wurden die PDOs nach dem Erreichen ihrer maximalen Größe aus ULA 6-Well-Platten in 15 ml Falcon Tube aufgenommen, für 5 min bei 400 g runterzentrifugiert und den Überstand angesaugt. Die DNA wurde mit Hilfe eines Extraktionskits (Dneasy Blood & Tissue Kits, Qiagen) extrahiert und bei -20 °C für eine Woche und später bei -80 °C eingefroren.

1.2.10 Mutationsanalyse

Die Mutationsanalyse für Hirnmetastasen wurde mithilfe eines NGS-Panels (Institut für Pathologie) oder Pyrosequenzierung (Institut für Neuropathologie) durchgeführt.

Sequenzierung der nächsten Generation (NGS):

Die DNA wurde in 120 µl nukleasefreiem Wasser eluiert und die Konzentration wurde auf einem Quantus™-Fluorometer unter Verwendung des QuantiFluor® ONE ds DNA-System (Promega) bestimmt. Die Erstellung der Sequenzierungsbibliothek erfolgte mithilfe eines QIAseq™-Targeted-DNA-Custom-Panels (Qiagen) mit einer Eingabe von 40 ng DNA. Amplifikationsprodukte wurden einer Next-Generation-Sequenzierung auf einem Illumina MiSeq-Sequencer (Illumina) unterzogen. Sequenzierungsdaten wurden mithilfe des CLC Genomics Workbench/Server 23 (Qiagen Bioinformatics) auf genomische Varianten analysiert.

Pyrosequenzierung des *BRAF*-Codons 600:

Pyrosequenzierung wurde verwendet, um die Sequenz am Hotspot-Codon 600 des *BRAF*-Gens zu bestimmen. Ein 122-bp-Fragment von Exon 15 von *BRAF* wurde unter Verwendung der Primer *BRAF*-forward 5'-GAAGACCTCACAGTAAAAATAG-3' und *BRAF*-reverse 5'-Biotin-ATAGCCTCAATTCTTACCATCC-3' amplifiziert. Die PCR wurde mit dem Pyromark PCR Kit (Qiagen) 15 Minuten lang bei 95 °C durchgeführt, gefolgt von 40 Zyklen von 94 °C, 60 °C und 72 °C, jeweils 30 Sekunden lang, und schließlich 72 °C für 10 Minuten. Einzelsträngige DNA-Matrizen wurden auf Streptavidin-Sepharose-Hochleistungssperlen (GE Healthcare) unter Verwendung des PSQ Vacuum Prep Tool and Worktable (Biotage) gereinigt. Die Pyrosequenzierung wurde unter Verwendung von PyroMark® Goldreagenzien (Qiagen) auf dem Pyromark Q24-Gerät (Biotage) mit dem Pyrosequenzierungsprimer 5'-AGGTGATTTTGGTCTAGCTA-3' durchgeführt. Zum Vergleich der Ergebnisse wurden Positiv- und Negativkontrollen verwendet. Pyrogramme wurden mit der PyroMark Q24-Software (Biotage) unter Verwendung des Allelquantifizierungsmoduls (AQ) analysiert, um den Prozentsatz mutierter gegenüber Wildtyp-Allelen entsprechend der prozentualen relativen Peakhöhe zu bestimmen

1.2.11 Medikamentenscreening der MBM-PDOs mit der zielgerichteten Therapie

Nachdem die Organoide ihre maximale Größe (2- 4 Wochen nach dem Splitting) erreicht haben, wurden die Organoide aus ULA 6-Well-Platte 1:2 gesplittet. Die PDOs nach dem Splitting wurden in zwei Hälften geteilt (eine Hälfte wurde passagiert und die andere Hälfte für die Therapie verwendet). Die mit dem MBMOs-Kultur-Medium vermischten Zellen der PDOs wurden in ein steriles Reagentreservoir transferiert, und aus dem Reagentreservoir mit multichannel Pipette 50 µl aufgenommen und in die 96-Well-Platte gegeben (jedes Well Platte hat 50 µl von dem MBM-PDOs-Medium). Die 96-Well-Platte wurde für 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden wurden Bilder von der PDOs mit einem Lichtmikroskop mit Kamera (5-fache und 10-fache Vergrößerung) aufgenommen, um später das Wachstum von therapierten und nicht therapierten PDOs zu vergleichen. Danach wurden die PDOs mit BRAF- und MEK-Inhibitor (Dabrafenib, und Trametinib) in 4 verschiedenen Konzentrationen (1 µM, 0,5 µM, 0,25 µM, und 0,125 µM) therapiert, wobei für jede mit einer Konzentration therapierten Gruppe eine nicht therapierte

Kontrollgruppe gibt. 72 Stunden nach der Therapie wurde der Effekt der Therapie auf die PDOs gemessen, indem Bilder von den mit den unterschiedlichen Konzentrationen therapierten und nicht therapierten PDOs aufgenommen wurden und miteinander verglichen wurden und dann die PDOs für Cell-Titer-Glo Messung vorbereitet wurden.

1.2.12 Auswertung des Therapieansprechens mittels Cell-Titer-Glo

72 Stunden nach der Therapie wurde in jeder Well 100 µl Cell-Titer-Glo Lösung gut vermischt und dann für eine Stunde bei 300/min auf dem Orbital Shaker gestellt. Anschließend wurden 100 µl in den White Nunc Microwell 96-Well, Nunclon Delta-Treated, Flat-Bottom Microplatte transfriert. Die Lumineszenz wurde mit einem SPARK-Mikroplate Reader bei einer Integrationszeit von 500 ms gemessen. Die relative Viabilität wurde als Prozentsatz, normalisiert auf die Kontrolle, berechnet.

1.3 Ergebnisse

1.3.1 Melanom-Hirnmetastasen Patient-Derived Organoids

Zur Etablierung von PDOs aus Melanom-Hirnmetastasen wurde ein 3D-Kulturprotokoll entwickelt, das keine extrazelluläre Matrix wie Matrigel oder Kollagen erfordert (Abbildung 1A). Insgesamt wurden 8 Proben von Hirnmetastasen eines malignen Melanoms gewonnen, wovon 7 erfolgreich gemäß dem entwickelten 3D-Kulturprotokoll als PDO-Kulturen etabliert werden konnten. Die Erfolgsquote betrug 87,5 %. Es gelang, Melanom-Hirnmetastasen sowohl von unbehandelten als auch von vorbehandelten Patienten zu kultivieren (Tabelle 5). Die MBM-PDO-Kulturen von den sieben verschiedenen Patienten zeigten unterschiedlicher Morphologie, die sowohl durch Lichtmikroskopie als auch durch Hämatoxylin-Eosin (H&E) Färbung sichtbar wurden (Abbildung 1C). Einige dieser Kulturen wiesen kugelförmige Strukturen mit länglichen, klar definierten Rändern auf, während andere abgerundete Strukturen oder weniger strukturierte, nebeneinander positionierte Organoide zeigten (Abbildung 1C). Die morphologische Varianz innerhalb der einzelnen MBM-PDOs-Kulturen war dabei sehr gering (Abbildung 3). Um die Wachstumsrate der MBM-PDOs Kulturen zu überwachen, wurden die 2- bis 3-mal pro Woche mithilfe einer Hellfeldmikroskopie visualisiert und ihr Wachstum dokumentiert.

Dabei zeigte sich eine Variabilität der Wachstumsrate zwischen den MBM-PDO-Kulturen von 7 verschiedenen Patienten. Einige MBM-PDOs-Kulturen wuchsen innerhalb von 10-14 Tagen exponentiell, bevor sie ein Wachstumsplateau erreichten. Andere Kulturen vermehrten sich langsamer und erreichten das Plateau nach 20-25 Tagen. Daher mussten MBM-PDOs mit hoher Proliferationsrate alle 10-14 Tage passagiert werden, während die langsamer proliferierenden Organoide alle 20-25 Tage passagiert werden mussten. Zur Beurteilung der Wachstumsrate der MBM-PDOs-Kulturen wurde die Proliferationsrate der 7 MBM-PDOs-Kulturen anhand der Ki-67-Färbung als niedrig oder hoch proliferierend eingestuft ($\leq$ oder $>$ 40 % Ki-67-positive Zellkerne, entsprechend), ausgewertet. Dabei wiesen 5 MBM-PDOs-Kulturen eine hohe Proliferationsrate auf, während die anderen beiden Kulturen eine niedrige Proliferationsrate zeigten (Tabelle 6).

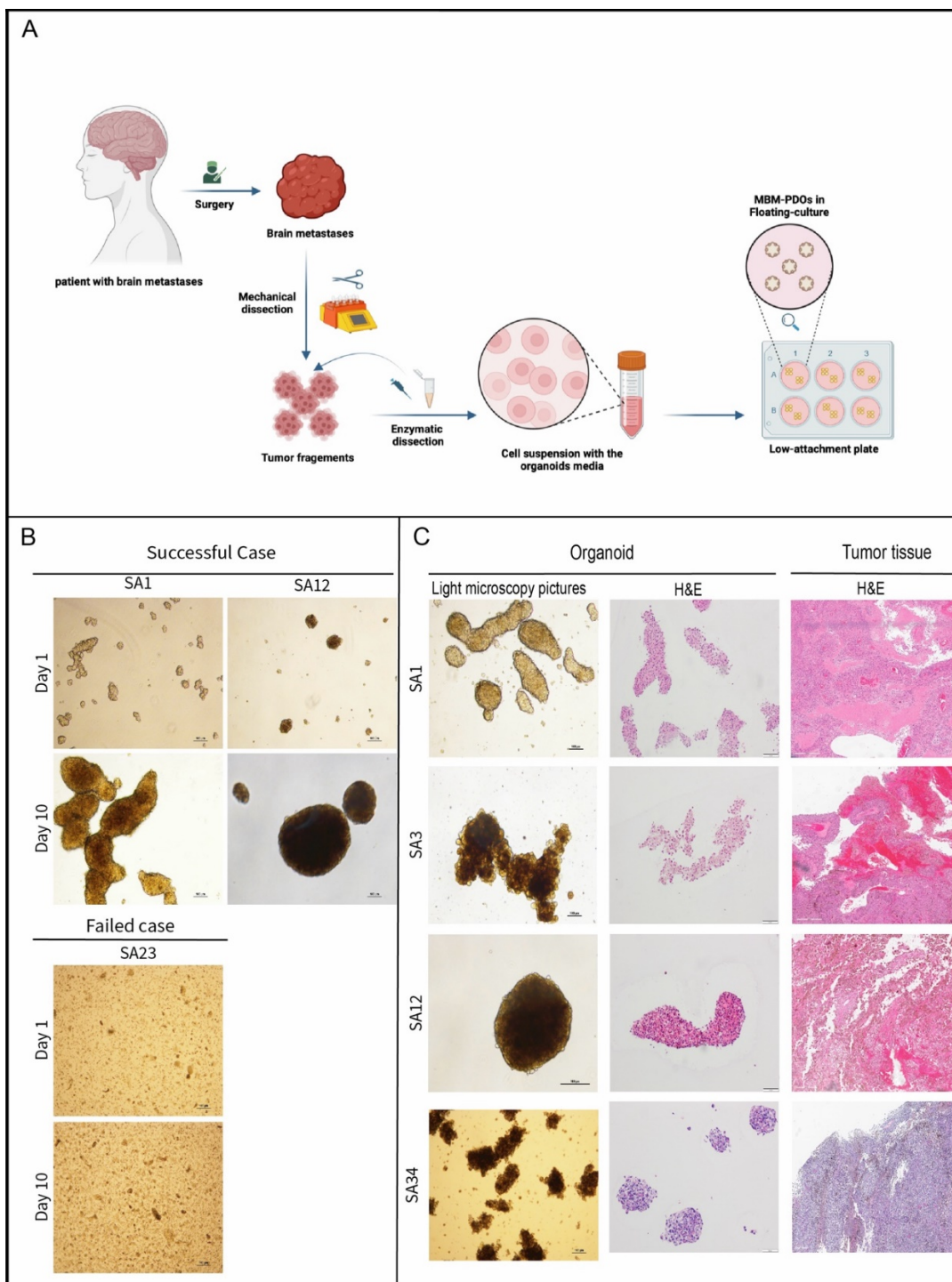
Tab. 5: Klinisch-pathologische Merkmale der in der Studie untersuchten Patienten

Merkmale		Anzahl (%)	
Sex	Männlich	5 (62.5 %)	
	Weiblich	3 (37.5 %)	
Lokalisation	Frontal	4 (50 %)	
	Parietal	3 (37.5 %)	
	Okzipital	1 (12.5 %)	
Anzahl der Hirnmetastasen	Singulär	6 (75 %)	
	Multiple	2 (25 %)	
Extrakraniale Metastasen	0	5 (62.5 %)	
	Pulmonal	1 (12.5 %)	
	Ossär	2 (25 %)	
TNM	T	pTx (Erste Diagnose)	2 (25 %)
		pT1	0 (0 %)
		pT2	1 (12.5 %)
		pT3	4 (50 %)
		pT4	1 (12.5 %)
	N	pN0	5 (62.5 %)

		pN1	2 (25 %)
		pN2	1 (12.5 %)
	M	pM1	8 (100 %)
Mutation		<i>BRAF</i> V600E	5 (62.5 %)
		<i>BRAF</i> Wildtyp	3 (37.5 %)
Therapie	Prä neurochirurgischen Resektion	Stereotaktische Radiotherapie	3 (37.5 %)
		Interferon Therapie	2 (25 %)
		Kombinierte Immuntherapie (Nivolumab, Ipilimumab)	3 (37.5 %)
	Post neurochirurgischen Resektion	<i>BRAF</i> and <i>MEK</i> inhibitor (Tafinlar Mekinist)	2 (25 %)
		Kombinierte Immuntherapie (Nivolumab, Ipilimumab)	3 (37.5 %)

Tab. 6: Quantifizierung der Ki67-Färbung

Fall-Nummer	% of Ki67 positive nuclei	
	Primärtumor	PDOs
SA1	70 %	60 %
SA3	50 %	50 %
SA12	40 %	90 %
SA17	10 %	10 %
SA20	5 %	5 %
SA34	50 %	45 %
SA41	60 %	50 %

**Abb. 1: (A)**

Schematische Darstellung des Workflows zur Herstellung von MBM-PDOs. Das Tumorgewebe wird in Einzelzellsuspensionen zerlegt und anschließend in ULA-Platten kultiviert (erstellt mit Biorender.com). (B) Hellfeldmikroskopische Aufnahmen von PDO-Kulturen, aufgenommen einen Tag und zehn Tage nach der Kultivierung (Maßstab = 100 µm). (C) Hellfeldmikroskopische Aufnahmen (5-fache Vergrößerung) sowie Hämatoxylin-Eosin (H&E) -Färbungen (10-fache Vergrößerung) illustrieren die unterschiedlichen Phänotypen der MBM-PDO-Kulturen. Modifiziert nach (Abedellatif et al., 2024).

1.3.2 MBM-PDOs bewahren ihren histologischen Merkmalen ihrer Ursprungstumoren

Zum Vergleich der histologischer Merkmale der ursprünglichen Tumoren und der MBM-PDO-Kulturen wurden immunhistologischen Färbungen durchgeführt. Die analysierten MBM-PDO-Kulturen zeigten eine Expression von Melanom-Markern wie S100, Melan A und HMB45, die mit der Markerexpression in den ursprünglichen Tumorproben übereinstimmt (Abbildung 2). Allerdings konnten die MBM-PDO-Kulturen ihr Tumor-Immune-Mikroumfeld nicht bewahren, was sich in einer negativen Färbung für CD4 und CD8 widerspiegelt (Abbildung 2).

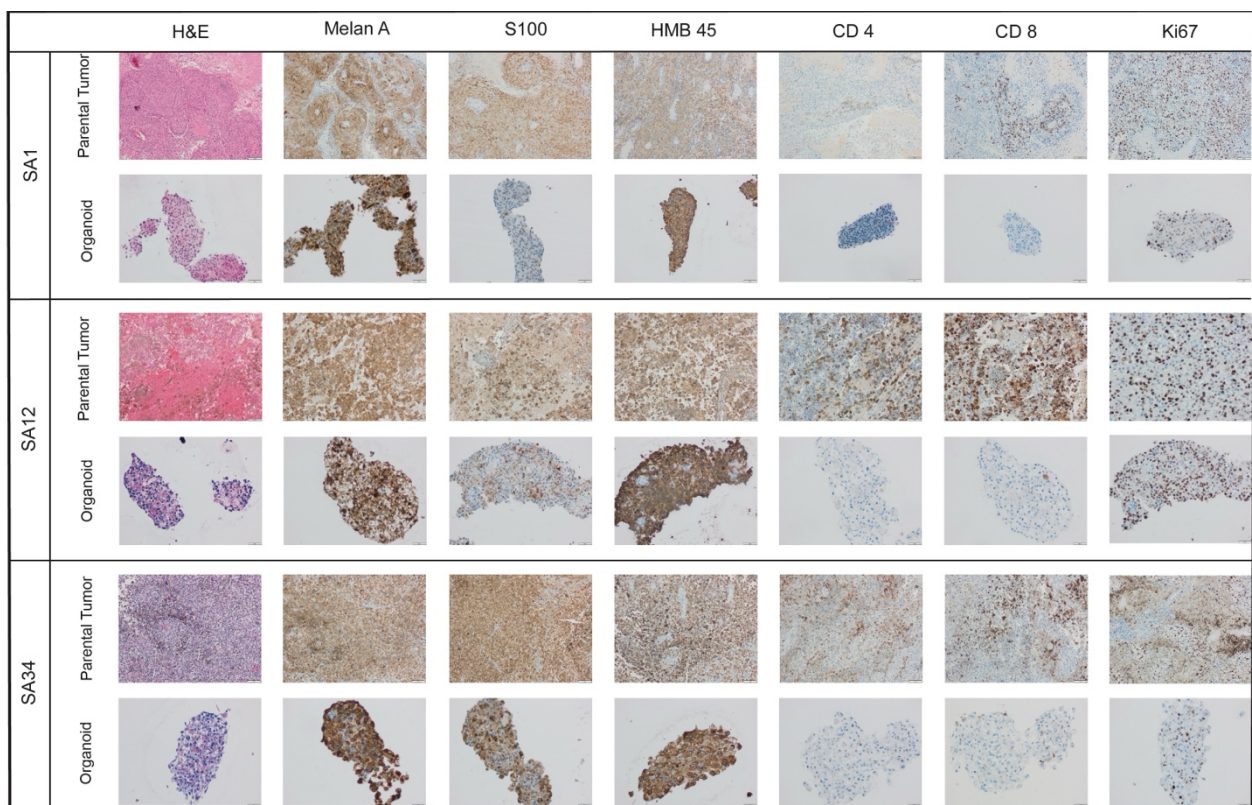


Abb. 2: Repräsentative Aufnahmen der Hämatoxylin-Eosin (H&E) -Färbung sowie der immunhistochemischen Färbung für Melan A, S100, HMB45, CD4, CD8 und Ki67 in Primärtumoren und ihren entsprechenden MBM-PDO-Kulturen (10-fache und 20-fache Vergrößerung). Modifiziert nach (Abedellatif et al., 2024)

Die MBM-PDO-Kulturen wurden über eine durchschnittliche Anzahl von acht Passagen (mit einer Spanne von vier bis zwölf Passagen) kultiviert. Dabei zeigten die Kulturen nach mehreren Passagen eine stabile Morphologie sowie eine konstante Expression der Melanom-typischen Marker (S100 und Melan A) (Abbildung 3).

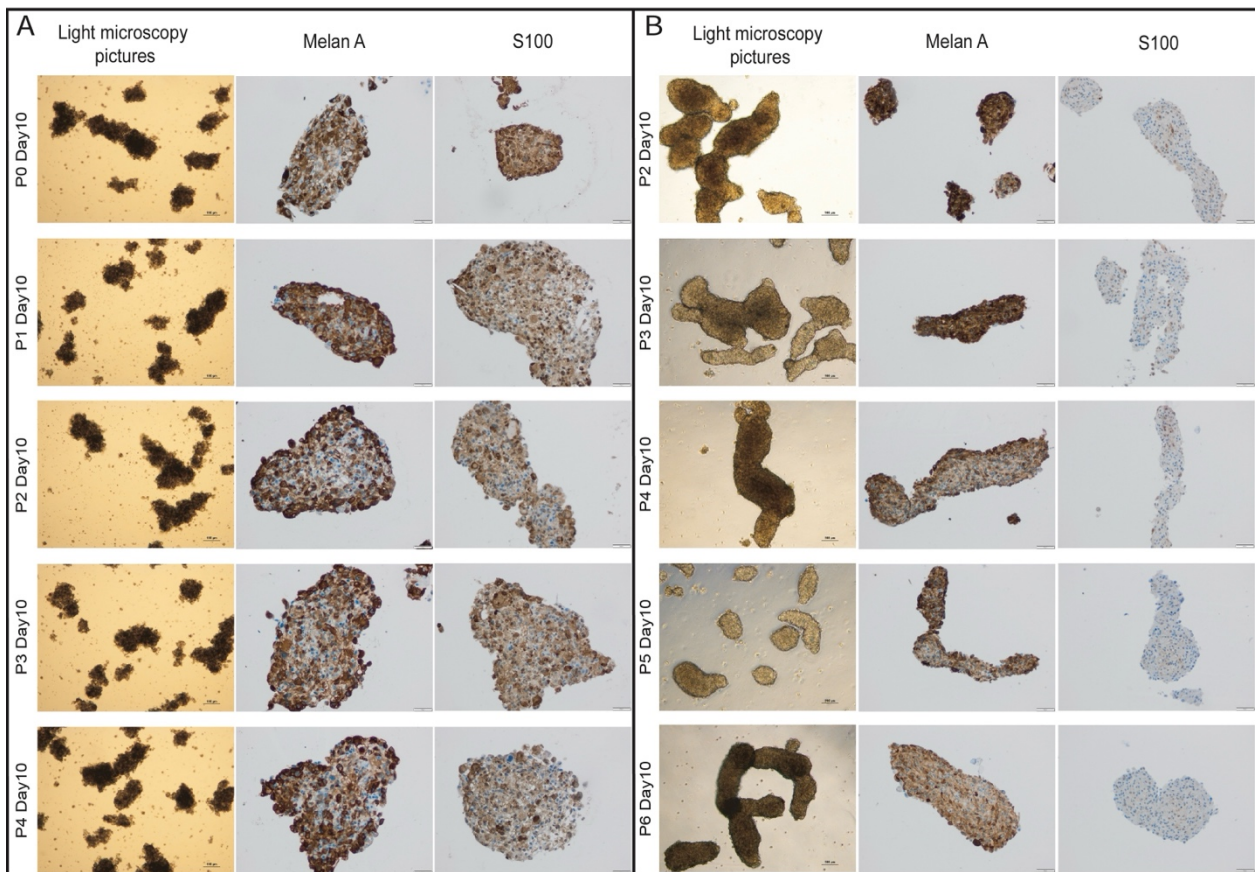


Abb. 3: Hellfeldmikroskopische Aufnahmen (5-fache Vergrößerung) sowie repräsentative Bilder der immunhistochemischen Färbungen für Melan A und S100 (10-fache Vergrößerung) von verschiedenen Passagen veranschaulichen die Stabilität der Organoiden-Morphologie und des immunhistochemischen Profils über mehrere Passagen hinweg. (A) SA34 MBM-PDO-Kultur. (B) SA1 MBM-PDO-Kultur. P: Passage. Modifiziert nach (Abedellatif et al., 2024).

1.3.4 MBM-PDOs-Kulturen reflektieren die Mutationsprofile ihrer Ursprungstumoren

Zur Untersuchung der Mutationsprofile der kultivierten MBM-PDOs und zur Überprüfung der Übereinstimmung mit den ursprünglichen Tumoren wurden die DNAs aus den MBM-PDO-Kulturen extrahiert und sequenziert. Die Analyse bestätigte, dass die MBM-PDO-Kulturen die Mutationen aufwiesen, die auch in ihren ursprünglichen Tumoren vorhanden waren. Fünf MBM-PDO-Kulturen enthielten die *BRAF* V600E-Mutation, während die verbleibenden zwei Kulturen den *BRAF*-Wildtyp aufwiesen (Tabelle 7). Bei einem der sieben Fälle wurde jedoch die im ursprünglichen Tumor nachgewiesene *POLE*-Mutation in der MBM-PDO-Kultur nicht mehr gefunden. Zudem erwarb eine andere MBM-PDO-Kultur eine *TERT*-Mutation, die im Ausgangstumor nicht vorhanden war (Tabelle 7).

Tab. 7: Mutationsanalyse der Primärtumoren und ihrer MBM-PDOs Kulturen.

Fallnummer	Primärtumor	MBM-PDOs Kultur
SA1	<i>BRAF</i> V600 E	<i>BRAF</i> V600 E
SA3	<i>BRAF</i> V600 E	<i>BRAF</i> V600 E
SA12	<i>BRAF</i> V600 E	<i>BRAF</i> V600 E
SA17	<i>BRAF</i> V600 E	<i>BRAF</i> V600 E
SA20	<i>BRAF</i> V600 E	<i>BRAF</i> V600 E
SA34	<i>BRAF</i> V600 WT	<i>BRAF</i> V600 WT
	<i>NRAS</i> p.Q61K	<i>NRAS</i> p.Q61K
		<i>TERT</i> c.146C>T
SA41	<i>BRAF</i> V600 WT T	<i>BRAF</i> V600 WT
	<i>KIT</i> p.L576P	<i>KIT</i> p.L576P
	<i>TERT</i> c.146C>T	<i>TERT</i> c.146C>T
	<i>TERT</i> c.125_124delinsTT	<i>TERT</i> c.125_124delinsTT
	<i>POLE</i> c.1360-1>A	

1.3.4 MBM-PDOs zeigen Therapieantwort auf die zielgerichtete Therapie gemäß ihren Mutationen

Um die kultivierten MBM-PDOs für Medikamentenscreening-Experimente zu nutzen, wurde ein Protokoll zur Behandlung der MBM-PDO-Kulturen in 96-Well-Platten sowie zur Auswertung des Therapieansprechens mittels eines Zellviabilitätsassays etabliert. Die MBM-PDO-Kulturen wurden über einen Zeitraum von 72 Stunden mit vier verschiedenen Konzentrationen einer kombinierten zielgerichteten Therapie (Dabrafenib, ein BRAF-Inhibitor, und Trametinib, ein MEK-Inhibitor) behandelt. Die getesteten Konzentrationen betrugen 1 μ M, 0,5 μ M, 0,25 μ M und 0,125 μ M. Anschließend wurden die Morphologie der behandelten MBM-PDOs sowie die der Kontrollgruppe mittels Hellfeldmikroskopie visualisiert und die Zellviabilität mit dem Cell-Titer-Glo-Assay gemessen (Abbildung 4A). MBM-PDO-Kulturen mit der *BRAF* V600E-Mutation sprachen gut auf die Therapie mit BRAF- und MEK-Inhibitoren an, was sich in einer Reduktion der Zellviabilität auf weniger als 50 % und in einer Veränderung ihrer Morphologie zeigte. Im Gegensatz dazu zeigten die *BRAF*-Wildtyp-MBM-PDO-Kulturen keine Anzeichen einer Therapieantwort (Abbildung 4B und C).

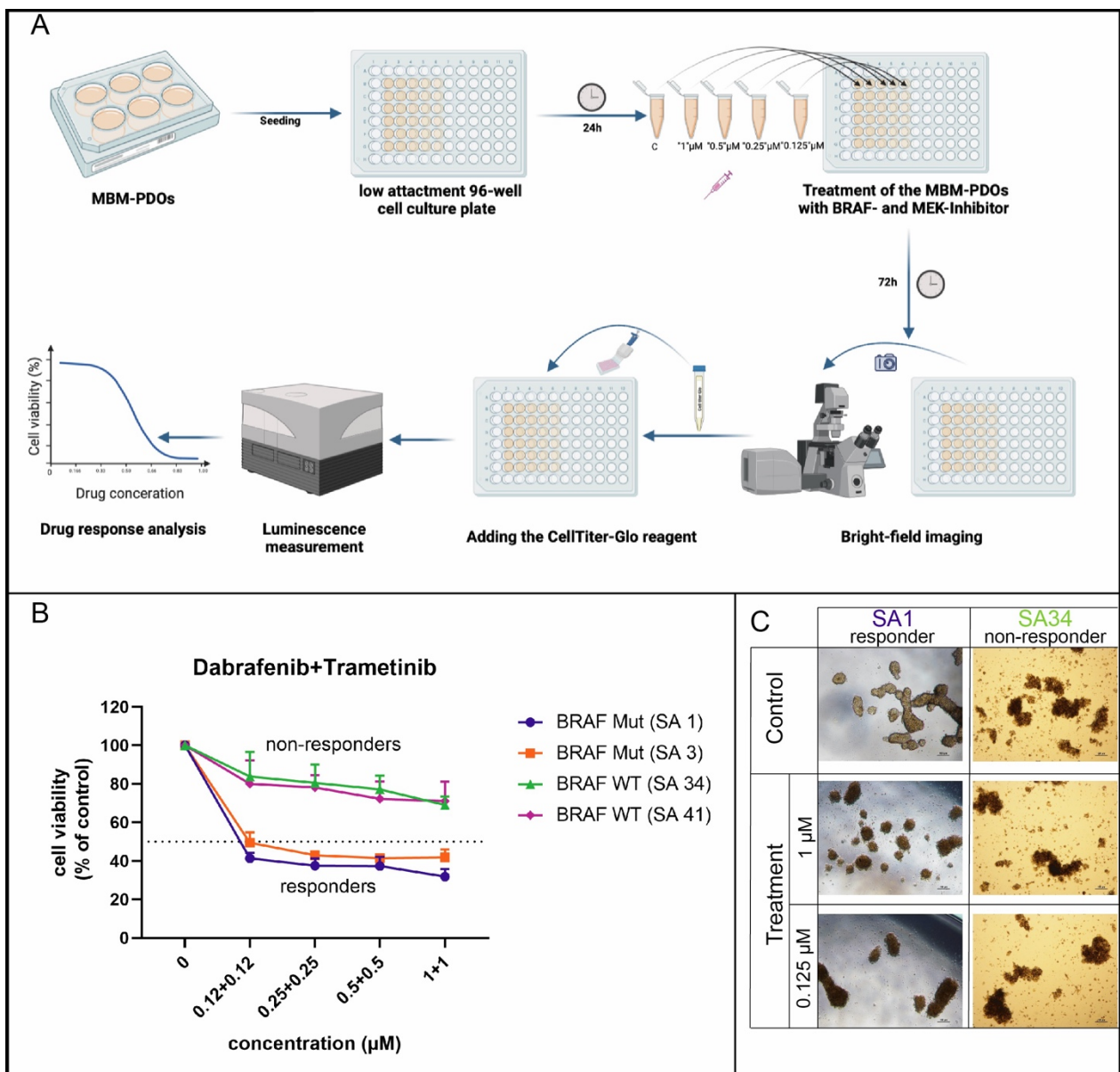


Abb. 4: (A) Grafische Darstellung der in vitro-Plattform für das Medikamentenscreening (erstellt mit Biorender). (B) Die Dosis-Wirkungs-Kurve zeigt die Zellviabilität von MBM-PDO-Kulturen nach einer 72-stündigen Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von Dabrafenib und Trametinib. Die Zellviabilität wurde mit dem Cell-Titer-Glo-Assay (Promega) gemessen und relativ zur Vehikel-Kontrollgruppe normalisiert. Jede Bedingung wurde in technischen und biologischen Triplikaten durchgeführt. Die Ergebnisse sind als Mittelwert $\pm$ SEM dargestellt. (C) Hellfeldmikroskopische Aufnahmen von MBM-PDO-Kulturen, die nach einer 72-stündigen Behandlung mit 1 μM und 0,125

μM Dabrafenib und Trametinib sowie einer Vehikel-Kontrollgruppe (obere Reihe) gemacht wurden (Maßstab = 100 μm). Modifiziert nach (Abedellatif et al., 2024).

1.4 Diskussion

In den letzten Jahren haben sich Patient-Derived Modelle wie Xenografts, Organoids und Tumoroids aufgrund ihrer überlegenen Repräsentation der Tumorheterogenität und der patientenspezifischen biologischen Eigenschaften im Vergleich zu traditionellen Zelllinien als wertvolle Instrumente für die Erforschung der Tumorbilogie, die Entwicklung personalisierter Therapien und das präklinische Medikamentenscreening etabliert (Drost und Clevers, 2018; Gao et al., 2015; Hidalgo et al., 2014). Von zahlreichen Krebsentitäten, wie beispielsweise das Pankreaskarzinom (Boj et al., 2015), Bronchialkarzinom (Kim et al., 2019), Mammakarzinom (Sachs et al., 2018), und Kolorektalkarzinom (Ganesh et al., 2019) wurden Patient-Derived Organoide etabliert und in verschiedenen Forschungsbereichen verwendet, während nur ganz wenige Daten über die Etablierung der PDOs von primären und metastasierten malignem Melanom zum Vergleich zu den anderen Krebsentitäten zurzeit zur Verfügung stehen. (Sun et al., 2023) beschrieb Organoide, die aus primären mukosalen Melanomen gewonnen wurden. Diese Organoide behielten die histologischen und molekularen Merkmale der primären Tumoren bei und könnten zur Bewertung von Therapieansprechen genutzt werden. Unsere Arbeit stellt unseres Wissens nach die erste umfassende Studie zur Etablierung von patientenabgeleiteten Organoiden aus Melanom-Hirnmetastasen dar. Bisher sind in der wissenschaftlichen Literatur keine Daten oder Publikationen verfügbar, die sich mit der erfolgreichen Etablierung dieser PDOs aus Melanom-Hirnmetastasen beschäftigen. Wir konnten erfolgreich 7 Proben aus 8 Proben Melanom-Hirnmetastasen als PDOs kultivieren, die die histologischen Merkmale und die Mutationsprofile ihrer ursprünglichen Tumoren beibehalten und widerspiegeln. Einer der acht Fälle konnte nicht kultiviert werden; dafür sind verschiedenen Gründe möglich. Dieser Fall war eine rezidivierende Metastase nach vorheriger Resektion, was möglicherweise zu einer schlechten Probenqualität führt.

Interessanterweise zeigten die MBM-PDOs aus Proben von sieben verschiedenen Patienten unterschiedliche Phänotypen. Diese Variabilität in der Morphologie der PDOs von den

verschiedenen Patienten könnte auf genetische Heterogenität, Unterschiede im Tumormikromilieu sowie auf die spezifische Zellzusammensetzung der jeweiligen Tumoren zurückzuführen sein (Tiriác et al., 2018). Zusätzlich zeigten die MBM-PDO-Kulturen unterschiedliche Proliferationsraten, was durch immunhistochemische Färbung mit Ki-67 bestätigt wurde. Diese Proliferationsraten entsprachen denen der ursprünglichen Tumoren. Um die weitere Übereinstimmung der PDO-Kulturen mit ihren ursprünglichen Tumoren zu untersuchen, wurden die Mutationen der MBM-PDOs analysiert und mit den ursprünglichen Tumoren verglichen. Wie erwartet, behielten die MBM-PDO-Kulturen die Mutationen ihrer Ursprungs-Tumoren bei: fünf PDOs wiesen die *BRAF* V600E-Mutation auf, während die anderen zwei PDOs *BRAF* V600E-Wildtyp waren. Nennenswerterweise wiesen beide *BRAF*-Wildtyp-PDO-Kulturen *TERT*-Promotermutationen auf, die in 69 % der Melanome vorkommen und mit einer schlechten Prognose assoziiert sind (Blanco-García et al., 2023). Die häufigste *TERT*-Promotermutation bei primären und metastasierten malignen Melanomen ist die C250T *TERT*-mutation, die häufig mit *NRAS*-Mutationen assoziiert ist (Blanco-García et al., 2023). Diese Assoziation von C250T *TERT*-mutation mit der *NRAS*-Mutation wurde in einer der PDO-Kulturen nachgewiesen. Um die enge molekulare Ähnlichkeit zwischen den Melanom-Hirnmetastasen-PDOs (MBM-PDOs) und ihrem ursprünglichen Gewebe zu demonstrieren, könnten die Transkriptomprofile der MBM-PDOs sowie des ursprünglichen Tumorgewebes durch Bulk-RNA-Sequenzierung analysiert und miteinander verglichen werden.

Es ist bekannt, dass bei 60 bis 70 % der Fälle die Metastasierung von malignem Melanom ins Gehirn zum Tod führt (Gutzmer et al., 2020). Das Gesamtüberleben der Patienten hat sich seit der Einführung von Tyrosinkinase-Inhibitoren und MAPK-Inhibitoren zur Behandlung von metastasierten Melanomen deutlich verbessert. Bei Patienten mit *BRAF* V600E- und V600K-mutiertem metastasiertem Melanom wurden zwei klinische Studien, COMBI-d und COMBI-v, durchgeführt, um die Wirksamkeit und Sicherheit der kombinierten targeted therapy mit Dabrafenib (einem *BRAF*-Inhibitor) und Trametinib (einem MEK-Inhibitor) zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigten eine 5-Jahres-Gesamtüberlebensrate von 34 % und eine mediane Gesamtüberlebenszeit von 25,9 Monaten für die kombinierte zielgerichtete Therapie mit Dabrafenib und Trametinib

(Robert et al., 2019a). Die kombinierte zielgerichtete Therapie mit Dabrafenib und Trametinib erwies sich auch bei *BRAF* V600-mutierten Melanom-Hirnmetastasen als wirksam. Allerdings waren die Ansprechraten bei dieser Therapie bei Hirnmetastasen geringer als bei extrakraniellen Metastasen (Davies et al., 2017). Das Gesamtüberleben bei *BRAF* V600E- oder V600K-mutierten Melanom-Hirnmetastasen, die mit Dabrafenib und Trametinib als Erstlinientherapie behandelt wurden, wurde in der klinischen COMBI-r-Studie untersucht und betrug 10,8 Monate (Berkink et al., 2023).

Die jüngsten Fortschritte in der 3D-Kultivierungstechnologie, insbesondere durch die Entwicklung von Organoiden, bieten vielversprechende Werkzeuge für verschiedene medizinische Anwendungen. Diese Kulturen zeichnen sich durch ihre enge Übereinstimmung mit den Originaltumoren aus, aus denen sie gezüchtet wurden. Sie ermöglichen die Entwicklung und Prüfung potenziell patientenspezifischer Arzneimittel und können dazu beitragen, Vorhersagen über das Therapieansprechen zu treffen, die für die individuelle Patientenbehandlung von Bedeutung sind (Drost und Clevers, 2018). Dieses Potenzial der Organoiden wurde genutzt, indem MBM-PDO-Kulturen als in-vitro-Plattform zur Evaluierung der Wirksamkeit der zielgerichteten Therapien eingesetzt wurden. Zu diesem Zweck wurden vier PDOs in 96-Well-Platten kultiviert und mit verschiedenen Konzentrationen der kombinierten Therapie aus Dabrafenib und Trametinib behandelt. Unsere Erwartungen sowie die Beschreibung von (Sun et al., 2023) in ihrer Publikation, dass eine Korrelation zwischen dem Ansprechen auf die kombinierte Therapie mit Dabrafenib und Trametinib in den Organoid-Kulturen und dem Mutationsstatus der Tumoren besteht, wurden in den von uns durchgeführten Versuchen bestätigt. Die zwei *BRAF* V600E mutierte MBM-PDOs-Kulturen zeigten eine sehr gute Reaktion auf die Kombinationstherapie, während die zwei anderen *BRAF*-Wildtyp Kulturen unempfindlich waren. Obwohl eine *BRAF*-Wildtyp-MBM-PDO-Kultur eine *NRAS*-Mutation aufwies und mit einem MEK-Inhibitor in Kombination mit einem BRAF-Inhibitor behandelt wurde, zeigte sie überraschenderweise kein Ansprechen auf die Therapie. Dieses Ergebnis verdeutlicht die individuelle Variabilität der Patientenreaktionen auf die zielgerichtete Therapie in diesem *in vitro*-Modell. Die enge Übereinstimmung dieses 3D-Modells der Melanom-Hirnmetastasen mit den ursprünglichen Tumoren – einschließlich der Inter-Patienten-Variabilität in Phänotyp, Proliferationsrate sowie genetischer

Heterogenität und biologischer Eigenschaften der Originaltumoren – bietet eine leistungsfähige *in-vitro*-Plattform. Diese Plattform erweist sich als besonders wertvoll für verschiedene Forschungsbereiche, insbesondere für die Entwicklung und Validierung personalisierter Therapie sowie für die Vorhersage des Therapieansprechens bei Patienten. Dennoch sind die wesentlichen Einschränkungen und Herausforderungen dieses Modells zu beachten. Ein wesentlicher Nachteil besteht im Fehlen eines Tumormikromilieus (TME), einschließlich Immunzellen und Vaskularisierung, was die Möglichkeit einschränkt, Tumor-Immun-Interaktionen zu untersuchen und die Auswirkungen des TME auf das Therapieansprechen zu evaluieren. Es gibt jedoch bereits wissenschaftliche Daten und Literatur, die potenzielle Ansätze zur Überwindung des Fehlens von Immunzellen in diesem Modell bieten. Beispielsweise könnten Organoid-Modelle durch den Transfer autologer oder allogener Immunzellen ergänzt und als Co-Kulturen optimiert werden (Yuan et al., 2022). Zudem könnte die Zugabe spezifischer Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie Interleukin-2 (IL-2), in Betracht gezogen werden, um die Lebensfähigkeit und Proliferation von Immunzellen innerhalb der Organoiden zu verbessern (Neal et al., 2018).

1.5 Zusammenfassung

Zusammenfassend konnten Patient-Derived Organoids (PDOs) effizient aus Melanom-Hirnmetastasen (MBMs) kultiviert und etabliert werden. Diese PDOs bewahrten über mehrere Passagen hinweg sowohl die histopathologischen Merkmale als auch die spezifischen Mutationsprofile ihrer Ursprungsmetastasen. Die etablierten MBM-PDO-Kulturen erwiesen sich als geeignet für *in vitro* Therapie-Experimente, was die Bedeutung patientenspezifischer Modelle in der präklinischen Forschung und der personalisierten Arzneimittelentwicklung eindrucksvoll unterstreicht.

1.6 Literaturverzeichnis der deutschen Zusammenfassung

Abedellatif S-E, Hosni R, Waha A, Gielen GH, Banat M, Hamed M, Güresir E, Fröhlich A, Sirokay J, Wulf A-L, Kristiansen G, Pietsch T, Vatter H, Hölzel M, Schneider M, Toma MI. Melanoma Brain Metastases Patient-Derived Organoids: An In Vitro Platform for Drug Screening. *Pharmaceutics*. 2024; 16: 1042

Achrol AS, Rennert RC, Anders C, Soffietti R, Ahluwalia MS, Nayak L, Peters S, Arvold ND, Harsh GR, Steeg PS, Chang SD. Brain metastases. *Nat. Rev. Dis. Primer.* 2019; 5: 5

Ascierto PA, McArthur GA, Dréno B, Atkinson V, Liskay G, Di Giacomo AM, et al. Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol.* 2016; 17: 1248–1260

Avril MF, Aamdal S, Grob JJ, Hauschild A, Mohr P, Bonerandi JJ, et al. Fotemustine compared with dacarbazine in patients with disseminated malignant melanoma: a phase III study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2004; 22: 1118–1125

Bander ED, Yuan M, Carnevale JA, Reiner AS, Panageas KS, Postow MA, Tabar V, Moss NS. Melanoma brain metastasis presentation, treatment, and outcomes in the age of targeted and immunotherapies. *Cancer.* 2021; 127: 2062–2073

Bar-Ephraim YE, Kretzschmar K, Clevers H. Organoids in immunological research. *Nat. Rev. Immunol.* Nature Publishing Group, 2020; 20: 279–293

Barnholtz-Sloan JS, Sloan AE, Davis FG, Vigneau FD, Lai P, Sawaya RE. Incidence proportions of brain metastases in patients diagnosed (1973 to 2001) in the Metropolitan Detroit Cancer Surveillance System. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2004; 22: 2865–2872

Berking C, Livingstone E, Debus D, Loquai C, Weichenthal M, Leiter U, Kiecker F, Mohr P, Eigentler TK, Remy J, Schober K, Heppt MV, von Wasielewski I, Schadendorf D, Gutzmer R. COMBI-r: A Prospective, Non-Interventional Study of Dabrafenib Plus Trametinib in Unselected Patients with Unresectable or Metastatic BRAF V600-Mutant Melanoma. *Cancers.* 2023; 15: 4436

Blanco-García L, Ruano Y, Blanco Martínez-Illescas R, Cubo R, Jiménez Sánchez P, Sánchez-Arévalo Lobo VJ, Riveiro Falkenbach E, Ortiz Romero P, Garrido MC, Rodríguez Peralto JL. pTERT C250T mutation: A potential biomarker of poor prognosis in metastatic melanoma. *Heliyon.* 2023; 9: e18953

Boj SF, Hwang C-I, Baker LA, Chio IIC, Engle DD, Corbo V, et al. Organoid Models of Human and Mouse Ductal Pancreatic Cancer. *Cell.* Elsevier, 2015; 160: 324–338

Boogerd W, Vos VW, Hart AA, Baris G. Brain metastases in breast cancer; natural history, prognostic factors and outcome. *J. Neurooncol.* 1993; 15: 165–174

Broutier L, Mastrogiovanni G, Verstegen MM, Francies HE, Gavarró LM, Bradshaw CR, et al. Human primary liver cancer-derived organoid cultures for disease modeling and drug screening. *Nat. Med.* Nature Publishing Group, 2017; 23: 1424–1435

Clevers H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell.* 2016; 165: 1586–1597

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417: 949–954

Davies MA, Liu P, McIntyre S, Kim KB, Papadopoulos N, Hwu W-J, Hwu P, Bedikian A. Prognostic factors for survival in melanoma patients with brain metastases. *Cancer*. 2011; 117: 1687–1696

Davies MA, Saiag P, Robert C, Grob J-J, Flaherty KT, Arance A, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with BRAFV600-mutant melanoma brain metastases (COMBI-MB): a multicentre, multicohort, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017; 18: 863–873

Delattre JY, Krol G, Thaler HT, Posner JB. Distribution of brain metastases. *Arch. Neurol*. 1988; 45: 741–744

Derks SHAE, van der Veldt AAM, Smits M. Brain metastases: the role of clinical imaging. *Br. J. Radiol*. 2022; 95: 20210944

Drost J, Clevers H. Organoids in cancer research. *Nat. Rev. Cancer*. Nature Publishing Group, 2018; 18: 407–418

Eiraku M, Sasai Y. Self-formation of layered neural structures in three-dimensional culture of ES cells. *Curr. Opin. Neurobiol*. 2012; 22: 768–777

Fan H, Demirci U, Chen P. Emerging organoid models: leaping forward in cancer research. *J. Hematol. Oncol.* J Hematol Oncol. 2019; 12: 142

Fong ELS, Toh TB, Lin QXX, Liu Z, Hooi L, Mohd Abdul Rashid MB, Benoukraf T, Chow EK-H, Huynh TH, Yu H. Generation of matched patient-derived xenograft in vitro-in vivo models using 3D macroporous hydrogels for the study of liver cancer. *Biomaterials*. 2018; 159: 229–240

Fox BD, Cheung VJ, Patel AJ, Suki D, Rao G. Epidemiology of metastatic brain tumors. *Neurosurg. Clin. N. Am*. 2011; 22: 1–6, v

Fujii M, Shimokawa M, Date S, Takano A, Matano M, Nanki K, Ohta Y, Toshimitsu K, Nakazato Y, Kawasaki K, Uraoka T, Watanabe T, Kanai T, Sato T. A Colorectal Tumor Organoid Library Demonstrates Progressive Loss of Niche Factor Requirements during Tumorigenesis. *Cell Stem Cell*. 2016; 18: 827–838

Ganesh K, Wu C, O'Rourke KP, Szeglin BC, Zheng Y, Sauv   C-EG, et al. A rectal cancer organoid platform to study individual responses to chemoradiation. *Nat. Med*. Nature Publishing Group, 2019; 25: 1607–1614

Gao H, Korn JM, Ferretti S, Monahan JE, Wang Y, Singh M, et al. High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response. *Nat. Med*. 2015; 21: 1318–1325

Gaspar L, Scott C, Rotman M, Asbell S, Phillips T, Wasserman T, McKenna W, Byhardt R. Recursive Partitioning Analysis (RPA) of prognostic factors in three Radiation Therapy

Oncology Group (RTOG) brain metastases trials. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1997; 37: 745–751

Goto T. Patient-Derived Tumor Xenograft Models: Toward the Establishment of Precision Cancer Medicine. *J. Pers. Med.* 2020; 10: 64

Gutzmer R, Vordermark D, Hassel JC, Krex D, Wendl C, Schadendorf D, Sickmann T, Rieken S, Pukrop T, Höller C, Eigentler TK, Meier F. Melanoma brain metastases - Interdisciplinary management recommendations 2020. *Cancer Treat. Rev.* 2020; 89: 102083

Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinská E, Byrne AT, Caldas C, Clarke RB, Jong S de, Jonkers J, Mælandsmo GM, Roman-Roman S, Seoane J, Trusolino L, Villanueva A. Patient Derived Xenograft Models: An Emerging Platform for Translational Cancer Research. *Cancer Discov. Europe PMC Funders*, 2014; 4: 998

Huang L, Holtzinger A, Jagan I, BeGora M, Lohse I, Ngai N, et al. Ductal pancreatic cancer modeling and drug screening using human pluripotent stem cell- and patient-derived tumor organoids. *Nat. Med.* 2015; 21: 1364–1371

Huch M, Knoblich JA, Lutolf MP, Martinez-Arias A. The hope and the hype of organoid research. *Dev. Camb. Engl.* 2017; 144: 938–941

Huh D, Hamilton GA, Ingber DE. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol.* 2011; 21: 745–754

Kim M, Mun H, Sung CO, Cho EJ, Jeon H-J, Chun S-M, Jung DJ, Shin TH, Jeong GS, Kim DK, Choi EK, Jeong S-Y, Taylor AM, Jain S, Meyerson M, Jang SJ. Patient-derived lung cancer organoids as in vitro cancer models for therapeutic screening. *Nat. Commun.* 2019; 10: 3991

Kleinman HK, McGarvey ML, Hassell JR, Star VL, Cannon FB, Laurie GW, Martin GR. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry.* 1986; 25: 312–318

Kondziolka D, Bernstein M, Resch L, Tator CH, Fleming JF, Vanderlinden RG, Schutz H. Significance of hemorrhage into brain tumors: clinicopathological study. *J. Neurosurg.* 1987; 67: 852–857

Lamba N, Wen PY, Aizer AA. Epidemiology of brain metastases and leptomeningeal disease. *Neuro-Oncol.* 2021; 23: 1447–1456

Lancaster MA, Knoblich JA. Organogenesis in a dish: Modeling development and disease using organoid technologies. *Science. American Association for the Advancement of Science*, 2014; 345: 1247125

Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob J-J, Rutkowski P, Lao CD, et al. Five-Year Survival with Combined Nivolumab and Ipilimumab in Advanced Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2019; 381: 1535–1546

Lee SH, Hu W, Matulay JT, Silva MV, Owczarek TB, Kim K, et al. Tumor evolution and drug response in patient-derived organoid models of bladder cancer. *Cell*. 2018; 173: 515-528.e17

Li X, Nadauld L, Ootani A, Corney DC, Pai RK, Gevaert O, et al. Oncogenic transformation of diverse gastrointestinal tissues in primary organoid culture. *Nat. Med.* Nature Publishing Group, 2014; 20: 769–777

Li X, Pan B, Song X, Li N, Zhao D, Li M, Zhao Z. Breast cancer organoids from a patient with giant papillary carcinoma as a high-fidelity model. *Cancer Cell Int*. 2020; 20: 86

Middleton MR, Grob JJ, Aaronson N, Fierlbeck G, Tilgen W, Seiter S, Gore M, Aamdal S, Cebon J, Coates A, Dreno B, Henz M, Schadendorf D, Kapp A, Weiss J, Fraass U, Statkevich P, Muller M, Thatcher N. Randomized phase III study of temozolomide versus dacarbazine in the treatment of patients with advanced metastatic malignant melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2000; 18: 158–166

Murray KJ, Scott C, Zachariah B, Michalski JM, Demas W, Vora NL, Whitton A, Movsas B. Importance of the mini-mental status examination in the treatment of patients with brain metastases: a report from the Radiation Therapy Oncology Group protocol 91-04. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2000; 48: 59–64

Nathoo N, Toms SA, Barnett GH. Metastases to the brain: current management perspectives. *Expert Rev. Neurother.* 2004; 4: 633–640

Nayak L, Lee EQ, Wen PY. Epidemiology of brain metastases. *Curr. Oncol. Rep.* 2012; 14: 48–54

Neal JT, Li X, Zhu J, Giangarra V, Grzeskowiak CL, Ju J, et al. Organoid Modeling of the Tumor Immune Microenvironment. *Cell*. 2018; 175: 1972-1988.e16

Quirbt I, Verma S, Petrella T, Bak K, Charette M. Temozolomide for the treatment of metastatic melanoma. *Curr. Oncol.* 2007; 14: 27–33

Ramos A, Giantini-Larsen A, Pannullo SC, Brandmaier A, Knisely J, Magge R, Wilcox JA, Pavlick AC, Ma B, Pisapia D, Ashamalla H, Ramakrishna R. A multidisciplinary management algorithm for brain metastases. *Neuro-Oncol. Adv.* 2022; 4: v176

Robert C, Carlino MS, McNeil C, Ribas A, Grob J-J, Schachter J, Nyakas M, Kee D, Petrella TM, Blauvelt A, Lotem M, Arance A, Daud AI, Hamid O, Larkin J, Anderson J, Krepler C, Grebennik D, Long GV. Seven-Year Follow-Up of the Phase III KEYNOTE-006 Study: Pembrolizumab Versus Ipilimumab in Advanced Melanoma. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 2023; 41: 3998–4003

Robert C, Grob JJ, Stroyakovskiy D, Karaszewska B, Hauschild A, Levchenko E, et al. Five-Year Outcomes with Dabrafenib plus Trametinib in Metastatic Melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2019a; 381: 626–636

Robert C, Karaszewska B, Schachter J, Rutkowski P, Mackiewicz A, Stroiakovski D, et al. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N. Engl. J. Med.* 2015; 372: 30–39

Robert C, Ribas A, Schachter J, Arance A, Grob J-J, Mortier L, et al. Pembrolizumab versus ipilimumab in advanced melanoma (KEYNOTE-006): post-hoc 5-year results from an open-label, multicentre, randomised, controlled, phase 3 study. *Lancet Oncol.* 2019b; 20: 1239–1251

Rossi G, Manfrin A, Lutolf MP. Progress and potential in organoid research. *Nat. Rev. Genet.* Nature Publishing Group, 2018; 19: 671–687

Sachs N, de Ligt J, Kopper O, Gogola E, Bounova G, Weeber F, et al. A Living Biobank of Breast Cancer Organoids Captures Disease Heterogeneity. *Cell.* 2018; 172: 373–386.e10

Sandhu MRS, Chiang VL, Tran T, Yu JB, Weiss SA, Goldberg SB, Aboian MS, Kluger HM, Mahajan A. Incidence and characteristics of metastatic intracranial lesions in stage III and IV melanoma: a single institute retrospective analysis. *J. Neurooncol.* 2021; 154: 197–203

Schackert G, Fidler IJ. Development of in vivo models for studies of brain metastasis. *Int. J. Cancer.* 1988; 41: 589–594

Schütte M, Risch T, Abdavi-Azar N, Boehnke K, Schumacher D, Keil M, et al. Molecular dissection of colorectal cancer in pre-clinical models identifies biomarkers predicting sensitivity to EGFR inhibitors. *Nat. Commun.* Nature Publishing Group, 2017; 8: 14262

Seino T, Kawasaki S, Shimokawa M, Tamagawa H, Toshimitsu K, Fujii M, Ohta Y, Matano M, Nanki K, Kawasaki K, Takahashi S, Sugimoto S, Iwasaki E, Takagi J, Itoi T, Kitago M, Kitagawa Y, Kanai T, Sato T. Human Pancreatic Tumor Organoids Reveal Loss of Stem Cell Niche Factor Dependence during Disease Progression. *Cell Stem Cell.* 2018; 22: 454–467.e6

Skeie BS, Skeie GO, Enger PØ, Ganz JC, Heggdal JI, Ystevik B, Hatteland S, Parr E, Pedersen P-H. Gamma knife surgery in brain melanomas: absence of extracranial metastases and tumor volume strongest indicators of prolonged survival. *World Neurosurg.* 2011; 75: 684–691; discussion 598–603

Smedby KE, Brandt L, Bäcklund ML, Blomqvist P. Brain metastases admissions in Sweden between 1987 and 2006. *Br. J. Cancer.* 2009; 101: 1919–1924

Soffietti R, Rudà R, Mutani R. Management of brain metastases. *J. Neurol.* 2002; 249: 1357–1369

Sperduto PW, Chao ST, Sneed PK, Luo X, Suh J, Roberge D, Bhatt A, Jensen AW, Brown PD, Shih H, Kirkpatrick J, Schwer A, Gaspar LE, Fiveash JB, Chiang V, Knisely J, Sperduto CM, Mehta M. Diagnosis-specific prognostic factors, indexes, and treatment

outcomes for patients with newly diagnosed brain metastases: a multi-institutional analysis of 4,259 patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2010; 77: 655–661

Staudt M, Lasithiotakis K, Leiter U, Meier F, Eigentler T, Bamberg M, Tatagiba M, Brossart P, Garbe C. Determinants of survival in patients with brain metastases from cutaneous melanoma. *Br. J. Cancer.* 2010; 102: 1213–1218

Stelzer KJ. Epidemiology and prognosis of brain metastases. *Surg. Neurol. Int.* 2013; 4: S192-202

Sun L, Kang X, Ju H, Wang C, Yang G, Wang R, Sun S. A human mucosal melanoma organoid platform for modeling tumor heterogeneity and exploring immunotherapy combination options. *Sci. Adv.* 2023; 9: eadg6686

Tadros S, Ray-Chaudhury A. Pathological Features of Brain Metastases. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 2020; 31: 549–564

Tiriac H, Belleau P, Engle DD, Plenker D, Deschênes A, Somerville TDD, et al. Organoid Profiling Identifies Common Responders to Chemotherapy in Pancreatic Cancer. *Cancer Discov.* 2018; 8: 1112–1129

Vlachogiannis G, Hedayat S, Vatsiou A, Jamin Y, Fernández-Mateos J, Khan K, et al. Patient-derived organoids model treatment response of metastatic gastrointestinal cancers. *Science.* 2018; 359: 920–926

Weeber F, van de Wetering M, Hoogstraat M, Dijkstra KK, Krijgsman O, Kuilman T, Gadellaa-van Hooijdonk CGM, van der Velden DL, Peeper DS, Cuppen EPJG, Vries RG, Clevers H, Voest EE. Preserved genetic diversity in organoids cultured from biopsies of human colorectal cancer metastases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015; 112: 13308–13311

Xia X, Li F, He J, Aji R, Gao D. Organoid technology in cancer precision medicine. *Cancer Lett.* 2019; 457: 20–27

Xu H, Lyu X, Yi M, Zhao W, Song Y, Wu K. Organoid technology and applications in cancer research. *J. Hematol. Oncol.* 2018; 11: 116

Xu R, Zhou X, Wang S, Trinkle C. Tumor organoid models in precision medicine and investigating cancer-stromal interactions. *Pharmacol. Ther.* 2021; 218: 107668

Yuan J, Li X, Yu S. Cancer organoid co-culture model system: Novel approach to guide precision medicine. *Front. Immunol.* 2022; 13: 1061388

Yuki K, Cheng N, Nakano M, Kuo CJ. Organoid Models of Tumor Immunology. *Trends Immunol.* 2020; 41: 652–664

2. Veröffentlichung

Abedellatif S-E, Hosni R, Waha A, Gielen GH, Banat M, Hamed M, Güresir E, Fröhlich A, Sirokay J, Wulf A-L, Kristiansen G, Pietsch T, Vatter H, Hölzel M, Schneider M, Toma MI. Melanoma Brain Metastases Patient-Derived Organoids: An In Vitro Platform for Drug Screening. *Pharmaceutics*. 2024; 16: 1042

<https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16081042>

3. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Institut für Pathologie unter der Betreuung von Prof. Dr. Marieta Toma durchgeführt.

Die Konzeption der Arbeit erfolgte durch Prof. Dr. Marieta Toma in Zusammenarbeit mit PD Dr. Matthias Schneider (Stellvertretender Klinikdirektor der Neurochirurgischen Klinik) sowie Dr. med. Gerrit Gielen (Oberarzt des Neuropathologischen Instituts).

Die folgenden Versuche wurden nach entsprechender Einarbeitung durch Racha Hosni von mir eigenständig durchgeführt: Verfahren zur Kultivierung und Therapie von Organoiden sowie Verfahren zur Einbettung von Organoiden für die Immunhistochemie und zur DNA-Isolation.

Die Analysen mittels Next-Generation-Sequencing (NGS) sowie die Pyrosequenzierung des BRAF-Codons 600 wurden durch die Core Facility und das Neuropathologische Institut des Universitätsklinikums Bonn durchgeführt.

Das zur Auswertung verwendete Datenmaterial wurde von mir eigenständig generiert und zusammengestellt. Ebenso habe ich die Auswertung und Darstellung der experimentellen Daten selbstständig vorgenommen.

Für einzelne Textpassagen habe ich zur sprachlichen Optimierung sowie zur Rechtschreib- und Orthografieprüfung unterstützend generative KI-Module (z. B. ChatGPT) eingesetzt. Die Nutzung diente ausschließlich der sprachlichen Verbesserung und hatte keinerlei Einfluss auf Inhalt oder wissenschaftliche Interpretation.

Ich versichere, die Dissertationsschrift selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

4. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, all jenen meinen tiefen und aufrichtigen Dank auszusprechen, die mich auf meinem Weg zur Fertigstellung dieser Dissertation unterstützt und begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meiner Doktormutter, Frau Prof. Dr. med. Marieta Toma. Sie hat mir nicht nur die Möglichkeit gegeben, an einem äußerst faszinierenden Thema zu arbeiten, sondern auch meine Leidenschaft für die wissenschaftliche Forschung in der Neuroonkologie weiter gestärkt. Ihre unerschütterliche Unterstützung, ihre wertvollen Ratschläge und ihre herausragende Expertise haben entscheidend dazu beigetragen, dass diese Arbeit in ihrer jetzigen Form entstehen konnte. Ein herzliches Dankeschön geht an den Mitarbeiter des Instituts für Pathologie, insbesondere an Prof. Dr. Glen Kristiansen, an den Kollegen aus dem Eingangslabor, an Frau Susanne Steiner (Immunhistologie) sowie an meinen Kolleginnen am Pathologischen Institut, Frau Racha Hosni und Frau Kerstin Fuchs, für ihre ständige Unterstützung, ihre Geduld und die exzellente Betreuung während meiner Promotionszeit.

Mein Dank gilt ebenfalls der neurochirurgischen Abteilung der Uniklinik Bonn, insbesondere Prof. Dr. med. Hartmut Vatter, Prof. Dr. med. Erdem Güresir, und PD Dr. med. Matthias Schneider. Ihre Kooperation, die Bereitstellung von Tumorproben, ihre kontinuierliche Unterstützung und ihr wertvolles Feedback haben diese Arbeit wesentlich bereichert. Ein herzlicher Dank geht auch an unsere Kollegen in der Neuropathologie, Herrn Prof. Dr. med. Torsten Pietsch, Dr. med. Gerrit H. Gielen und Prof. Dr. med. Andreas Waha, für ihre wertvolle Unterstützung bei der Materialbereitstellung und der Sequenzierung. Ich möchte auch dem Scimed-Promotionskolleg für die finanzielle und wissenschaftliche Unterstützung im Rahmen des Scimed-Promotionsstipendiums meinen aufrichtigen Dank aussprechen.

Von ganzem Herzen möchte ich zudem meinen Eltern und Geschwistern danken, deren bedingungslose Liebe, Unterstützung und unermüdlicher Einsatz mir stets den Rücken gestärkt haben

Abschließend gilt mein Dank allen, die auf irgendeine Weise zu dieser Arbeit beigetragen haben. Ohne eure Unterstützung wäre dieser Erfolg nicht möglich gewesen.