

Aus der Universitätshautklinik
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Einfluss von Hypoxie und Hypoxie-relevanter Signalwege auf die
Entstehung und Progression des malignen Melanoms**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Sara Geyer
aus Ostercappeln
Aachen 2018

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Geyer, Sara:

Einfluss von Hypoxie und Hypoxie-relevanter Signalwege auf die Entstehung und Progression des malignen Melanoms. – 2018. – 122 Bl., 36 Abb., 27 Tab., 10 Anl.

Kurzreferat

Es wurde der Einfluss von Hypoxie und reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auf die Proliferation von Melanozyten und Melanomzellen sowie die daran beteiligten Signalwege untersucht.

Dazu wurden bei Melanomzelllinien und Melanozyten der Anteil an Zellen, welche über erhöhte ROS-Mengen verfügten, bestimmt. Mittels eines Westernblots wurden die Zellen auf die Expression der Transkriptionsfaktoren HIF-1 α , HIF-2 α und Nrf2 untersucht. Diese sind für die Anpassung an Hypoxie und ROS besonders relevant. Die Zellkulturen wurden für unterschiedlich lange Zeiträume unter hypoxischen Wachstumsbedingungen kultiviert. Im Anschluss wurde die daraus resultierende Änderung des Proliferationsverhaltens ausgewertet. Zudem wurden Signalwege, die für die Anpassung an Hypoxie und ROS bedeutend sind, durch Zugabe von Chemikalien gezielt beeinflusst. Dadurch sollte eine proliferationshemmende oder –stimulierende Wirkung erzielt werden. Anhand von Gewebepräparaten waren Rückschlüsse auf die *in vivo* Situation möglich. Dabei wurde auch eine mögliche Korrelation zwischen Hypoxie und der Expression von Melanomstammzellmarkern untersucht, um zu überprüfen, ob die Expression von Hypoxiemarkern als Prognosefaktor herangezogen werden kann.

Die gewonnenen Daten sollen zu einem besseren Verständnis des Einflusses von Hypoxie und oxidativem Stress für die Entstehung und Proliferation des malignen Melanoms beitragen.

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	7
1.1.	Das maligne Melanom der Haut	7
1.2.	Hypoxie, reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress.....	9
1.2.1.	UV-induzierte Mutagenese.....	10
1.2.2.	Zellantwort auf ROS und oxidativen Stress, Transkriptionsfaktor Nrf2.....	11
1.2.3.	Zellantwort auf Hypoxie, Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF).....	12
1.2.4.	Signalkaskade in der Reaktion auf ROS und Hypoxie	12
1.2.5.	Hypoxie und oxidativer Stress im malignen Melanom.....	13
1.3.	Krebsstammzellen.....	14
1.3.1.	Krebsstammzellen in Tumorentstehung und Progression.....	14
1.3.2.	Melanomstammzellen	15
1.4.	Ziele der vorliegenden Arbeit.....	16
2.	Material und Methoden	18
2.1.	Verwendete Zelllinien	18
2.2.	Zellkulturtechniken	19
2.2.1.	Kultivierung	19
2.2.2.	Zellzahlbestimmung	20
2.2.3.	Kryokonservierung und Rekultivierung	20
2.3.	Experimente mit Zellkulturen	21
2.3.1.	Kultivierung unter experimenteller Hypoxie	21
2.3.2.	Beeinflussung der durch Hypoxie und ROS regulierten Signalwege.....	22
2.3.3.	Bestimmung ROS-positiver Zellen im Fluoreszenzbild-basierten Zytometer (Tali™)	23
2.3.4.	Kultivierung für Immunhistologie.....	24
2.4.	Proteinbiochemische Methoden	24
2.4.1.	Proteinextraktion	25
2.4.2.	Trennung der Proteine mittels Gelelektrophorese	27

2.4.3.	Transfer der Proteine auf eine Membran	28
2.4.4.	Immunhistochemischer Antigennachweis	28
2.5.	Immunhistologische Methoden	29
2.5.1.	Färbung von Paraffinschnitten	29
2.5.2.	Färbung von Zellkulturpräparaten	29
2.6.	Statistische Auswertung	31
3.	Ergebnisse	32
3.1.	Untersuchung auf reaktive Sauerstoffspezies	32
3.2.	Westernblot	34
3.3.	Experimentelle Hypoxie	36
3.4.	Beeinflussung der durch Hypoxie und ROS regulierten Signalwege	39
3.5.	Immunhistologische Untersuchungen	59
3.5.1.	Untersuchungen an Gewebepräparaten	59
3.5.2.	Untersuchungen an Zellkulturen	65
4.	Diskussion	68
5.	Zusammenfassung	77
6.	Literaturverzeichnis	78
7.	Danksagungen	94
8.	Ehrenerklärung	95
9.	Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung	96
10.	Darstellung des Bildungsweges	97
11.	Anlagen	99
11.1.	Statistische Daten und Tabellen	99
11.1.1.	Statistische Daten und Tabellen zu Abschnitt 3.3.	99
11.1.2.	Statistische Daten und Tabellen zu Abschnitt 3.4.	99
11.2.	Geräteliste	110
11.3.	Software	113
11.4.	Allgemeine Materialien	113
11.5.	Chemikalien und Enzyme	115

11.6.	Antikörper und Immunchemikalien	116
11.7.	Inhibitoren /Stimulanzen.....	118
11.8.	Puffer, Medien, Lösungen	119
11.9.	Zelllinien	121
11.10.	Medien zur Zellkultivierung	122

Abkürzungsverzeichnis

ABCB5	ATP-binding cassette sub-family B member 5
ALDH	Aldehyd-Dehydrogenasen
AMP	Adenosinmonophosphat
ARE	Antioxidant Response Element
ATP	Adenosintriphosphat
ATTM	Ammonium tetrathiomolybdate
BSA	Bovines Serumalbumin
CSC	Cancer-Stamm-Cells; Krebsstammzellen
DHE	Dihydroethidium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMOG	Dimethyloxallyl Glycine
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPI	Diphenyleneiodonium chloride
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FBS	Fetal Bovine Serum, Fetales Rinderserum
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HIF	Hypoxie Induzierter Faktor
HMGS	Human Melanocyte Growth Supplement
HRE	Hypoxie Response Elements
JARID-1B	jumonji/ARID1 (JARID1)
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
Nrf2	Nuclear factor (erythroid-derived 2)- like 2
P75 NGF	p75 nerve growth factor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PkB/Akt	Proteinkinase B, Akt
ROS	Reaktive Oxygen Spezies, reaktive Sauerstoffspezies
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

1. Einleitung

1.1. Das maligne Melanom der Haut

Im deutschen Krebsregister des Robert Koch Instituts wird eine Verhundertfachung der Inzidenz des malignen Melanoms seit den 1970er Jahren verzeichnet. Mittlerweile zählt es zu den fünf häufigsten Krebserkrankungen in Deutschland. Im Jahr 2014 erkrankten hierzulande etwa 21200 Menschen. Das mittlere Erkrankungsalter lag 2014 für Frauen bei 60 Jahren und für Männer bei 67 Jahren. Die standardisierte Sterberate (je 100.000 Personen) betrug für Frauen 1,7 % und für Männern 2,9 %. Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten lagen bei 94 % für Frauen und 91 % für Männer, wobei die Überlebensrate mit steigender Eindringtiefe in die Haut und Stadium der Erkrankung abnimmt [1].

Die Inzidenz des malignen Melanoms ist etwa 10-fach kleiner, als die der nicht melanozytären Hautkarzinome. Dennoch sind etwa 90 % der Todesfälle durch dermatologische Tumore auf das maligne Melanom zurückzuführen [2–4]. Die Aggressivität dieses Karzinoms lässt sich auf seine bereits frühzeitig erfolgende lymphogene und/oder hämatogene Metastasierung, sowie auf die fehlende Möglichkeit einer kurativen Behandlung bei bereits eingetretener Metastasierung zurückzuführen [3, 5].

In der Pathogenese des malignen Melanoms spielen Mutationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen eine entscheidende Rolle. Am häufigsten finden sich dabei aktivierende Mutationen in *BRAF*, diese können in bis zu 66 % der malignen Melanome nachgewiesen werden. Weitere gehäuft auftretende Mutationen finden sich in der *Ras*-Familie. So betrifft die zweithäufigste beschriebene Mutation des malignen Melanoms den Subtyp *N-Ras* (ca. 20 % der Melanome) [6, 7]. Die Mutationen von *BRAF* und *Ras* führen zu einer Aktivierung des MAPK-Signalweges und sind so entscheidend an Zellproliferation und –wachstum beteiligt [6, 8–10].

Die dritthäufigste in UV-induzierten Melanomen nachweisbare Mutation ist eine aktivierende Mutation der GTPase Rac1 (5-9 %). Die *RAC1* P29S Mutation wird durch UVB-Strahlung induziert [11, 12]. Durch Rac1 induzierte Prozesse scheinen mitverantwortlich für die fehlende Immunantwort auf Melanomzellen [13]. Zudem ist Rac1 an Zellproliferation und Zellmigration beteiligt [7, 12]

In etwa 70 % der Melanome findet sich eine Aktivitätssteigerung des PI3K-Signalweges durch inhibierende Mutation des Tumorsuppressorgens *PTEN* oder Expressionssteigerung von Akt3 [14, 15]. Dies trägt zur Entwicklung der Apoptoseresistenz bei [16–18].

Diese Mutationen sind überwiegend durch UV-Strahlung induziert. Dabei schädigt UVB-Strahlung (280 – 315 nm) die DNA direkt, während UVA-Strahlung (315 – 400 nm) über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) DNA-Einzelstrangbrüche herbeiführen kann [19–22]. Insbesondere eine intermittierend hohe Strahlenbelastung in Kindheit und Jugend scheint für die Entwicklung des malignen Melanoms bedeutend zu sein [23, 24].

Zudem scheint künstliche UV-Belastung durch UVA-Bestrahlung in Solarien das Risiko für die Entwicklung eines malignen Melanoms zu erhöhen. Dies könnte mitverantwortlich sein für die steigende Inzidenz dieses Hauttumors [22].

Zu den endogenen Risikofaktoren, die das Auftreten eines malignen Melanoms begünstigen, zählen die Anzahl melanozytärer Nävi, das atypische Nävuszellensyndrom, ein heller Hauttyp (Hauttyp I, II), eine positive Familienanamnese (mind. zwei Verwandte ersten Grades) sowie eine positive Eigenanamnese für ein malignes Melanom. Zu den Präkanzerosen zählen dysplastische Nävi, kongenitale Nävi und die Lentigo maligna. Etwa 30 – 40 % der malignen Melanome entstehen aus einem melanozytären Nävus [25].

Klinisch und histologisch lassen sich vier häufige Melanomtypen unterscheiden:

Superfiziell spreitendes Melanom (SSM) (65 % d. F.): Das SSM tritt meist im mittleren Erwachsenenalter und unter Bevorzugung des Körperstamms auf. Es wächst primär horizontal und kann bei Eintritt in die vertikale Wachstumsphase einen höckerigen Charakter annehmen (sekundär knotiges SSM). Histopathologisch zeigt sich meist eine akanthotisch verbreiterte Epidermis, durchsetzt von großen, rundlichen, atypischen Melanozyten mit hellem Zytoplasma. Ist die Basalmembran intakt, spricht man von einem Melanoma in situ, bei Überschreiten der Basalmembran liegt ein invasives Melanom vor [2, 5, 25].

Noduläres (knotiges) Melanom (NM) (25 % d.F.): Das NM zeigt, im Gegensatz zum SSM, nur eine sehr kurze horizontale Wachstumsphase. Histopathologisch finden sich infiltrierende Melanomzellen in der Epidermis, mit deutlicher Invasion von Korium und eventuell Subkutis. Meist findet sich auch ein ausgeprägtes entzündliches Infiltrat [2, 5, 25].

Lentigo-maligna-Melanom (LMM) (5 % d.F.): Das LMM geht nach Jahren bis Jahrzehnten, durch eine Änderung der Wachstumsrichtung von horizontal-radial nach vertikal, aus einer Lentigo maligna hervor. Es findet sich meist im Gesicht älterer Patienten, vorwiegend bei Frauen. Histopathologisch zeigen sich nestförmige Aggregate atypischer, meist stark pigmentierter Melanomzellen, welche die Basalmembran durchbrochen haben [2, 5, 25].

Akrolentiginöses Melanom (ALM) (5 % d.F.): Das ALM tritt an den Akren, vorwiegend an den Handinnenflächen und den Fußsohlen; sowie im Nagelbereich auf. Histopathologisch

finden sich in der Epidermis basal zahlreiche, nestförmig organisierte Melanozyten, die invasiv in das Korium eindringen [2, 5, 25].

Seltenere Melanomvarianten sind das amelanotische maligne Melanom, das aufgrund seiner fehlenden Pigmentierung schwer zu diagnostizieren ist, sowie das Schleimhautmelanom oder das okuläre Melanom, das meist die Aderhaut befällt [2, 5, 25].

Der bedeutendste Prognosefaktor des nicht metastasierten, primären malignen Melanoms ist die absolute vertikale Tumordicke nach Breslow [24, 26]. Unabhängig von der Tumordicke des Primärtumors sinkt bei Metastasierung die Überlebensrate. Zu den ungünstigen Prognosefaktoren zählen, neben der Metastasierung, die Ulzeration des Tumors, die Invasion in Lymph- oder Blutgefäße und eine hohe Mitoserate der Zellen [5].

Die Deutsche Dermatologische Gesellschaft (DDG) und die Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Onkologie (ADO) empfehlen in ihrer aktuellen S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des malignen Melanom die Einteilung entsprechend der TNM-Klassifikation der AJCC (American Joint Committee on Cancer). In dieses Klassifikationssystem fließen, zusätzlich zur Tumordicke nach Breslow, das Vorhandensein von Mikrometastasen im Wächterlymphknoten, die Ulzeration des Tumors und die Mitoserate ein [3]. Die Einteilung nach *Clark et al* orientiert sich an der histologischen Eindringtiefe der Tumorzellen [27].

Einzigste kurative Therapiemöglichkeit des malignen Melanoms ist die frühzeitige, histographisch kontrollierte Exzision mit einem definierten Sicherheitsabstand. Bei regionaler und/oder Fernmetastasierung steht eine Vielzahl palliativer Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Diese umfassen u.a. den Einsatz von Immuntherapien, Kinase-Inhibitoren oder Chemotherapie [3, 5].

1.2. Hypoxie, reaktive Sauerstoffspezies und oxidativer Stress

Durch die rasche Proliferation maligner Zellen nimmt die Distanz zu den versorgenden Blutgefäßen zu. Ab einer Diffusionsstrecke von ca. 180 µm werden die Zellen nicht mehr ausreichend mit Sauerstoff versorgt und gehen zu Grunde [28]. Daher entstehen innerhalb von Tumoren nekrotische Areale. Unter diesen Bedingungen herrscht ein starker Selektionsdruck hin zu anaeroben Stoffwechselwegen, verstärkter tumoreigener Angiogenese und einer höheren Hypoxietoleranz [29–32].

Um auf ein verringertes Sauerstoffangebot zu reagieren verfügen Zellen über multiple Mechanismen. Es kommt zu einer Umstellung der Energiegewinnung von oxidativer

Phosphorylierung auf anaerobe Glykolyse [33]. Zudem werden vermehrt angiogenetisch wirksame Wachstumsfaktoren freigesetzt, um die Sauerstoffversorgung des Gewebes durch Ausbildung neuer Blutgefäße zu verbessern [32].

In vielen soliden Tumoren sind hypoxische Areale nachweisbar, wobei Sauerstoffmangel die Tumorentwicklung und –progression zu stimulieren scheint [32]. Eine niedrigere Sauerstoffkonzentration in Tumoren geht mit einer erhöhten Metastasierungstendenz und einer geringeren Überlebensquote einher [34, 35]. Die Metastasierungsneigung von Tumoren wird durch ihre Fähigkeit zur Ausbildung eigener Blutgefäße begünstigt [36–38].

Während zellulärer Stoffwechselprozesse entstehen reaktive Sauerstoffspezies (ROS, z.B. $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$, 1O_2 , O_3) und reaktive Stickstoffspezies ($\bullet NO$, $\bullet NO_2$, $ONOO^-$). Mitochondrien werden als die stärksten ROS-Produzenten angesehen. Dennoch sind beinahe alle Enzyme, die molekularen Sauerstoff verwerten, an der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt. Die NADPH-Oxidase (NOX) stellt dabei einen der stärksten enzymatischen ROS-Produzenten dar [39–42].

Im Rahmen der Karzinogenese kommt es trotz ausreichender Sauerstoffversorgung zur Umstellung der Energiegewinnung auf Glykolyse. Dieser Prozess wird als „Warburg Effekt“ bezeichnet [43]. Für Zellen, die ihre Energie über Glykolyse gewinnen, wurde eine vermehrte ROS-Produktion nachgewiesen [44, 45].

In den meisten menschlichen Geweben liegt die physiologische Sauerstoffkonzentration bei ca. 10 % O_2 . In der Haut findet sich im Bereich der unteren Epidermis eine Sauerstoffkonzentration von 1 – 5 %. Unter diesen hypoxischen Bedingungen bilden Mitochondrien vermehrt ROS. Diese Sauerstoffspezies lösen multiple zelluläre Signalkaskaden aus und führen so zur Aktivierung antioxidativer und anaerober Stoffwechselwege [46–48].

1.2.1. UV-induzierte Mutagenese

In der Pathogenese des malignen Melanoms spielt die Exposition gegenüber UV-Strahlung eine bedeutende Rolle. UVB Strahlung (280 – 315 nm) hat einen direkt schädigenden Effekt auf DNA und kann Mutationen in Onkogenen und Tumorsuppressorgenen verursachen und dadurch die Karzinogenese initiieren [19–22]. UVA Strahlung (315 – 400 nm) wirkt nicht direkt schädigend auf die DNA. Ihr karzinogener Effekt wird über die Bildung von ROS vermittelt. Diese lösen DNA-Einzelstrangbrüche und Mutationen aus, was zytotoxisch und karzinogen wirken kann [19, 22, 49, 50].

1.2.2. Zellantwort auf ROS und oxidativen Stress, Transkriptionsfaktor Nrf2

ROS sind instabile, hoch reaktive Moleküle, die Schäden an Proteinen, Lipiden und DNA verursachen und so karzinogene Mutationen oder den Zelltod auslösen [51–53]. Zum Schutz gegen diesen sog. oxidativen Stress verfügen Zellen über eine Reihe antioxidativer Systeme, wie etwa reduziertes Glutathion, Vitamin C und E oder Enzyme, wie die Superoxid-Dismutasen und die Glutathionen-Peroxidase [54].

Sauerstoffradikale sind an zellulären Signalkaskaden beteiligt. So sind niedrige Konzentrationen für Zellmetabolismus und -homöostase bedeutsam. Moderate Level erzeugen oxidativen Stress und lösen einer Reihe von Regulationsmechanismen aus, die beispielsweise über die Stabilisierung der Transkriptionsfaktoren HIF-1, Nrf2, NFκB oder Freisetzung des Wachstumsfaktors VEGF zu einer höheren Stressresistenz der Zelle beitragen. Hohe ROS-Konzentrationen führen schließlich zu einer irreparablen Schädigung von Makromolekülen und DNA und können die Apoptose der Zelle auslösen [41, 48, 55, 56].

Innerhalb von Tumorzellen finden sich, verglichen zu normalen Zellen, höhere Konzentrationen an ROS. Dies trägt über das Auslösen karzinogener Mutationen und die Aktivierung von Signalkaskaden zur Proliferation, Apoptoseresistenz, Metastasierung und Tumorprogression bei [52, 53, 57, 58].

Der bedeutendste Transkriptionsfaktor für die Zellantwort auf oxidativen Stress ist Nrf2 (nuclear factor erythroid 2 related factor 2) [59, 60]. Nach seiner Aktivierung bindet er an die Ziel-DNA-Sequenz, das sog. Antioxidant Response Element (ARE) [61, 62].

Nrf2 ist ein konstant exprimiertes, jedoch sehr instabiles Protein, welches rasch ubiquitiniert und proteolytisch abgebaut wird. Dieser Abbau wird durch das Protein Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) initiiert [63–66].

Oxidativer Stress führt zu einer Hemmung der Funktion von Keap1 und wirkt zudem direkt stimulierend auf Nrf2. Dadurch wird die Expression von Genen, die den Widerstand der Zelle gegenüber oxidativem Stress erhöhen, gesteigert [41, 54, 67].

In vielen malignen Tumoren wurden Mutationen der Gene für Nrf2 und/oder Keap1 nachgewiesen, die eine gestörte Interaktion der beiden Proteine bewirken und zur Überexpression und erhöhten Stabilität von Nrf2 führen. Dies verleiht den Krebszellen eine höhere Resistenz gegenüber oxidativem Stress [54, 60, 68, 69].

1.2.3. Zellantwort auf Hypoxie, Hypoxie-induzierbare Faktoren (HIF)

Die zelluläre Reaktion auf ein verringertes Sauerstoffangebot wird über den Hypoxie-induzierten Faktor 1 (HIF-1) vermittelt. Dieser konnte in vielen Zelltypen bei der Transkriptionsaktivierung verschiedenster Gene nachgewiesen werden [70–72].

HIF-1 ist ein heterodimeres Protein, bestehend aus den im Zytoplasma lokalisierten Untereinheiten HIF-1 α und HIF-1 β [73]. Die Aktivität von HIF-1 wird über die α -Untereinheit reguliert, welche in Gegenwart von O₂ hydroxyliert, polyubiquitiniert und schließlich proteosomal abgebaut wird [74–76]. Unter Hypoxie kommt es zu einer Hemmung der Hydroxylierung, der Abbau wird verhindert und HIF-1 α akkumuliert. Es dimerisiert mit der β -Untereinheit und der Komplex wird in den Zellkern transportiert. Dort bindet er an die HRE's (hypoxia-response-elements) der DNA und aktiviert, über Rekrutierung von Ko-Faktoren, die Expression von Genen, die an Angiogenese, anaerobem Energiestoffwechsel, Proliferation, Apoptosehemmung, Invasion und Metastasierung beteiligt sind [32, 72, 76].

Während der Karzinogenese kommt es auch unter normalen Sauerstoffbedingungen zu einer Überexpression von HIF-1. HIF-1 nimmt dadurch eine entscheidende Position in der Entstehung und Progression von Karzinomen ein [77–79].

Zudem konnte ein der HIF-1 α Untereinheit homologes Protein, HIF-2 α , identifiziert werden. Unter hypoxischen Bedingungen wird es stabilisiert und dimerisiert mit der HIF-1 β Untereinheit. Es übt dadurch ebenfalls eine regulatorische Funktion in den durch Hypoxie bedingten Signalkaskaden aus [80–84]. HIF-2 α ist insbesondere an der Regulation und Freisetzung des VEGF beteiligt [85, 86]. Dieser Wachstumsfaktor ist ein entscheidender Mediator in der Ausbildung neuer Blutgefäße [87–89].

1.2.4. Signalkaskade in der Reaktion auf ROS und Hypoxie

Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) stehen am Anfang einer Reihe zellulärer Signalkaskaden, welche die Regulation von Zellwachstum, -differenzierung, -überleben und Zelltod vermitteln [90]. Ein Zielprotein PI3K-abhängiger Phosphorylierung ist die Proteinkinase B (Akt) [91, 92]. In verschiedenen malignen Tumoren wurden eine verstärkte Aktivität der PI3K und von Akt nachweisen [57, 93–95].

Die Aktivierung dieses Signalweges führt zu einer vermehrten Synthese der HIF-1 α Untereinheit auch unter Normoxie [96]. Akt scheint zudem direkt an der Entstehung und Aufrechterhaltung des Warburg Effekts, also der Umstellung auf Glykolyse trotz ausreichender Oxygenierung, beteiligt zu sein [97–99].

An vielen der PI3K und Akt vermittelten Signalkaskaden ist mTOR (mammalian target of rapamycin) beteiligt [59, 100]. Seine Aktivität wird über die Phosphorylierung von PRAS40 (proline-rich Akt substrate 40 kDa), die Aktivierung der GTPase RHEB (Ras homolog enriched in brain) oder die Aktivierung der AMP-Kinase gesteuert [59, 101].

PRAS40 ist ein an mTOR gebundenes Molekül, dessen Akt-abhängige Phosphorylierung mTOR aktiviert [102–105].

Der Proteinkomplex TSC1/TSC2 inhibiert das Protein RHEB, was wiederum eine Hemmung von mTOR vermittelt. Akt abhängige Phosphorylierung von TSC2 löst diese Inhibition auf und führt zur Aktivierung von mTOR [59, 106, 107].

Für Zellmetabolismus und Zellwachstum benötigt die Zelle Energie in Form von ATP. Bei niedrigem Energiestatus (Hohe AMP/ATP Ratio) wird die AMP-Kinase aktiv und bewirkt die Phosphorylierung von TSC2. Dies führt zu einer Hemmung der mTOR-vermittelten Signalwege bei Energiemangel [57, 107, 108].

Weiterhin kommt es unter Hypoxie zu einer HIF-1 vermittelten Hemmung von mTOR und auch zelluläre ROS können die Funktion von mTOR beeinflussen [107, 109–111].

1.2.5. Hypoxie und oxidativer Stress im malignen Melanom

In der Epidermis herrschen O₂-Gradienten zwischen physiologischer Sauerstoffkonzentration (10 % O₂) bis moderater Hypoxie (1 - 5 % O₂). Dieses liegt an der Entfernung zu den versorgenden Blutgefäßen und bewirkt eine Stabilisierung der HIF-1 α Untereinheit in diesem Gewebe [47, 112–114]. Es wurde gezeigt, dass Melanozyten unter solch reduzierten Sauerstoffkonzentrationen schneller proliferieren als bei besserer Oxigenierung und zudem eher onkogenen Mutationen unterliegen [29, 115, 116].

Zudem wurde beschrieben, dass auch die Mutation des *BRAF*-Gens zu einer Aktivierung und Stabilisierung von HIF-1 α führt [117]. *BRAF*-mutierte Melanome weisen häufig inhibierende *PTEN*-Mutationen auf, die eine Aktivitätssteigerung des Akt-Signalweges bewirken [10]. In *RAC1* P29S mutierten Melanomen findet sich eine verstärkte Aktivierung des MAPK-Signalwege [118]. Auch *Ras*-Mutationen führen zu einer Aktivierung verschiedener Kinase-Signalwege, wie etwa B-Raf und MAPK [98, 119]. Darüber hinaus können die Signalwege von PI3K und MAPK die Expression und Aktivität von HIF-1 α regulieren [120–122].

Während die Aktivität des PI3K/Akt Signalweges in dysplastischen Nävi keine Bedeutung hat, kommt es im Rahmen der malignen Transformation zu einer zunehmenden Aktivierung

dieses Signalweges [16, 123, 124]. Die ungehemmte Aktivierung des Akt-Subtyps Akt3 ist ein früher Schritt in der Melanomentstehung und trägt zur Entwicklung der Apoptoseresistenz bei. Zudem soll dieser Signalweg das vertikale Tumorwachstum und damit die Metastasierung begünstigen [18, 98]. In Akt-transformierten Melanomen sind erhöhte Konzentrationen an ROS nachweisbar. Gleichzeitig vermitteln Akt-induzierte Genprodukte eine erhöhte Resistenz der Zellen gegenüber diesen ROS und bewirken, über eine vermehrte Ausschüttung des VEGF, die tumoreigene Angiogenese. Dieser Effekt wird vor allem durch eine gesteigerte Expression von HIF-1 und Akt vermittelt [9, 17, 115].

Hypoxie ist notwendig, damit sich Akt-transformierte Melanozyten zu Melanomen entwickeln können. HIF-1 gilt dabei als ein Hauptmediator in der Vermittlung hypoxischer Effekte innerhalb dieser Akt-transformierten Melanozyten [115].

ROS sowie die aktivierte Proteinkinase Akt können den Transkriptionsfaktor NFκB aktivieren. Dieser ist im Melanom konstitutiv aktiv und induziert die Expression von Genen, die zur Angiogenese, Metastasierung und dem Schutz vor Apoptose beitragen [124–126]. Eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors NFκB findet sich insbesondere in aggressiven Melanomphänotypen [127].

Hypoxie und ROS tragen also entscheidend zur malignen Transformation der Melanozyten und zur Progression des malignen Melanoms bei.

1.3. Krebsstammzellen

1.3.1. Krebsstammzellen in Tumorentstehung und Progression

Krebs wird zunehmend als ein System heterogener Zellpopulationen verstanden, welche aus einer kleinen Subpopulation von Zellen, den sogenannten Krebsstammzellen (Cancer-Stem-Cells, CSC), hervorgehen. Diese Zellen sind wiederum aus Gewebestammzellen hervorgegangen oder verfügen über Eigenschaften ähnlich denen von Gewebestammzellen, da sie zur Selbsterneuerung und Differenzierung fähig sind. Krebsstammzellen können die Tumorgenese initiieren und wurden erstmals im Zusammenhang mit akuter myeloischer Leukämie beschrieben [128–131]. Der erste solide Tumor für den der Nachweis von CSC gelang war das Mamma-Karzinom [132]. In den letzten Jahren konnten Krebsstammzellen für eine Reihe weiterer Karzinome nachgewiesen werden, wie etwa maligne Gehirntumore, das kolorektale Karzinom und das Pankreaskarzinom [133–135].

In der Literatur finden sich zwei Modelle, die die Entstehung und das Verhalten von Krebsstammzellen erklären. Das hierarchische Modell orientiert sich an dem physiologischen Stammzellverhalten und beschreibt, dass aus einer *de novo* entstandenen CSC weitere, in ihrer Differenzierung zunehmend eingeschränkte Zellen hervorgehen. Das dynamische Modell sieht den Tumor als eine heterogene Zellpopulation an. Jede Tumorzelle ist zur Differenzierung in eine zur Selbsterneuerung und Tumorigenese fähigen CSC in der Lage. Die Differenzierung ist dabei abhängig von Signalen des tumoreigenen Mikromilieus [136, 137].

1.3.2. Melanomstammzellen

Auch für das maligne Melanom wurden CSC identifiziert und verschiedene Stammzellmarker (z.B. CD133, CD166, Nestin) beschrieben [138–142].

Untersuchungen zu den Stammzellmarkern CD133, CD166 und Nestin zeigten Expressionsunterschiede zwischen Nävuszellnävus, Melanom und Metastase. Es wurde während der Entwicklung vom Nävus zu primärem Melanom und zur Metastase eine schrittweise Zunahme der Koexpression aller drei Marker beobachtet. Dabei wurde in allen metastasierten Melanomen mindestens einer dieser drei Stammzellmarker nachgewiesen [141].

Die Expression des als CSC-Marker beschriebenen Drug-Transporters ABCB5 (ATP-binding cassette sub-family B member 5) scheint mit der Progression des malignen Melanoms zu korrelieren [143].

JARID-1B (jumonji/ARID1 (JARID1)) ist eine Demethylase, die an Gewebeentwicklung und Stammzellbiologie beteiligt ist, jedoch auch in der Krebsentstehung eine Rolle spielt. Dieses Enzym findet sich verstärkt in Geweben mit ausgeprägter Regenerationsfähigkeit. In aggressiven primären Melanomen und Melanommetastasen exprimieren 5 – 10 % der Zellen JARID-1B [144–148]. Die Expression von JARID-1B scheint vom tumoreigenen Mikromilieu abhängig zu sein [136]. Die JARID-1B exprimierenden Melanomzellen proliferieren langsamer als die übrigen Tumorzellen und sind in der Lage die Tumorigenese zu initiieren. Da Chemotherapeutika vor allem auf rasch proliferierende Zellen wirken, scheinen die JARID-1B positiven Zellen für das schlechte Therapieansprechen der malignen Melanome mitverantwortlich [136, 149]. Dies spricht für ein dynamisches Stammzellverhalten im malignen Melanom, mit der Möglichkeit, dass jede Melanomzelle die Fähigkeit zur Tumorigenese und Selbsterneuerung entwickeln kann [150]. Im Gegensatz zu rasch proliferierenden Tumorzellen, die zur Energiegewinnung anaerobe Glykolyse nutzen,

gewinnt die langsam proliferierende JARID-1B positive Zellpopulation ihre Energie überwiegend durch oxidative Phosphorylierung [149].

Aldehyd-Dehydrogenasen (ALDH) sind zelluläre Entgiftungsenzyme, die Zellen eine höhere Resistenz gegenüber alkylierenden Stoffen verleihen. Der Subtyp ALDH1A1 wurde als weiterer Melanomstammzellmarker beschrieben. Auch dieses Enzym trägt zur Resistenz der Melanomzellen gegenüber Chemotherapeutika bei [145, 151, 152].

P75 NGF (p75 nerve growth factor) ist ein Marker neuronaler Stammzellen, den etwa 17 % der Melanomzellen exprimieren. Diese Zellen sind ebenfalls zur Tumorentstehung und Metastasierung fähig [145, 153, 154].

1.4. Ziele der vorliegenden Arbeit

In dieser Arbeit wurde überprüft, ob Melanomzellen mehr ROS und zelluläre Hypoxie aufweisen als Melanozyten. Dabei wurde davon ausgegangen, dass UV-Exposition die Bildung von ROS induziert und Mutationen hervorruft, wodurch es zu einer Aktivierung von nachgeschalteten, Hypoxie- bzw. ROS-abhängigen, Signalwegen kommt. In *in vitro* Versuchen an Melanomzellen und Melanozyten wurde der Einfluss von Hypoxie und ROS auf die zellulären Signalwege und die Zellproliferation untersucht. Es wurde überprüft, ob verstärkter oxidativer Stress und zelluläre Hypoxie mit einem aggressiveren Melanomphänotyp einhergehen und die Tumorprogression fördern. Zudem wurde untersucht, ob die Expression der Hypoxiemarker mit der Expression von Melanomstammzellmarkern korreliert. So sollte festgestellt werden, ob die Expression der Hypoxiemarker als Prognosefaktor für die Tumorprogression geeignet ist.

Zunächst wurde durch bildbasierte Zytometrie der Anteil an Zellen bestimmt, die unter normoxischen Wachstumsbedingungen vermehrt ROS aufweisen. Anschließend wurden mittels Westernblots Melanomzellen und Melanozyten auf die Expression der Transkriptionsfaktoren HIF-1 α , HIF-2 α und Nrf2 untersucht. Im nächsten Schritt wurde das Proliferationsverhalten von Melanomzellen und Melanozyten unter hypoxischen Kultivierungsbedingungen untersucht. Durch Zugabe von Chemikalien wurden gezielt die durch HIF, Nrf2 oder NF κ B bzw. die über mTOR und Akt vermittelten Signalkaskaden beeinflusst und der daraus resultierende Effekt auf das Proliferationsverhalten untersucht. Um Informationen über die *in vivo* Situation zu erhalten wurden Gewebepräparate von malignen Melanomen und Metastasen auf die Expression dieser Signalmoleküle untersucht. Die dabei erhaltenen Ergebnisse wurden mit Ergebnissen aus Zellkulturen verglichen.

So sollte diese Arbeit zu einem besseren Verständnis des Einflusses von Hypoxie und oxidativem Stress in Entstehung und Proliferation des malignen Melanoms beitragen.

2. Material und Methoden

Eine vollständige Auflistung aller genutzten Materialien, Zusammensetzung der Lösungen und Medien, sowie die vollständige Geräteliste mit Herstellerangaben finden sich im Anhang.

2.1. Verwendete Zelllinien

Melanozyten

HEMa-LP: Humane Melanozyten isoliert aus adulter, leicht pigmentierter Haut [155].

Melanomzellen

A375: Humane Melanomzellen, isoliert aus einem primären malignen Melanom einer 54-jährigen Frau. Formt rasch wachsende subkutane Tumore, die einem amelanotischen Melanom entsprechen [156, 157].

Mutationsstatus: *BRAF* mutant, *CDKN2A* mutant, *CDKN2A* mutant [158] *RAC1* Wild-Typ [118].

IGR-1: isoliert aus einer Lymphknoten-Metastase eines malignen Melanoms der Leiste eines 42-jährigen Mannes [159].

Mutationsstatus: *BRAF* V600K mutant, *BRAF* V600E Wildtyp [160] *RAC1* P29S mutant [118] *N-RAS* Wild-Typ [161].

MC: isoliert aus einem malignen Melanom in der radialen Wachstumsphase [162].

Mutationsstatus: unbekannt.

MeWo: isoliert aus einer Lymphknotenmetastase eines malignen Melanoms eines 78-jährigen Mannes [163, 164].

Mutationsstatus: *BRAF* Wild-Typ, *N-RAS* Wild-Typ [161, 165].

Preyer: isoliert aus einer subkutanen Melanommetastase [166].

Mutationsstatus: unbekannt.

Sk Mel 28: isoliert aus einem axillaren Lymphknotenmetastase eines malignen Melanom eines 51-jährigen Mannes [164, 167].

Mutationsstatus: *BRAF* V600E mutant, *N-RAS* Wild-Typ [167].

2.2. Zellkulturtechniken

Sofern nicht anders angegeben, wurden Zellkulturmedien und Lösungen, die direkt zu den Zellen gegeben wurden vor Verwendung auf 37 °C vorgewärmt. Alle Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten unter der Sterilbank.

2.2.1. Kultivierung

Alle Zelllinien wurden in 25 cm² bzw. 75 cm² NuncTM-Zellkulturflaschen bei 37 °C und gesättigter Wasserdampfatosphäre bei einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert.

Für Melanomzellen wurde gibcoTM DMEM + GlutaMAXTM mit 1 % Amphotericin B, 1 % gibcoTM Penicillin/Streptomycin, 1 % gibcoTM HEPES, 1 % gibcoTM Kanamycin und 10 % gibcoTM FBS versetzt.

Für Melanozyten wurde gibco® Medium 254 mit 1 % gibcoTM HMGS, 1 % Amphotericin B, 1 % gibcoTM Penicillin/Streptomycin und 1 % gibcoTM Kanamycin-Sulfat versetzt.

Jeden dritten bis fünften Tag wurde, abhängig vom Zellwachstum, das Kulturmedium gewechselt. Dazu wurde unter der Sterilbank das alte Medium mit einer Glaspipette abgesaugt und der Zellrasen einmalig mit 1 % PBS gewaschen. Nach Absaugen wurde neues Medium der oben genannten Zusammensetzung (7 ml bei 25 cm² bzw. 15 ml bei 75 cm²) eingefüllt.

Das Überführen der Zellen in eine neue Kulturflasche erfolgte, sobald der Boden der Flasche zu 90 – 100 % bewachsen war. Zunächst wurde unter der Sterilbank das Medium mit einer Glaspipette abgesaugt. Zum vollständigen Entfernen des Restmediums wurde der Flaschenboden mit 3 ml bei 25 cm² (bzw. 5 ml bei 75 cm²) 1 % PBS vollständig benetzt und die Flasche vorsichtig mehrmals geschwenkt. Nach vollständigem Absaugen des PBS wurden anschließend 3 ml bei 25 cm² (5 ml bei 75 cm²) 0,05 % gibcoTM Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und die Kulturflasche so geschwenkt, dass der gesamte Zellrasen bedeckt war.

Dann wurden die Flaschen bei 37 °C inkubiert bis die Zellen vollständig vom Boden gelöst waren (ca. 3 – 5 Minuten). Dies wurde mikroskopisch kontrolliert. Nach vollständigem Ablösen der Zellen erfolgte die Neutralisierung der Trypsin/EDTA-Lösung. Bei Melanomzellen geschah dies durch das im Zellkulturmedium enthaltene FBS. Daher erfolgte die Zugabe von 3 ml bei 25 cm² (5 ml bei 75 cm²) frischen Zellmediums. Bei den Melanozyten wurden 3 ml (5 ml) gibcoTM Defined Trypsin Inhibitor (DTI) hinzugegeben.

Der gesamte Flascheninhalt wurde in ein 15 ml Cellstar™-Röhrchen überführt und bei 1300 rpm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig mit einer Glaspipette abgesaugt und das Zellpelett in 1 ml Medium resuspendiert. Ein Aliquot (ca. 10 % der Suspension) wurde entnommen und in eine neue Zellkulturflasche gegeben. Dann wurde diese entsprechend der Flaschengröße mit Zellkulturmedium aufgefüllt und anschließend bei 37 °C im Inkubator weiter kultiviert. Die restliche Menge des Aliquots wurde entweder in die alte Zellkulturflasche rückgeführt, kryokonserviert oder verworfen.

2.2.2. Zellzahlbestimmung

Zur Bestimmung der Zellzahl wurde zunächst, wie unter 2.2.1 beschrieben, ein Zellpelett gewonnen und in 1 ml Zellkulturmedium resuspendiert. Aus der Suspension wurden 10 µl entnommen und zusammen mit 90 µl Trypan-Blau in ein 1 ml Tube überführt. Dann wurden 10 µl entnommen und unter den Objektträger einer Neubauer-Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop stellten sich nun die vitalen Zellen hell dar, während die abgestorbenen Zellen den blauen Farbstoff annahmen. Die vitalen Zellen wurden in den vier Quadranten der Zählkammer gezählt und dann der Durchschnittswert berechnet. Dieser Wert wurde mit 10^5 multipliziert und entsprach der durchschnittlichen Zellzahl in 1 ml Medium.

2.2.3. Kryokonservierung und Rekultivierung

Bei einer Konfluenz von 90 – 100 % wurden die Zellen, wie unter 2.2.1. beschrieben, abgelöst und ein Zellpelett gewonnen. Dies wurde mit 1 ml Einfriermedium bestehend aus gibco™FBS + 15 % gibco™ DMSO resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und anschließend bei – 80 °C gelagert.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen in einem warmen Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Ein 15 ml Cellstar®-Röhrchen wurde unter der Sterilbank mit 10 ml des auf 37 °C vorgewärmten Zellkulturmediums gefüllt. Anschließend wurden die Zellen in das Röhrchen überführt und dann bei 1200 rpm für fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet anschließend mit 7 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine 25 cm² Nunc™-Zellkulturflasche überführt. Dann erfolgte die weitere Kultivierung im Inkubator bei 37 °C.

2.3. Experimente mit Zellkulturen

Für die in den folgenden Abschnitten beschriebenen Experimente wurde PBS ohne Ca^{2+} , ohne Mg^{2+} verwendet. Es wird im Folgenden kurz als PBS bezeichnet. Für die Untersuchungen in experimenteller Hypoxie wurde eine spezielle Hypoxiekammer von Billups-Rothenberg® Inc.; USA genutzt.

Zur quantitativen Bestimmung der Anzahl vitaler Zellen wurde ein kolorimetrisches Verfahren genutzt. Nach entsprechender Vorbereitung der Zellkulturen in 96 Well Platten erfolgte die Zugabe des CellTiter96® von Promega Corporation®, Madison. Nach ein bis maximal vier Stunden Inkubation bei 37 °C folgte die Messung der Absorption im Photometer bei einer Wellenlänge von 490 nm. Die Menge der nach Zugabe des CellTiter96® entstehenden Formazan war direkt proportional zur Menge der lebenden Zellen [168].

2.3.1. Kultivierung unter experimenteller Hypoxie

Alle Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten unter der Sterilbank.

Auf den Kammerboden wurde eine mit 20 ml destilliertem Wasser gefüllte Petrischale gestellt. Eine 96 Well Platte wurde mit 5000 Zellen/Well in 100 µl Medium/Well vorbereitet. Dann wurde die Platte in die Hypoxiekammer gesetzt und diese verschlossen. Über einen Zugang an der Seite wurde für vier Minuten ein hypoxisches Gasgemisch aus 2 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid und 93 % Stickstoff in die Kammer geleitet, während gleichzeitig Gas über einen Ausgang entweichen konnte. Dann wurden die Schläuche für Gaszugang und Gasausgang mit einer Klemme luftdicht verschlossen und die Kammer für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der beschriebene Vorgang erneut für vier Minuten wiederholt um möglicherweise enthaltenes Restgas aus der Zellkultur auszuspülen. Schließlich wurde die luftdicht verschlossene Hypoxiekammer für die entsprechenden Untersuchungszeiträume bei 37 °C im Inkubator gelagert.

Nach Ablauf des Untersuchungszeitraums (24 oder 72 Stunden) wurde die Hypoxiekammer unter der Sterilbank geöffnet und die 96 Well Platte entnommen. Anschließend wurden pro Well 20 µl CellTiter96® dazugegeben und für drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Es folgte die Messung der Absorption im Photometer bei einer Wellenlänge von 490 nm.

2.3.2. Beeinflussung der durch Hypoxie und ROS regulierten Signalwege

Unter der Sterilbank wurden 96 Well Platten mit je 5000 Zellen/Well in 100 µl Medium/Well vorbereitet. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert, damit sich die Zellen auf den Boden der Well festsetzten. Dann wurde das Zellkulturmedium mit einer Glaspipette abgesaugt. Es wurden 50 µl Medium pro Well aufgefüllt, um während der weiteren Arbeit ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl in Zellmedium gelöster Chemikalien in doppelter Konzentration um auf die gewünschte Endkonzentration zu kommen (s. Tabelle).

Die fertigen Platten wurden 72 Stunden bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden pro Well 20 µl CellTiter96® hinzugegeben und drei Stunden bei 37 °C inkubiert. Nachfolgend erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 490 nm.

Tabelle 1: Liste der zugefügten Substanzen und genutzten Konzentrationen. Aus der Stocklösung wurde jeweils mit entsprechendem Lösungsmittel ein Ansatz hergestellt. Dieser wurde in Konzentration der IC₅₀ (25 %) und dessen vierfacher Konzentration (100 %) verwendet. Die IC₅₀ Konzentrationen sind überwiegend aus der Literatur entnommen. Dort wo keine Literaturquelle angegeben ist, entstammen die Werte Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe [AG].

Name	Stocklösung	Lösungsmittel	Menge im Ansatz	Ansatz: Verdünnung Stock	IC ₅₀ bzw. eingesetzte Konzentration	Verwendete Endkonzentration (Ansatz im Mediumüberstand)
NSC23766	9,41 mM	H ₂ O	100 µM	1/100	50 µM [169]	100 % und 25 %
ATTM	20 mM	DMSO	20 µM	1/1000	5 µM [AG]	100 % und 25 %
CAS934593-90-5	10 mM	DMSO	10 µM	1/1000	0,7 µM und 2,6 µM [170]	100 % und 25 %
FM19G11	20 mM	DMSO	2 µM	1/5000	80 nm und 500 nM [171]	100 % und 25 %
KC7F2	100 mM	DMSO	100 µM	1/1000	20 µM [172]	100 % und 25 %
CAS882268-69-1	17,4 mM	DMSO	20 µM	1/870	50-10 µM [173]	100 % und 25 %
Trigonel-	1000 mM	H ₂ O	1 µM	1/1000	233 µM	100 % und

line					± 0,12 µM [174, 175]	25 %
Luteolin	20 mM	DMSO	200 µM	1/100	50 µM [AG]	100 % und 25 %
Cucur- bitacin B	35,6 mM	DMSO	356 µM	1/100	89 µM [176]	100 % und 25 %
DMOG	171,3 mM	DMSO	1 µM	1/171.3	0,1-1 mM [177]	100 % und 25 %
CAY1058 5	22,98 mM	DMSO	30 µM	1/766	0,7-2,6 µM [178], 3 µM [AG]	100 % und 25 %
CoCl₂	250 mM	H ₂ O	2,5 µM	1/1000	2,5 µM [AG]	100 % und 25 %
Rapa- mycin	1 mM	DMSO	0,1 µM	1/10000	1 nM [AG] 0,1 nM, 5 nM, 10 nM [179]	100 % und 25 %
Apocynin	10 mM	H ₂ O	10 µM	1/1000	10 µM [180]	100 % und 25 %
DPI	10 mM	DMSO	10 µM	1/1000	10 µM [AG] IC ₅₀ : 1-4 µM [181]	100 % und 25 %

2.3.3. Bestimmung ROS-positiver Zellen im Fluoreszenzbild-basierten Zytometer (Tali™)

Für die Bestimmung der ROS-positiven Zellen wurde das fluoreszenzbild-basierte Zytometer Tali™ benutzt.

Unter der Sterilbank wurden 6 Well Platten mit 3×10^5 Zellen/Well in 2 ml Medium/Well vorbereitet. Nach Inkubation bei 37 °C für 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Well mit 1 % PBS gewaschen. Das PBS wurde mit einer Glaspipette abgesaugt.

Die folgenden Schritte erfolgten unter lichtarmen Bedingungen:

Zunächst wurde Dihydroethidium (DHE) in einer Verdünnung von $1:4 \times 10^{-6}$ mit PBS angesetzt. Von dieser Lösung wurden pro Zelllinie jeweils 3 ml pro Well in zwei Well

gegeben. Als Versuchskontrolle dienten zwei Well mit je 3 ml PBS. Anschließend wurden die 6 Well Platten für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dann wurde das DHE abgesaugt und die entsprechenden Well zweimal mit 1 % PBS gewaschen. Das PBS wurde anschließend mit einer Glaspipette aus allen Well abgesaugt und durch je 1 ml 4 % Paraformaldehyd (PFA) pro Well ersetzt. Es folgte eine erneute Inkubation für 10 Minuten bei 37 °C. Im Anschluss wurde das PFA abgesaugt und die Well erneut zweimal mit 1 % PBS gewaschen.

Aus einem der mit DHE behandelten Well und einem der PBS-Kontrollen wurde das PBS abgesaugt und durch je 3 ml 0,05 % gibco™ Trypsin/EDTA Lösung ersetzt. Es folgte eine erneute Inkubation bei 37 °C bis sich die Zellen vollständig vom Boden gelöst hatten. Dann wurde das Trypsin durch Zugabe von je 3 ml PBS neutralisiert. Diese Zellsuspensionen wurden nun jeweils in 15 ml Röhrchen aufgenommen, bei 3500 rpm für fünf Minuten zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Das jeweilige Zellpellet wurde in 25 µl 1 % PBS gelöst und auf eine Tali™-Messkarte gegeben. Zunächst wurde für die jeweilige Zelllinie die PBS-Kontrolle gemessen und zur Eichung die Autofluoreszenz als Schwellenwert markiert. Dann folgte die Messung des DHE-Pellets mittels fluoreszenzbildbasierter Zytometrie.

Die in der 6 Well Platte verbliebenen Well wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und dienten der Kontrolle.

2.3.4. Kultivierung für Immunhistologie

Unter der Sterilbank wurden 24 Well Platten mit je einem Deckgläschen pro Well vorbereitet. Anschließend wurden in diese Well je 2×10^5 bis 5×10^5 Zellen pro Well in 1 ml Medium ausgesät. Die Kultivierung erfolgte bei 37 °C im Inkubator bis die Deckgläser zu 95 – 100 % mit Zellen bedeckt waren (ca. drei Tage). Dann wurde das Medium vorsichtig mit einer Glaspipette abgesaugt und die Well mit 1 ml 1 % PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und durch je 1 ml PBS mit 4 % PFA pro Well ersetzt. Nach Inkubation für 30 Minuten bei 37 °C wurde das PFA abgesaugt und die Well zweimal mit 1 % PBS gewaschen, wobei bei der letzten Waschung ein Rest PBS auf den Deckgläsern verblieb, damit das Präparat nicht austrocknete. Die mit PBS benetzten Deckgläser konnten so bis zur Färbung im Kühlschrank gelagert werden.

2.4. Proteinbiochemische Methoden

Für die in den folgenden Abschnitten beschriebenen proteinbiochemischen Verfahren wurde PBS ohne Ca^{2+} , ohne Mg^{2+} verwendet. Es wird im Folgenden kurz als PBS bezeichnet.

2.4.1. Proteinextraktion

Genutzt wurden hier die Melanomzelllinien A375, Preyer, MeWo, IGR-1, MC und Sk-Mel 28, sowie die Melanozytenzelllinie HEMa-LP.

Unter der Sterilbank wurden 25 cm² NuncTM-Zellkulturflaschen mit 5×10⁵ Zellen/Flasche ausgesät und über Nacht kultiviert. Dann wurde das Medium mit einer Glaspipette abgesaugt und nach einmaligem Waschen mit 1 % PBS wurde 10 ml frisches Medium je Flasche eingefüllt. In eine Zellkulturflasche der Zelllinie A375 wurde zusätzlich 5 ml Zellkulturmedium mit 100 µM CoCl₂ gegeben.

Die unbehandelten Zellen wurden bei 37 °C für 72 Stunden kultiviert, die CoCl₂-Flasche für 24 Stunden. Anschließend wurden die Zellen, wie unter 2.2.1. beschrieben, abgelöst und das gewonnene Zellpellet in 1 ml 1 % PBS resuspendiert. Die Suspension wurde erneut bei 3500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit 500 µl NP40 Zelllysepuffer mit 1 % Proteaseinhibitor (gekühlt) in ein 2 ml Tube überführt und auf Eis gelagert. Die so hergestellte Zellsuspension wurde mit einem Dispergierwerkzeug für ca. 30 Sekunden zerkleinert. Dann wurde die Suspension bei 13500 rpm für zwei Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt und das Pellet verworfen.

Die so vorbereiteten Protein-Proben waren bei -20 °C für vier bis sechs Monate haltbar.

Zur Bestimmung der Proteinmenge standen ein *BCA Protein Assay Kit* von Thermo Fisher Scientific®, Watlham, USA und ein *Protein Assay Kit II* von Bio-Rad® Laboratoris GmbH, München, Deutschland zur Verfügung.

Laut Herstellerangaben war der Zelllysepuffer für das Produkt von Thermo Fisher® auf 5 % und bei Bio-Rad® auf 0,1 % zu verdünnen.

Es wurde eine Verdünnungsreihe aus bovinem Serumalbumin (BSA) mit den jeweiligen Produkten getestet, sowie eine Verdünnungsreihe mit denselben BSA-Konzentrationen unter Zugabe der 5 % NP40 Lysepuffer mit 0,05 % Proteaseinhibitor für das Thermo Fisher® Produkt bzw. 0,1 % NP40 Lysepuffer mit 0,001 % Proteaseinhibitor für das Bio-Rad® Produkt.

Nach 30 Minuten bei 37°C erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei 562 nm (Thermo Fisher®), bzw. nach 5 Minuten bei Raumtemperatur die Messung bei 595 nm (Bio-Rad®). Die erhaltenen Messwerte wurden in eine Microsoft® Excel-Tabelle übertragen und eine Standardkurve erstellt (s. Abb. 1, Abb. 2).

Da die Messwerte nach Zugabe des Lysepuffers bei dem Bio-Rad® Produkt stärkere Abweichungen zur BSA-Standardkurve zeigten, wurde für die weitere Arbeit das Thermo Fisher® Produkt verwendet.

Bei der Arbeit mit den Protein-Proben wurde streng darauf geachtet, dass die Proben auf Eis gelagert waren. Um in den Proben eine NP40 Lysepufferkonzentration von 5 % zu erreichen, wurden diese mit 1 % gekühlten PBS verdünnt. Anschließend erfolgte die Proteinmengenbestimmung nach Herstellerprotokoll des *BCA Protein Assay Kits*.

Für die Zelllinie Sk-Mel 28 konnte wiederholt keine ausreichende Proteinmenge gewonnen werden, weshalb diese Zelllinie für den Westernblot nicht weiter analysiert wurde.

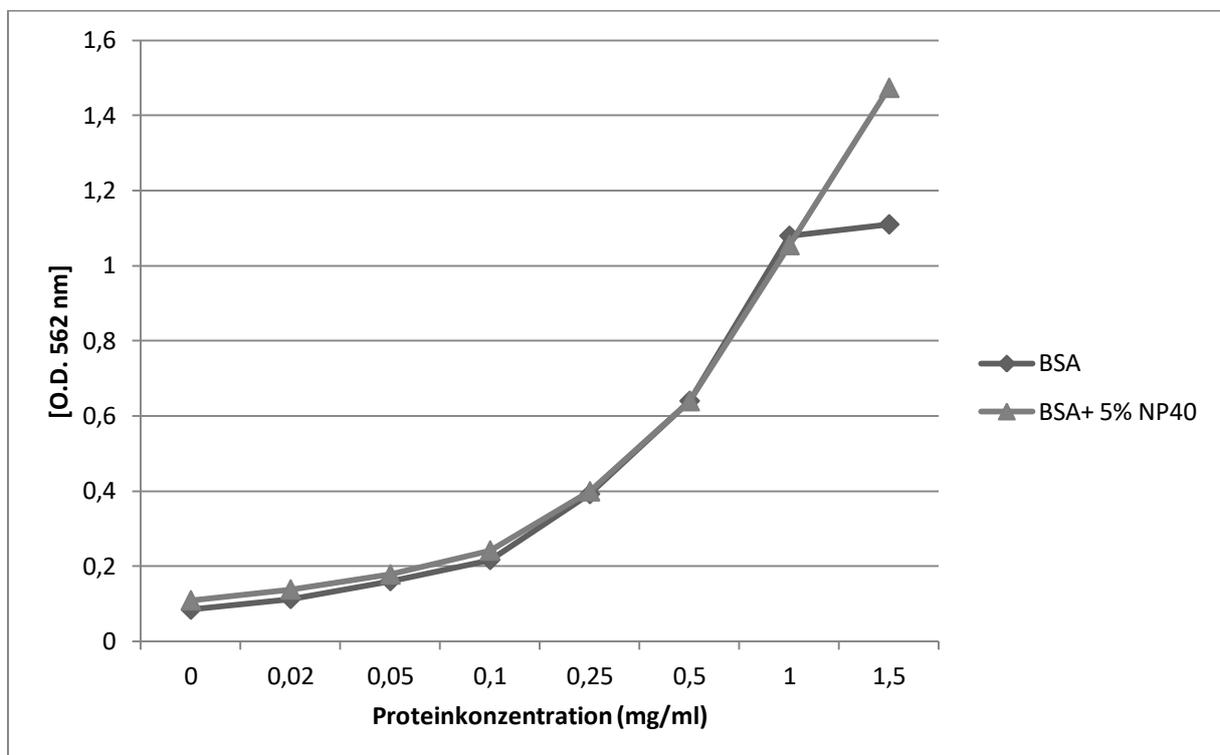


Abbildung 1: Thermo Fisher® *BCA Protein Assay Kit*. Standardkurven von BSA und BSA mit 5 % NP40 Lysepuffer und 0,1 % Proteaseinhibitor. Die Kurven sind fast deckungsgleich.

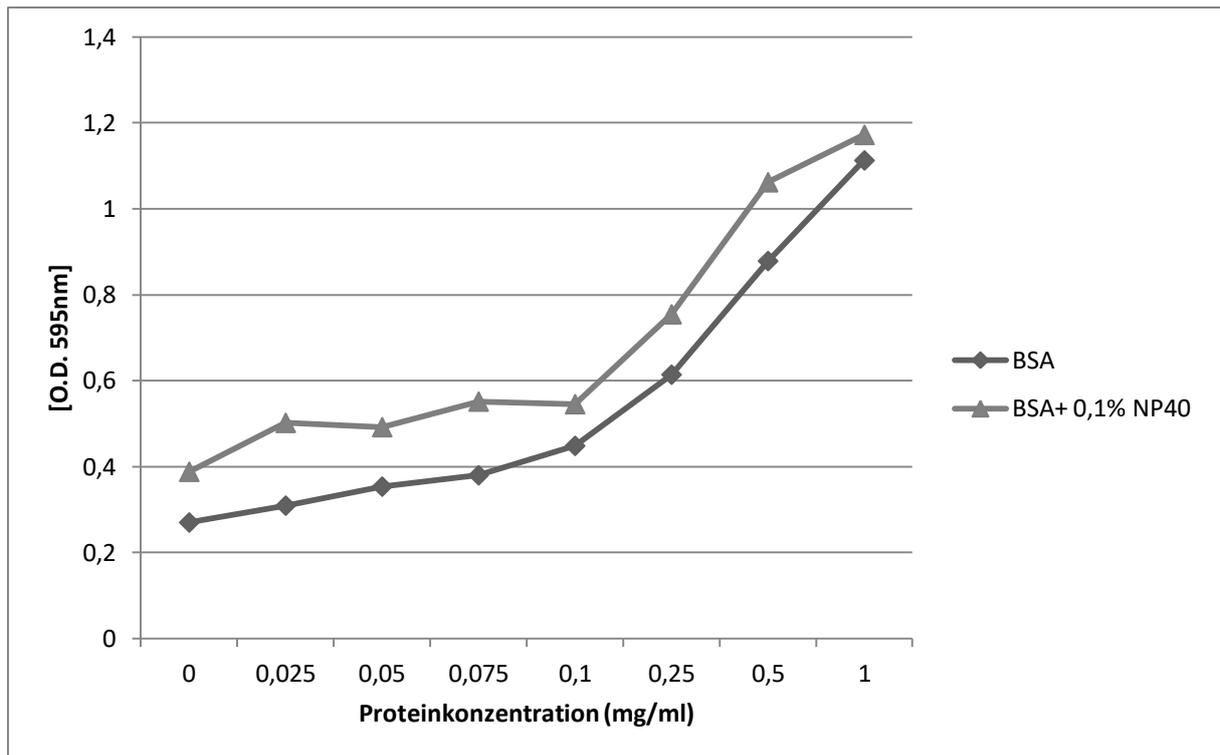


Abbildung 2: Bio Rad® Protein Assay Kit II. Standardkurven von BSA und BSA mit 0,1 % NP40 Lysepuffer und 0,001 % Proteaseinhibitor. Deutliche Abweichung der Kurven von einander.

2.4.2. Trennung der Proteine mittels Gelelektrophorese

Für die Trennung der Proteine wurden 4 – 12 % Bis-Tris NuPAGE® Novex Midi Gele mit 20 Well genutzt. Zur Molekulargewichtsbestimmung wurden 10 µl/Well der PageRuler™ Protein Ladder (10 - 250 kDa) verwendet. Von dem Gesamtproteinextrakt wurden 20 µg/Well verwendet. Das Gesamtproteinextrakt wurde in einem Verhältnis 4:1 mit Probenpuffer angesetzt und je 20 µl der fertigen Lösung in jedes Well pipettiert.

Die verwendeten Midi-Gele wurden bei der Auswertung als vier Mini-Gele verwendet, daher wurden jeweils 10 Well des Gels als ein Mini-Gel betrachtet. Für jede Zelllinie wurde ein Well pro Mini-Gel verwendet.

Die Elektrophorese wurde mit 1X MES SDS-Running Buffer durchgeführt. Dazu wurde der 20X Stock entsprechend mit deionisiertem Wasser verdünnt. Bei 200 V und 160 - 200 mA (Start) /120 – 170 mA (Ende) erfolgte für 40 Minuten die Elektrophorese in der XCell4 SureLock™ Midi-Cell.

2.4.3. Transfer der Proteine auf eine Membran

Nachdem die Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt worden waren, erfolgte der Transfer auf eine iBlot® PVDF-Membran. Dies geschah mit Hilfe des *Dry-Blot-Systems iBlot®* entsprechend des Geräteprotokolls. Der Blotvorgang erfolgte für sieben Minuten bei 20 V.

Um zu überprüfen, ob die Proteinbanden auf die Membranen übertragen wurden, erfolgte die Behandlung mit Ponceau S. Bei erfolgreichem Transfer stellten sich die Banden rot dar. Nach Auswaschen des Ponceau S mit deionisiertem Wasser konnte mit den immunhistochemischen Färbungen fortgefahren werden.

2.4.4. Immunhistochemischer Antigennachweis

Nach erfolgreichem Proteintransfer erfolgte zunächst die Blockade unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran. Dazu wurde diese für eine Stunde bei Raumtemperatur (oder bei 4 °C über Nacht) mit Blockierlösung, bestehend aus 5 % BSA und 0,1 % Tween 20 in PBS, behandelt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den entsprechenden primären Antikörpern (s. Tab. 2) für zwei Stunden bei Raumtemperatur (oder bei 4 °C über Nacht).

Anschließend erfolgte für je fünf Minuten dreimaliges Waschen mit Waschpuffer bestehend aus PBS mit 0,1 % Tween 20.

Dann wurde die Lösung mit dem sekundären Antikörper auf die Membranen gegeben und bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer für je fünf Minuten konnte mit der Detektion fortgefahren werden.

Tabelle 2: Verdünnungen der verwendeten Antikörper

Primäre Antikörper			Sekundäre Antikörper		
	Wirt	Verdünnung mit Blockierlösung		Wirt	Verdünnung mit Blockierlösung
Anti-HIF1α	Hase	1:1000	WesternSure® anti-Rabbit HRP	Ziege	1:5x10 ⁴
Anti-HIF2α	Hase	1:1000			
Anti-Nrf2	Hase	1:1000			
Anti-β-Aktin	Maus	1:1000	WesternSure® anti-Mouse HRP	Ziege	1:5x10 ⁴

Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit dem *C-DiGit*® Detektions-System und zugehöriger Software *Image Studio*™ (Version 4.0) unter Verwendung von *WesternSure*® *Premium Chemiluminescent Substraten* von Li-Cor® Inc., Lincoln, USA.

2.5. Immunhistologische Methoden

2.5.1. Färbung von Paraffinschnitten

Einzelne Gewebepräparate von malignen Melanomen wurden mit verschiedenen Antikörperkombinationen (s. Tab. 3) gefärbt. Die Präparate wurden im Rahmen der diagnostischen Routine der Universitätshautklinik Magdeburg nach entsprechender Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Patienten entnommen. Gefärbt wurden sie jeweils mit einer Kombination aus Antikörpern gegen Hypoxiemarker und Stammzellmarker.

Bei der Auswertung der Präparate zeigte sich, dass der Antikörper Melan A in seiner Bindung und Kombination mit einem 350 nm Sekundärantikörper zu wenig spezifisch für Melanomzellen war. Daher wurde Melan A bei Antikörperkombination AK 5 (s.u.) durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI ersetzt, der DNA und damit die Zellkerne markiert.

2.5.2. Färbung von Zellkulturpräparaten

Die Zellen wurden, wie unter 2.3.4. beschrieben, auf Deckgläschen kultiviert. Diese wurden entweder direkt, oder nach Lagerung im Kühlschrank weiter verwendet.

Zunächst wurde Blockierlösung bestehend aus PBS ohne Ca^{2+} ohne Mg^{2+} mit 1% BSA, 10 % FSC und 0,25 % Fischgelatine angesetzt.

Zum Färben wurde das PBS aus den Well abgesaugt und die Glasplättchen vorsichtig aus den 24 Well entnommen. Die mit Zellen bewachsene Oberseite der Plättchen wurden dann fünf Minuten mit Blockierlösung unter Zugabe von Tween 20 permeabilisiert.

Dann wurde die Flüssigkeit von den Präparaten abgesaugt und diese anschließend zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde für 30 Minuten mit Blockierlösung behandelt um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren.

Nach Absaugen der Flüssigkeit wurden die Schnitte mit den primären Antikörpern, in entsprechender Verdünnung mit Blockierlösung, benetzt (s. Tab. 3). Es folgte die Inkubation für ca. drei Stunden bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank für maximal 24 Stunden.

Nach entsprechender Einwirkzeit wurde die Antikörperlösung abgesaugt und die Schnitte zweimal mit PBS gewaschen. Dann wurden die sekundären Antikörper in entsprechender Verdünnung aufgetragen (s. Tab. 3). Nach 30 Minuten wurde zweimal mit Waschpuffer gewaschen und abschließend einmalig mit destilliertem Wasser.

Die Flüssigkeit wurde von den Deckgläschen abgesaugt und diese schließlich mit einem Tropfen (ca. 3 µl) Mowiol® benetzt und mit der bewachsenen Seite nach unten auf einem Objektträger fixiert.

Tabelle 3: Antikörperkombinationen (AK) mit verwendeten Verdünnungen und Fluoreszenzspektrum der Sekundärantikörper. Bei der Färbung der auf Deckgläschen kultivierten Zellen wurde kein Melan A genutzt, dafür DAPI in einer Verdünnung von 1:4000

	Primärer Antikörper			Sekundärer Antikörper (AlexaFluor®)		
	Antigen	Wirt	Verdünnung	Wirt	Verdünnung	Wellenlänge
AK 1	Melan A	Ziege	1/200	Esel	1/1000	350
	ABCB5	Maus	1/200	Esel	1/1000	488
	HIF-1α	Hase	1/1000	Esel	1/1000	555
	VEGF	Huhn	1/100	Ziege	1/1000	633
AK 2	Melan A	Ziege	1/200	Esel	1/1000	350
	p75NGF	Maus	1/200	Esel	1/1000	488
	NRF2	Hase	1/200	Esel	1/1000	555
AK 3	Melan A	Ziege	1/200	Esel	1/1000	350
	CD133	Maus	1/100	Esel	1/1000	488
	HIF-2α	Hase	1/100	Esel	1/1000	555
AK 4	Melan A	Ziege	1/200	Esel	1/1000	350
	ALDH1A1	Hase	1/200	Esel	1/1000	488
	ABCB5	Maus	1/200	Ziege	1/1000	555
AK 5				DAPI	1/4000	350
	JARID 1B	Maus	1/200	Esel	1/1000	488
	NRF2	Hase	1/200	Esel	1/1000	555

2.6. Statistische Auswertung

Die Auswertung der Daten wurde in R-Studio (Version 3.4.1.) durchgeführt. Zur Untersuchung auf Gruppenunterschiede wurde eine Varianzanalyse durchgeführt. Der anschließende Post-hoc Test erfolgte mit einem Tukey's Test.

Wenn die Voraussetzungen für die Varianzanalyse nicht erfüllt waren, wurde als nichtparametrisches Äquivalent zur Varianzanalyse ein Kruskal-Wallis-Test durchgeführt. Für den anschließenden Post-Hoc-Test wurde Dunn's Test verwendet.

Einzelne Gruppenvergleiche zwischen unabhängigen Gruppen wurden nichtparametrisch mit einem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt. Um die Alphafehler-Kumulierung beim mehrfachen Testen zu korrigieren, wurde die Bonferroni-Holm-Prozedur genutzt.

Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant (*) angesehen, ein p-Wert kleiner 0,01 als hoch signifikant (**) und ein p-Wert kleiner als 0,001 als höchst signifikant (***).

Lediglich für den Themenpunkt 3.1. erfolgte die Datenauswertung mittels Microsoft® Excel® 2007.

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchung auf reaktive Sauerstoffspezies

Zunächst wurden die Zelllinien auf das Vorhandensein von ROS untersucht und der Anteil der Zellen bestimmt, die eine erhöhte Konzentration aufwiesen.

Dihydroethidium (DHE) ist ein Redox-Indikator, dessen Ausgangszustand eine blaue Fluoreszenz aufweist. In Anwesenheit von Sauerstoffradikalen wird es zu Ethidium oxidiert und weist dann eine rote Fluoreszenz auf [182, 183].

Nach Zugabe von DHE zu den hier untersuchten Zellkulturen fluoreszierten daher solche Zellen rot, die über große Menge ROS verfügten. Die Anwendung eines Fluoreszenzbild-basierten Zytometers (Tali™) ermöglichte die gleichzeitige Zellzählung und Bestimmung der Fluoreszenz der einzelnen Zellen. So wurde die Einteilung und Quantifizierung von Zellen mit erhöhter und normaler ROS-Menge möglich.

Untersucht wurden in dieser Versuchsreihe die Melanomzelllinien A375, Preyer, IGR-1, MeWo und Sk-Mel 28 sowie die Melanozytenzelllinie HEMa-LP.

Abbildung 3 zeigt zwei Aufnahmen, die während der Messung von HEMa-LP und IGR-1 erstellt wurden. In diesen Ausschnitten ist der Anteil an Melanozyten (Abb. 3a) mit roter Fluoreszenz (erhöhte ROS-Menge) geringer als der Anteil an Melanomzellen (Abb. 3b) mit roter Fluoreszenz.

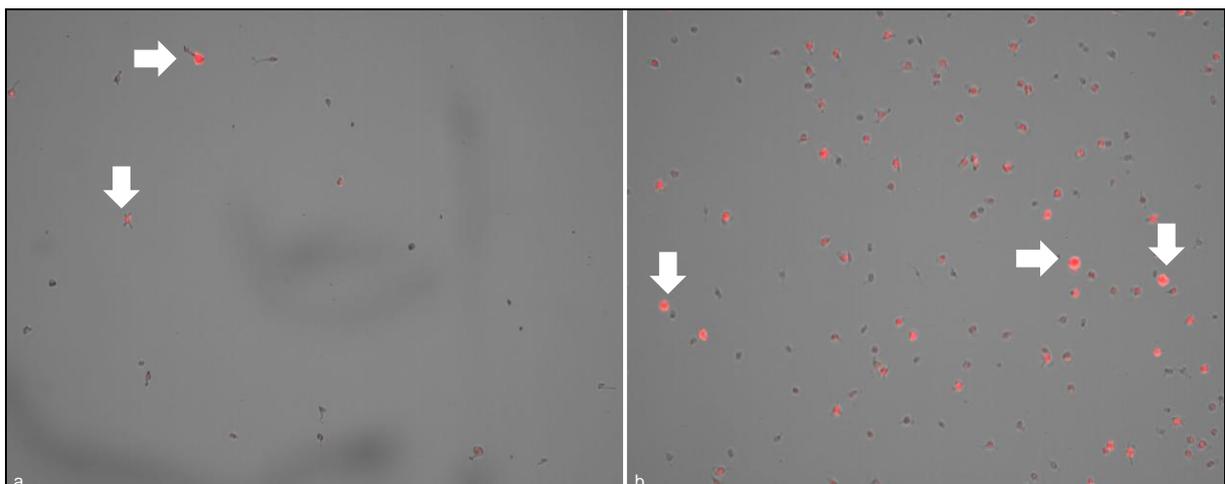


Abbildung 3: Fluoreszenzbild-basierte Zytometrie. a. Melanozyten HeMa-LP. b. IGR-1: Rot dargestellt sind die Zellen mit Fluoreszenz, die durch Oxidation des DHE zu Ethidium entsteht. Diese Zellen weisen eine erhöhte ROS-Menge auf. Die Pfeile deuten beispielhaft auf fluoreszierende Zellen.

Bestimmt wurden jeweils die Gesamtzahl der untersuchten Zellen, die Fluoreszenz der einzelnen Zellen sowie die Zellgröße.

Um Zelltrümmer und Konglomerate bei der Auswertung herauszufiltern, wurden die Zellen auf solche mit einem Durchmesser von 5 – 60 µm eingegrenzt. Von den so selektierten Zellen wurde der durchschnittliche Fluoreszenzwert ermittelt und als Grenzwert verwendet. Nur bei Zellen deren Fluoreszenz über diesem Wert lag wurde eine vermehrte ROS-Produktion angenommen. Diese Zellen wurden als „ROS-positiv“ bezeichnet.

Die unter Verwendung dieser Kriterien gewonnenen Ergebnisse sind in Abbildung 4 graphisch dargestellt. Es zeigte sich deutlich, dass die Melanozytenzelllinie HeMa-LP über den geringsten Anteil ROS-positiver Zellen verfügte. Innerhalb der Melanomzellen variierten die Werte ROS-positiver Zellen zwischen 37 % bis 53 %.

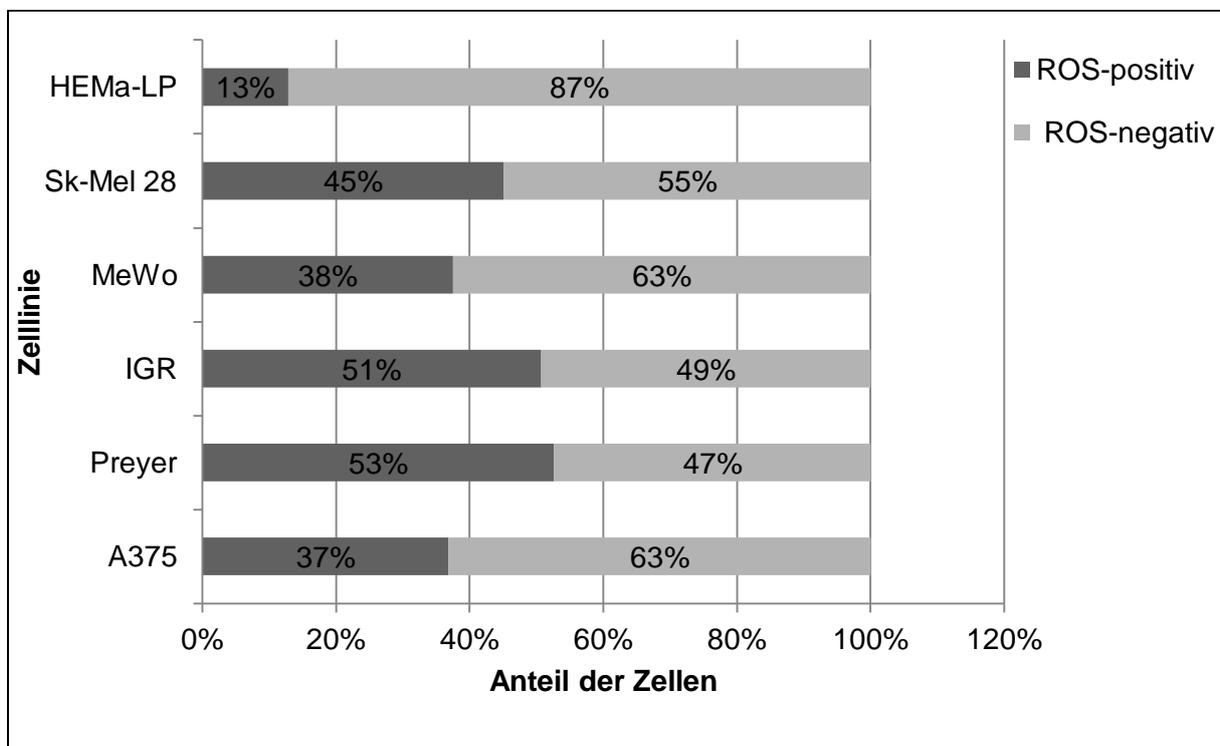


Abbildung 4: Prozentualer Anteil der Zellen mit vermehrter ROS-Menge an der Gesamtzahl der Zellen.

3.2. Westernblot

Mittels eines Westernblots wurden die Zelllinien A375, Preyer, MeWo, IGR-1, MC und HEMa-LP auf die Expression der Hypoxiemarker HIF-1 α , HIF-2 α und Nrf2 untersucht. Um zu zeigen, dass jeweils dieselbe Proteinmenge verwandt wurde, diente als Ladekontrolle β -Aktin mit einem Molekulargewicht von 42 kDa. Das Molekulargewicht der untersuchten Hypoxiemarker betrug 100 – 120 kDa für HIF-1 α , 120 kDa für HIF-2 α sowie 95-110 kDa für Nrf2 [184–186]. Die erhaltenen Banden des Westernblots sind in Abbildung 5 dargestellt.

Mit der Software *Image Studio*TM war es möglich, aus der Gesamt-Fluoreszenz der Blot-Banden die Signalstärke einer einzelnen Banden zu ermitteln ($Signal=Total-Area \times Background$). Die so erhaltenen Messwerte ermöglichten Rückschlüsse auf die Proteinmenge der untersuchten Hypoxiemarker (s. Abb. 6).

Durch Zugabe von Kobaldchlorid (CoCl₂) lässt sich die Wirkung von Hypoxie auf Zellen simulieren. Es führt zu einer Stabilisierung und Aktivierung von HIF-1 α [187–189].

Von allen untersuchten Zelllinien fanden sich bei Melanozyten die geringsten Proteinmengen der Transkriptionsfaktoren, wobei für HIF-2 α und Nrf2 die Banden auf der Westernblot-Membran mit dem Auge kaum sichtbar waren.

Insgesamt zeigten alle untersuchten Zelllinien die höchsten Messwerte für HIF-1 α . Die geringsten Mengen fanden sich bei Nrf2. Lediglich die Zelllinie IGR-1 wies mehr Nrf2 als HIF-2 α auf.

Unter den Melanomzellen war bei A375 die größte Menge an HIF-1 α nachweisbar, wobei die Werte nach CoCl₂ Behandlung noch höher ausfielen. Zudem wies A375 die höchste Proteinmenge von HIF-2 α auf, gefolgt von MC. Die geringste Proteinmenge HIF-2 α war unter den Melanomzellen bei IGR-1 festzustellen. Von allen Melanomzellen wies MeWo die geringste Menge HIF-1 α auf. Die Zellkultur IGR-1 verfügte über die größte Proteinmenge Nrf2, gefolgt von A375. Nach CoCl₂-Behandlung zur Simulation von Hypoxie und Aktivierung von HIF-1 α kam es zu einer Abnahme der Menge HIF-2 α und Nrf2 bei A375.

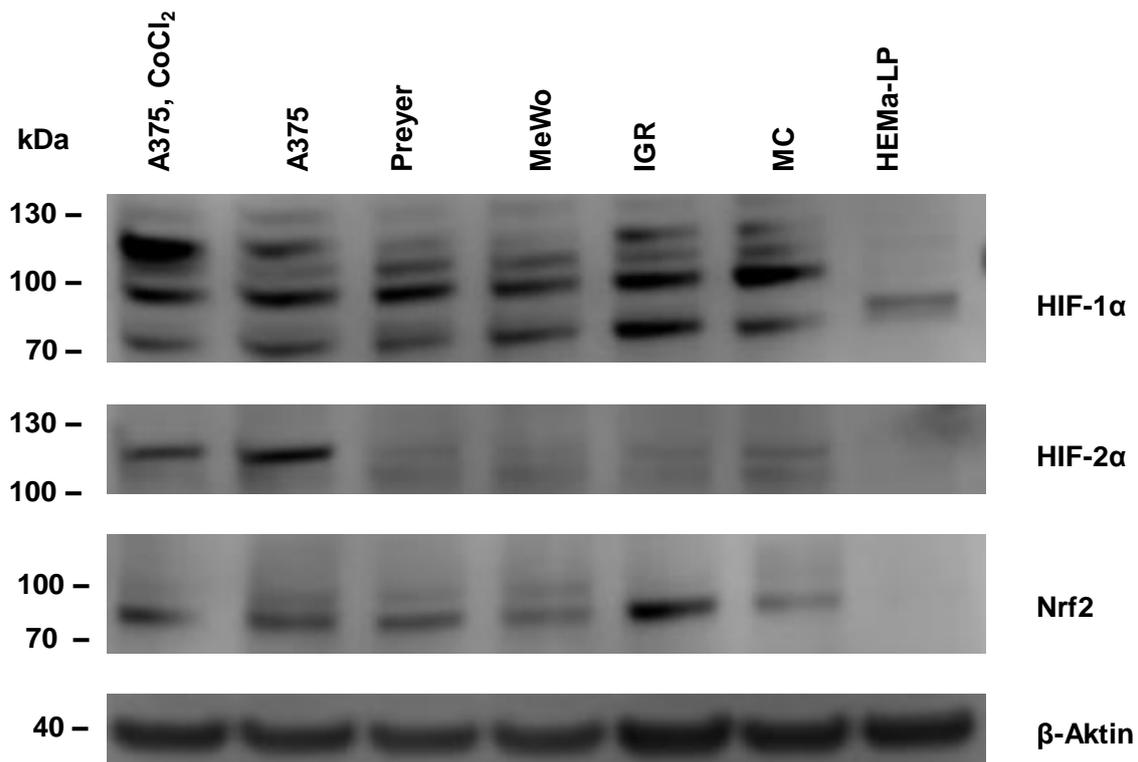


Abbildung 5: Westernblot. Proteinbanden der Hypoxiemarker HIF-1α, HIF-2α und Nrf2. β-Aktin als Ladekontrolle.

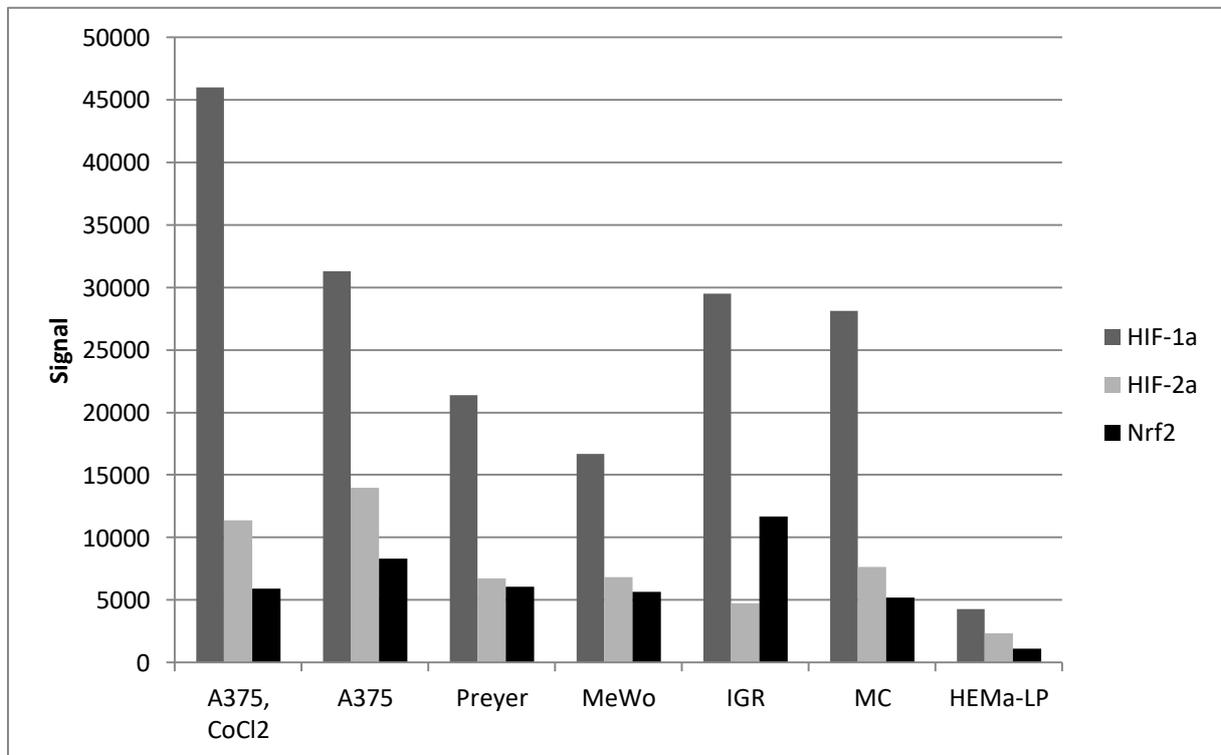


Abbildung 6: Darstellung der absoluten Signalintensitäten bei Messung im Li-Cor® C-Digit®.

3.3. Experimentelle Hypoxie

Anschließend wurde der Einfluss eines reduzierten Sauerstoffangebots auf das Wachstumsverhalten der Melanozyten HEMa-LP und der Melanomzellen MeWo, Sk-Mel 28, MC, A375 und Preyer untersucht. Dazu wurden die Zelllinien, wie unter 2.3.1. beschrieben, unter Hypoxie kultiviert um HIF-1 α zu induzieren. Die Zellen wurden entweder für 24 Stunden hypoxisch behandelt (und anschließend für 48 Stunden unter Normoxie kultiviert) oder komplett hypoxisch für 72 Stunden bei 2 % Sauerstoff kultiviert. Parallel dazu wurden als Referenzkulturen die jeweiligen Zelllinien für 72 Stunden unter normoxischen Bedingungen kultiviert. Zu Beginn des Experimentes wurde jeweils dieselbe Zellzahl pro Zelllinie in Kultur gebracht. Nach einer Gesamtkultivierungszeit von 72 Stunden erfolgte die photometrische Messung der optischen Dichte nach Zugabe des CellTiter96®.

Um eine Änderung des Wachstumsverhaltens unter Hypoxie besser beurteilen zu können, erfolgte eine Varianzanalyse mit den Messwerten der unter Hypoxie kultivierten Zellen und der entsprechenden Referenzkultur. Wurde dabei eine Signifikanz registriert erfolgte ein Post-hoc Test zur Analyse der Gruppenunterschiede. Eine signifikante Erhöhung der Messwerte wurde als Proliferationsstimulus, eine signifikante Verringerung als Proliferationshemmung interpretiert.

Die Abbildungen 7 - 9 zeigen die graphische Darstellung dieser Ergebnisse als Box-Blot. Die statistischen Daten finden sich in Tabelle 5 unter 10.1.1. im Anhang.

Die Melanozytenzelllinie HeMa-LP zeigte unter 24 Stunden Hypoxie eine hoch signifikante Proliferationssteigerung ($p < 0,01$) gegenüber der Normoxie-Kontrolle. Nach 72 Stunden Hypoxie ergab sich hier eine höchst signifikante Proliferationssteigerung ($p < 0,001$). Dabei wurde zudem eine höchst signifikante Zunahme der Proliferation zwischen 24 Stunden und 72 Stunden Hypoxie registriert ($p < 0,001$).

Die Datenanalyse der Melanomzelllinie A375 ergab nach 24 Stunden Hypoxie keinen signifikanten Proliferationsunterschied im Vergleich zur unter Normoxie kultivierten Referenz ($p > 0,05$). Nach 72 Stunden Hypoxie kam es zu einem höchst signifikanten Rückgang der Proliferation im Vergleich zu 24 Stunden Hypoxie sowie im Vergleich zur Referenzkultur ($p < 0,001$).

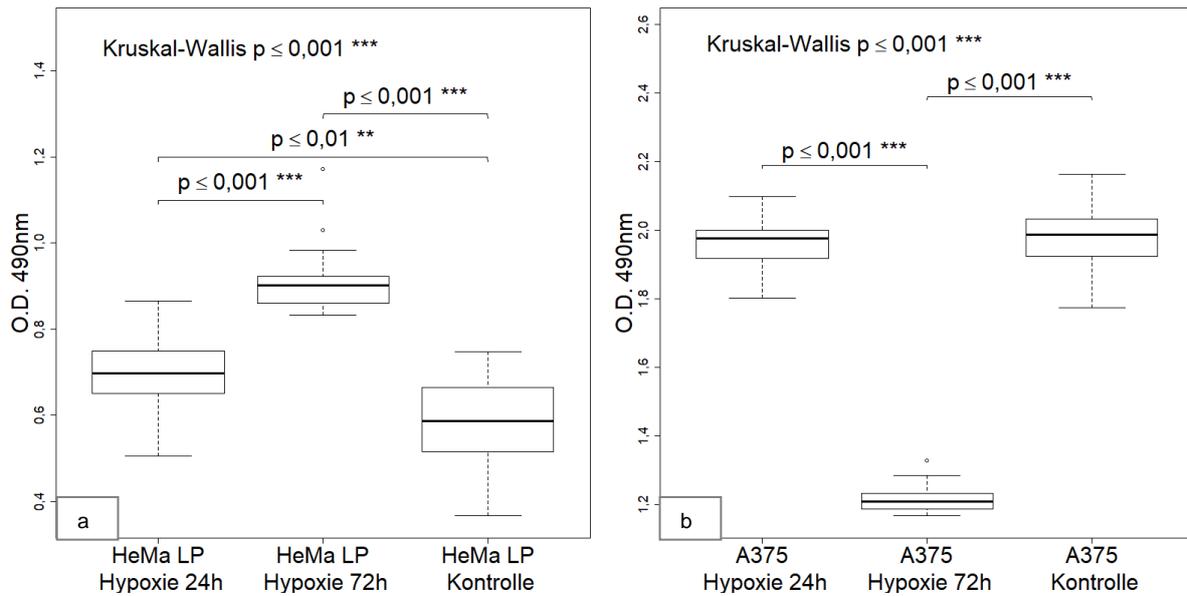


Abbildung 7 a. HeMa-LP. b. A375. Die Zelllinien wurden für 24 Stunden unter Hypoxie (+ 48 Stunden Normoxie) bzw. für 72 Stunden unter Hypoxie kultiviert. Die erhaltenen Messwerte der optischen Dichte wurden mit der unbehandelten Referenz (Kontrolle) sowie untereinander verglichen. Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

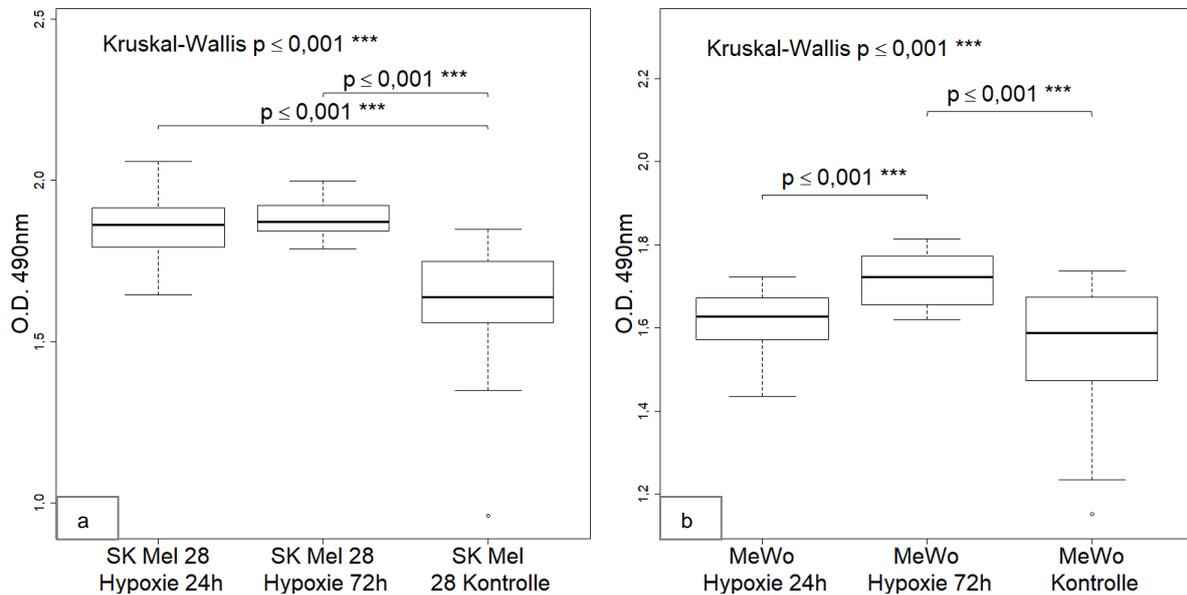


Abbildung 8 a. Sk-Mel 28. b. MeWo. Die Zelllinien wurden für 24 Stunden unter Hypoxie (+ 48 Stunden Normoxie) bzw. für 72 Stunden unter Hypoxie kultiviert. Die erhaltenen Messwerte der optischen Dichte wurden mit der unbehandelten Referenz (Kontrolle) sowie untereinander verglichen. Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Die Auswertung der bei Sk-Mel 28 gewonnenen Daten ergab eine höchst signifikante Proliferationssteigerung nach 24 Stunden Hypoxie sowie nach 72 Stunden Hypoxie ($p < 0,001$) im Vergleich zur Referenzkultur. Dabei ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der 24 Stunden und 72 Stunden Messung ($p > 0,05$).

Die Melanomzelllinie MeWo zeigte gegenüber der Referenzkultur nach 24 Stunden Hypoxie keine signifikante Änderung ihres Proliferationsverhaltens ($p > 0,05$). 72 Stunden Hypoxie führte zu einer höchst signifikanten Steigerung der Proliferation im Vergleich zur Referenzkultur sowie im Vergleich zur Messung nach 24 Stunden Hypoxie ($p < 0,001$).

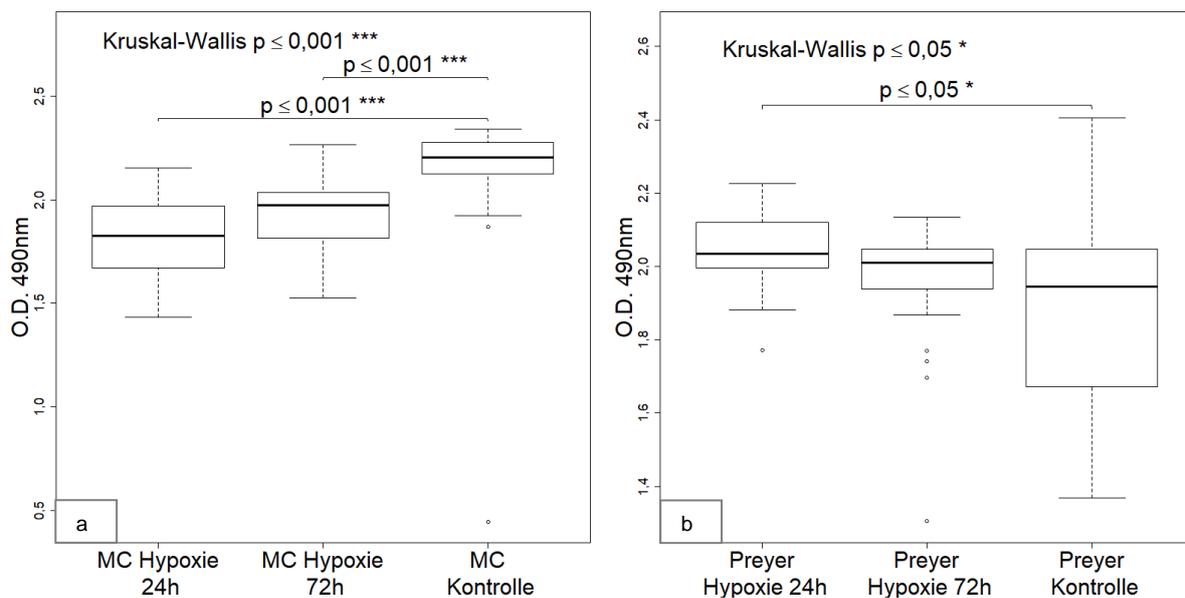


Abbildung 9 a. MC. b. Preyer. Die Zelllinien wurden für 24 Stunden unter Hypoxie (+ 48 Stunden Normoxie) bzw. für 72 Stunden unter Hypoxie kultiviert. Die erhaltenen Messwerte der optischen Dichte wurden mit der unbehandelten Referenz (Kontrolle) sowie untereinander verglichen. Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Bei der Zelllinie MC ergab sich nach 24 Stunden Hypoxie sowie nach 72 Stunden Hypoxie ein höchst signifikanter Rückgang der Proliferation im Vergleich zur Referenz ($p < 0,001$). Zwischen den Messwerten nach 24 Stunden Hypoxie und 72 Stunden Hypoxie ergab sich dabei kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

Nach 24 Stunden Hypoxie ergab sich bei Preyer bezogen auf die Normoxie-Referenz eine signifikante Steigerung der Proliferation ($p < 0,05$). Nach 72 Hypoxie zeigte sich keine signifikante Proliferationsänderung gegenüber der Referenz ($p > 0,05$). Auch zwischen den Messwerten nach 24 Stunden und 72 Stunden Hypoxie ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

3.4. Beeinflussung der durch Hypoxie und ROS regulierten Signalwege

In dieser Versuchsreihe wurden die Signalwege, die zur Anpassung an Hypoxie oder ROS führen, durch Zugabe von hemmenden und stimulierenden Chemikalien gezielt beeinflusst. Nach entsprechender Inkubationszeit wurde die optische Dichte der behandelten Zellkultur gemessen und mit dem Wert der optischen Dichte der unbehandelten Referenz-Kultur verglichen. Dabei festgestellte Unterschiede wurden als eine Änderung des Proliferationsverhaltens der Zellen interpretiert.

Für dieses Experiment wurden Melanomzellen und Melanozyten, wie unter 2.3.2. beschrieben, kultiviert und mit chemischen Inhibitoren und Stimulanzen (s. Tab. 1) behandelt. Diese Stoffe wurden entweder in DMSO (Reinheit $\geq 99,9\%$) oder in Wasser gelöst.

Die IC_{50} Konzentration, welche der Literatur oder den Herstellerinformationen entnommen wurden, wurde als 25 % Konzentration bezeichnet und ihr Vierfaches als 100 % Konzentration. Diese Ansätze wurden bei allen Zelllinien getestet.

Um eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch DMSO bei der Auswertung zu berücksichtigen, wurden solche Zellkulturen, die mit in DMSO gelösten Chemikalien behandelt wurden mit DMSO-behandelten Referenzkulturen verglichen. Diese wurden mit DMSO in der Verdünnung der in DMSO gelösten Substanzen versetzt. Dies wird im Folgenden als „100 % Kontrolle“ bzw. „25 % Kontrolle“ bezeichnet. Bei den in Wasser gelösten Substanzen diente als jeweilige Referenz die unbehandelte Zelllinie (weiter als „Kontrolle“). Nach 72 Stunden Inkubation erfolgte die Auswertung durch photometrische Messung der optischen Dichte bei 490 nm.

Um eine Änderung des Proliferationsverhaltens der Zellen besser beurteilen zu können wurden die Werte der Referenz-Kulturen als 100 % festgelegt. In den graphischen Darstellungen dieses Kapitels sind die Ergebnisse als prozentualer Anteil an der jeweiligen Referenz angegeben. Untersucht wurde, ob es signifikante Unterschiede zwischen den Messwerten der optischen Dichte von Referenz und behandelter Zelllinie gibt, sowie ob es Unterschiede zwischen den jeweiligen Konzentrationen gibt.

Tabelle 4 gibt eine kurze Übersicht über die Wirkungsmechanismen der in dieser Versuchsreihe verwendeten Substanzen.

Eine vollständige Auflistung der in den folgenden Abschnitten dargestellten statistischen Ergebnisse findet sich in tabellarischer Form unter 10.1.2. im Anhang.

Tabelle 4: Wirkungsmechanismus der zugegebenen Substanzen

Substanz	Wirkung
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Verlangsamt Tumorwachstum, ohne Apoptose auszulösen [190–192]. Bewirkt eine Differenzierung von Tumorzellen [193]. Scheint eine Hemmung des PI3K/Akt Signalwegs zu bewirken [194]
Cobalt(II) Chloride (CoCl₂)	Imitiert zelluläre Hypoxie und aktiviert so HIF-1 α [187–189].
Beeinflussung HIF-Signalwege	
CAS882268-69-1 (CAS88)	Hemmung der Translationseffekte von HIF-2 α , somit Unterdrückung HIF-2 α vermittelter Signalwege. Kein Effekt auf Transkription der HIF-2 α Zielgene, kein Effekt auf Stabilität der HIF-2 α Untereinheit [195].
CAS934593-90-5 (CAS93)	Blockiert die bei Hypoxie induzierte Akkumulation von HIF-1 α und somit die HIF-1-vermittelte Transkription. Kein Effekt auf Menge der zellulären HIF-1 α mRNA oder HIF-1 β [196–198].
CAY10585 (CAY)	Inhibitor der HIF-1 α Akkumulation und der HIF-1 vermittelten Transkription [196].
FM19G11	Verhindert die hypoxiebedingte Akkumulation von HIF-1 α und HIF-2 α . Verhindert so Aktivierung der HRE-Gene unter Hypoxie [199].
KC7F2	Verringert zelluläre HIF-1 α Synthese und dadurch die HIF-1 vermittelte Transkription. Kein Effekt auf HIF-1 β . Kein Effekt auf Stabilität von HIF-1 α [200].
Dimethyloxallyl Glycine (DMOG)	HIF-1 α Stabilisierung unter Normoxie, proangiogenetisch.[201, 202]
Beeinflussung NfκB Signalweg	
Ammonium tetrathiomolybdate (ATTM)	Reduziert Kupfer und bewirkt eine Hemmung der SOD 1. Wirkt hemmend auf Angiogenese und Tumorproliferation [203, 204] Zudem Inhibition NF κ B [205, 206]
Beeinflussung der ROS-Produktion	
Diphenyleneiodonium chloride (DPI)	Hemmung NADPH-Oxidase (NOX) und so Verringerung der zellulären ROS-Produktion [40].
Apocynin (Acetovanillone)	Hemmung NADPH-Oxidase (NOX) und so Verringerung der zellulären ROS-Produktion [40, 207].

Beeinflussung Nrf2	
Luteolin	Verringert zelluläre ROS-Produktion, hemmt NOX, moduliert ROS-verknüpfte Signalwege. Hemmt HIF1-Aktivität, Akt/mTOR-Signalweg, VEGF, NFκB und Produktion proinflammatorischer Zytokine [208]. Induziert Expression von ARE-Genen (antioxidant response element) und bewirkt Anstieg der mRNA- und Protein-Level von Nrf2 und Nrf2-Ziel-Genen. Hemmt die Produktion von NO und die NO-Synthase [209].
Trigonelline hydrochloride (Trig)	Hemmt Nrf2-Aktivität und Nrf2-Akkumulation [210] Verringerung von oxidativem Stress durch NOX-Hemmung [211].
Cucurbitain B hydrate (CuB)	Reduziert die zelluläre ROS-Produktion und führt zu einer Nrf2-Aktivierung [212] Hemmung der Aktivität von HIF-1α und NFκB. Verhindert HIF-1α Akkumulation und VEGF-Ausschüttung unter Hypoxie. Hemmt Tumorwachstum [213–215].
Beeinflussung Signalkaskaden	
NSC 23766 (NSC 23)	Selektiver Inhibitor der Rac1 vermittelten Signalwege, verringert Zellproliferation und Zellwachstum bei vorliegen Rac1-aktivierender Mutationen [169, 216].
Rapamycin (Rapa)	mTOR-Inhibitor, immunsuppressiv, antiproliferativ [217–219].

Beeinflussung der Messwerte durch DMSO

Für die Wirkung von DMSO ist ein hemmender Einfluss auf das Tumorwachstum sowie eine Inhibition des PI3K/Akt Signalweges beschrieben [191, 194].

Um eine Beeinflussung der Ergebnisse der gesamten Versuchsreihe durch die Verwendung von DMSO als Lösungsmedium festzustellen, wurde zunächst DMSO in 100 % und 25 % Konzentration zu den Zellkulturen A375, Preyer, IGR-1, MeWo, Sk-Mel 28 und HEMA-LP gegeben. Als Referenzkultur dienten die jeweiligen unbehandelten Zelllinien. In Abbildung 10 sind die Ergebnisse als prozentualer Anteil an der Kontrolle dargestellt. Die statistischen Daten zu dieser Abbildung finden sich in Tabelle 6 im Anhang.

Die Zugabe von DMSO führte in beiden getesteten Verdünnungen bei Preyer und IGR-1 und zu signifikant erhöhten Werten der optischen Dichte. Bei A375, Sk-Mel 28 und HeMa-LP

ergab sich durch DMSO keine signifikante Änderung der Messwerte. Bei MeWo führte die 25 % Konzentration zu einer signifikanten Erhöhung der Messwerte, während die 100 % Konzentration keine signifikante Änderung bewirkte.

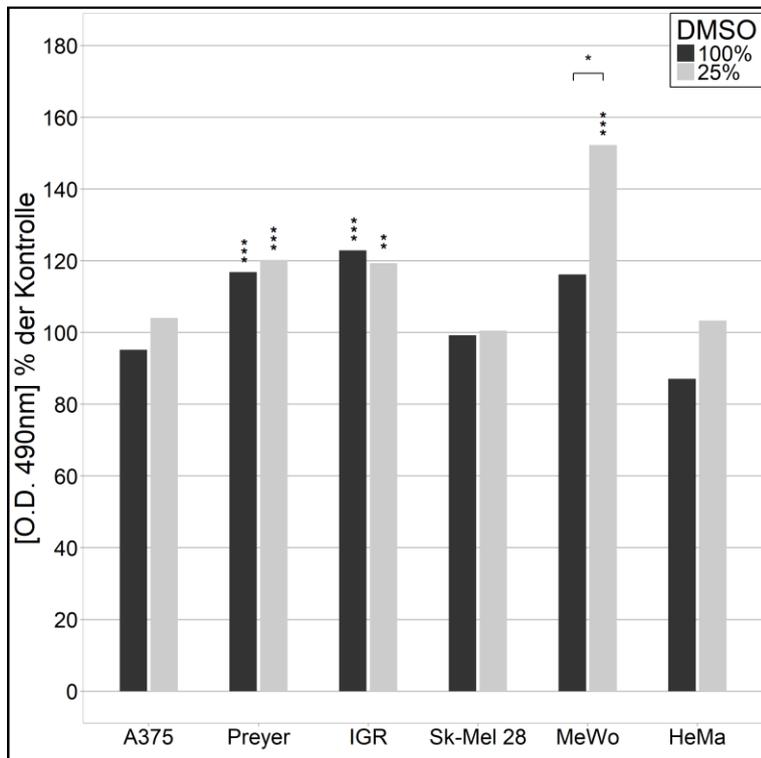


Abbildung 10: Um eine Beeinflussung der gesamten Versuchsreihe durch die Verwendung von DMSO als Lösungsmedium festzustellen wurde dies in 25 % und 100 % Konzentration getestet. Darstellung der Messwerte der optischen Dichte im Bezug auf die jeweilige unbehandelte Referenzkultur. Diese ist als 100 % gesetzt und nicht mit abgebildet (*p<0,05; **p<0,01; *p<0,001). Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).**

Durch die Verwendung von DMSO als Lösungsmittel konnte somit eine Beeinflussung der Messwerte nicht ausgeschlossen werden. Daher wurde bei allen Experimenten, bei denen die untersuchten Substanzen in DMSO gelöst waren, die jeweilige Kontrolle ebenfalls mit DMSO in entsprechender Konzentration versetzt.

Simulation der Wirkung von Hypoxie durch Zugabe von CoCl₂ und DMOG

Kobaldchlorid (CoCl₂) bewirkt eine Stabilisierung und Aktivierung von HIF-1 α . Durch Zugabe dieser Substanz wurde die Wirkung von Hypoxie auf Zellen simuliert [187–189]. Untersucht wurden eine 100 % Konzentration sowie eine vierfache Verdünnung dieses Ansatzes (25 % Konzentration). Die graphische Darstellung der Messwerte findet sich in Abbildung 11. Die statistischen Daten zu dieser Abbildung sind in Tabelle 7 im Anhang angegeben.

Bezogen auf die unbehandelte Referenzkultur kam es nach 100 % CoCl₂-Lösung bei MeWo bzw. nach 25 % CoCl₂-Lösung bei Preyer zu einer signifikanten Erhöhung der Messwerte.

Bei Preyer, IGR-1 und HeMa-LP gab es signifikante Unterschiede zwischen den Messwerten der 25 % und der 100 % CoCl₂-Lösung. Bei den übrigen Zelllinien waren die Messwertunterschiede zwischen den beiden Konzentrationen nicht signifikant. Bei den Zellkulturen A375, Preyer, IGR-1, Sk-Mel 28 und HeMa-LP führte die 100 % CoCl₂-Lösung zu einer signifikanten Abnahme der Messwerte. Die 25 % Konzentration bewirkte einen signifikanten Rückgang der optischen Dichte bei A375. Die Veränderung der Messwerte nach Zugabe der 25 % Konzentration bei IGR-1, Sk-Mel 28, MeWo und HeMa-LP waren nicht signifikant.

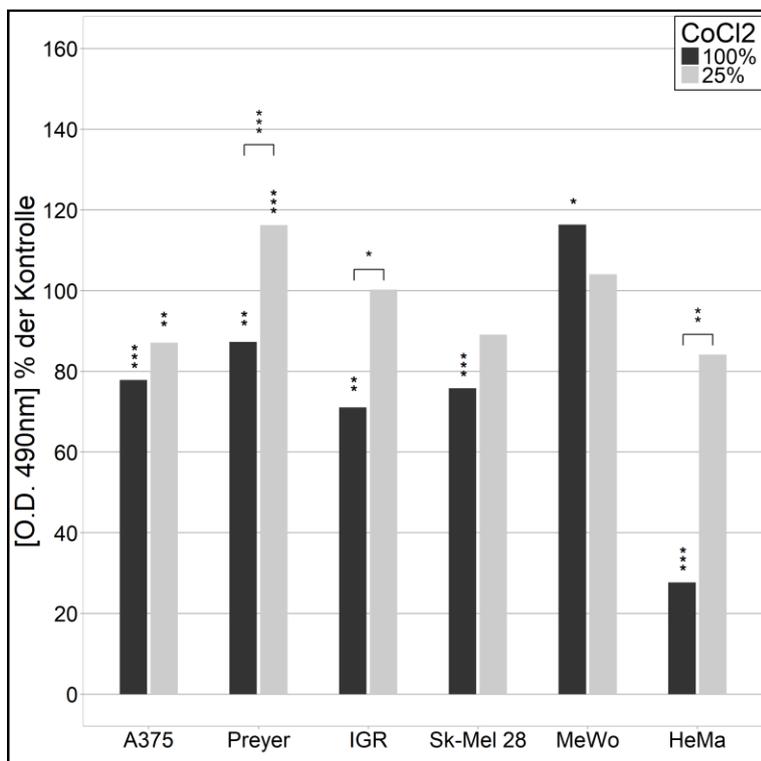


Abbildung 11: Simulation der Wirkung von Hypoxie auf Zellen, Stabilisierung und Aktivierung von HIF-1 α durch CoCl₂. Darstellung der Messwerte der optischen Dichte im Bezug auf die jeweilige unbehandelte Referenzkultur. Diese ist als 100 % gesetzt und nicht mit abgebildet. (*p<0,05; **p<0,01; *p<0,001). Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).**

Für den Wirkungsmechanismus von DMOG ist eine Stabilisierung von HIF-1 α unter Normoxie beschrieben [201, 202]. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Abbildung 12 graphisch dargestellt. Die statistischen Daten zu dieser Abbildung finden sich im Anhang in Tabelle 8. Bei allen Melanomzelllinien sowie bei den Melanozyten HeMa-LP kam es bezogen auf die jeweilige Referenzkultur durch die Zugabe von DMOG 100 % zu einer signifikanten

Verringerung der Messwert. Die 25 % Konzentration bewirkte ebenfalls einen Rückgang der Messwerte verglichen mit der jeweiligen Referenzkultur. Dabei waren diese Ergebnisse bei A375, IGR-1 und MeWo signifikant. Bei A375 und Preyer ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Messungen der 25 % und der 100 % Konzentration.

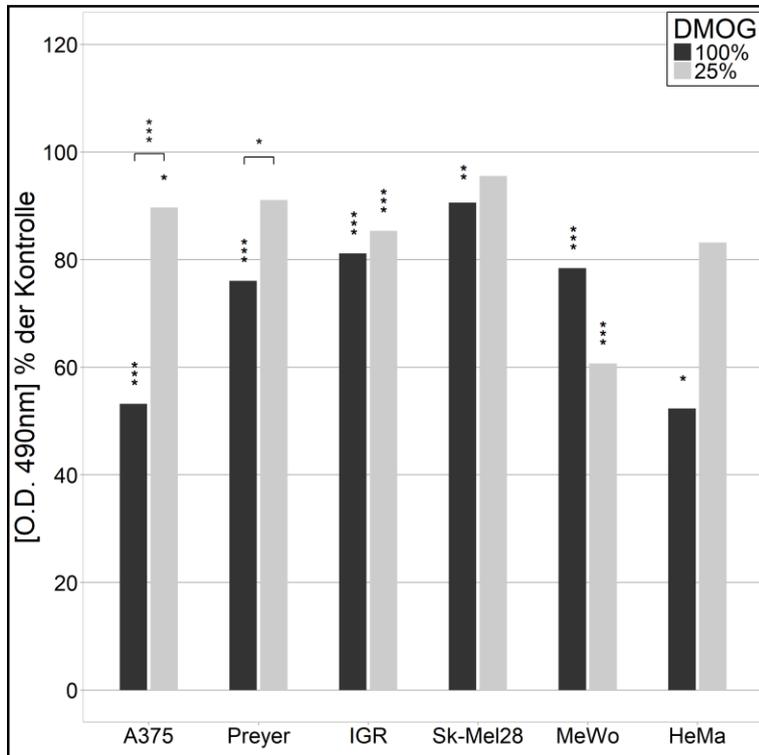


Abbildung 12: Stabilisierung von HIF-1 α unter Normoxie durch DMOG. Darstellung der Messwerte der optischen Dichte im Bezug auf die jeweilige unbehandelte Referenzkultur. Diese ist als 100 % gesetzt und nicht mit abgebildet. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

HIF-Signalwege

Die Stoffe CAS 934593-90-5 (CAS93), CAY 10585 (CAY) und KC7F2 wirken über eine Inhibition von HIF-1 α , CAS 882268-69-1 (CAS88) über eine Inhibition von HIF-2 α . FM19G11 (FM19) bewirkt eine Inhibition beider Transkriptionsfaktoren [195–200].

Bei den Melanozyten HeMa-LP bewirkte die Zugabe dieser Chemikalien überwiegend eine Verringerung der Messwerte im Vergleich zur unbehandelten Referenzkultur. Dabei waren die Ergebnisse nach Zugabe der 25 % Konzentration von CAS93 und CAY nicht signifikant. Bei FM19 führten beide Konzentrationen zu einer Verringerung der Messwerte, wobei diese Ergebnisse ebenfalls nicht signifikant waren. Es zeigten sich signifikant niedrigere Werte nach Zugabe der 100 % Konzentration im Vergleich zur 25 % Konzentration bei CAS93, CAS88 und CAY. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abbildung 13 graphisch dargestellt. Die statistischen Angaben sind in Tabelle 9 im Anhang hinterlegt.

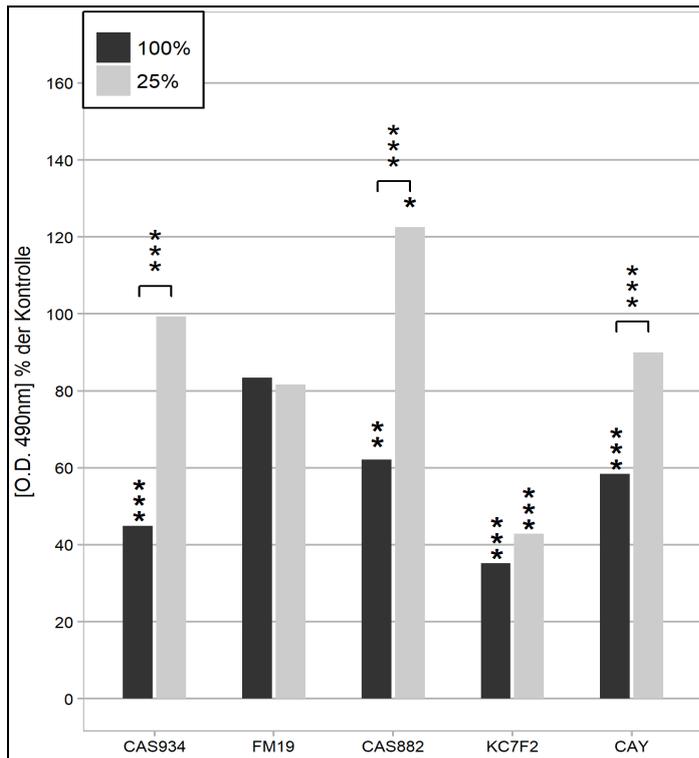


Abbildung 13: Melanozyten HeMa-LP, HIF-Inhibitoren: Darstellung der Messwerte der optischen Dichte im Bezug auf die jeweilige unbehandelte Referenzkultur. Diese ist als 100 % gesetzt und nicht mit abgebildet. (*p<0,05; **p<0,01; *p<0,001). Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).**

Abhängig von der jeweiligen Melanomzelllinie führte die Zugabe von CAS93, FM19, CAS88 und CAY zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die statistischen Ergebnisse der im Folgenden dargestellten Messreihe sind in den Tabellen 9 und 10 im Anhang angegeben.

CAS93 führte in 100 % Konzentration, bezogen auf die Referenz, zu einer signifikanten Verringerung der Messwerte bei IGR-1. Bei MeWo kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Messwerte. Bei Sk-Mel 28, A375 und Preyer waren die Messungen nicht signifikant. Bei Sk-Mel 28, IGR-1 und MeWo führte die 25 % Konzentration von CAS93, bezogen auf die Referenz sowie auf die 100 % Konzentration, eine signifikante Verringerung der Messwerte. Bei A375 und Preyer führte die 25 % Konzentration zu einer signifikanten Steigerung der Messwerte verglichen zur Referenz. Der Unterschied der 25 % Konzentration zur 100 % Konzentration war bei A375 nicht signifikant.

FM19 führte in 100 % und 25 % Konzentration zu keiner signifikanten Messwertveränderung bei SK-Mel 28. Die 100 % Konzentration bewirkte, bezogen auf die jeweilige Referenz, eine signifikante Abnahme der Messwerte bei IGR-1, während es bei MeWo zu einer signifikanten Steigerung kam. Bei A375 und Preyer führte 100 % FM19 zu keiner signifikanten Änderung der Messwerte im Bezug auf die jeweilige Referenz. Bei A375 kam es, bezogen auf die

Referenz sowie auf die 100 % Konzentration, zu signifikant größeren Messwerten. Bei IGR-1 und MeWo ergab sich nach Zugabe der 25 % Konzentration eine signifikante Verringerung der Messwerte gegenüber der Referenz. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der 25 % und der 100 % Konzentration festgestellt werden. Bei Preyer führte 25 % FM19 zu signifikant größeren Messwerten als die Referenz und die 100 % Konzentration.

CAS88 bewirkte in 100 % Konzentration, bezogen auf die jeweilige Referenz, eine Abnahme der Messwerte, wobei dieses Ergebnis bei Sk-Mel 28 nicht signifikant war. Die 25 % Konzentration führte nur noch bei IGR-1 und MeWo zu signifikant kleineren Messwerten. Bei A375 und Preyer ergab sich eine signifikante Zunahme der Messwerte nach Zugabe von 25 % CAS88 im Vergleich zur Referenz sowie im Vergleich zur 100 % Konzentration.

Die Zugabe von KCF2 führte in beiden untersuchten Konzentrationen, bezogen auf die Referenz, zu einer signifikanten Verringerung der Messwerte bei Sk-Mel 28 und IGR-1. Dabei ergab sich zudem ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Konzentrationen bei IGR-1. Bei Sk-Mel 28 war dieser Unterschied nicht signifikant. Die 25 % Konzentration von KCF2 bewirkte eine signifikante Abnahme der Messwerte bei A375, MeWo und Preyer. Die 100 % Konzentration führte im Bezug auf die Referenz zu keiner signifikanten Änderung der Messwerte bei A375, MeWo und Preyer. Der Unterschied zur 25 % Konzentration waren dabei nur bei A375 und MeWo signifikant.

Nach Zugabe von CAY 100 % kam es, bezogen auf die Referenz, zu einer signifikanten Zunahme der Messwerte bei Sk-Mel 28, A375 und MeWo. Bei IGR-1 führte diese Konzentration zu einer signifikanten Abnahme der Messwerte im Vergleich zur Referenz. Bei Preyer war der Unterschied der Messwerte zwischen 100 % CAY und Referenz nicht signifikant. Die 25 % Konzentration bewirkte eine signifikante Steigerung der Messwerte im Bezug auf die Referenz sowie auf die 100 % Konzentration bei A375. Bei IGR-1 und Sk-Mel 28 führte die 25 % Konzentration zu keiner signifikanten Veränderung der Messwerte verglichen mit der Referenz. Zudem ergab sich hier kein signifikanter Unterschied der Messwerte nach 25 % und 100 % Konzentration. Bei MeWo führte die 25% Konzentration zu einer signifikanten Verringerung der Messwerte bezogen auf Referenzkultur sowie auf die 100 % Konzentration. Bei Preyer führte die Zugabe der 25 % Konzentration zu signifikant größeren Messwerten bezogen auf die Referenz sowie auf die 100 % Konzentration.

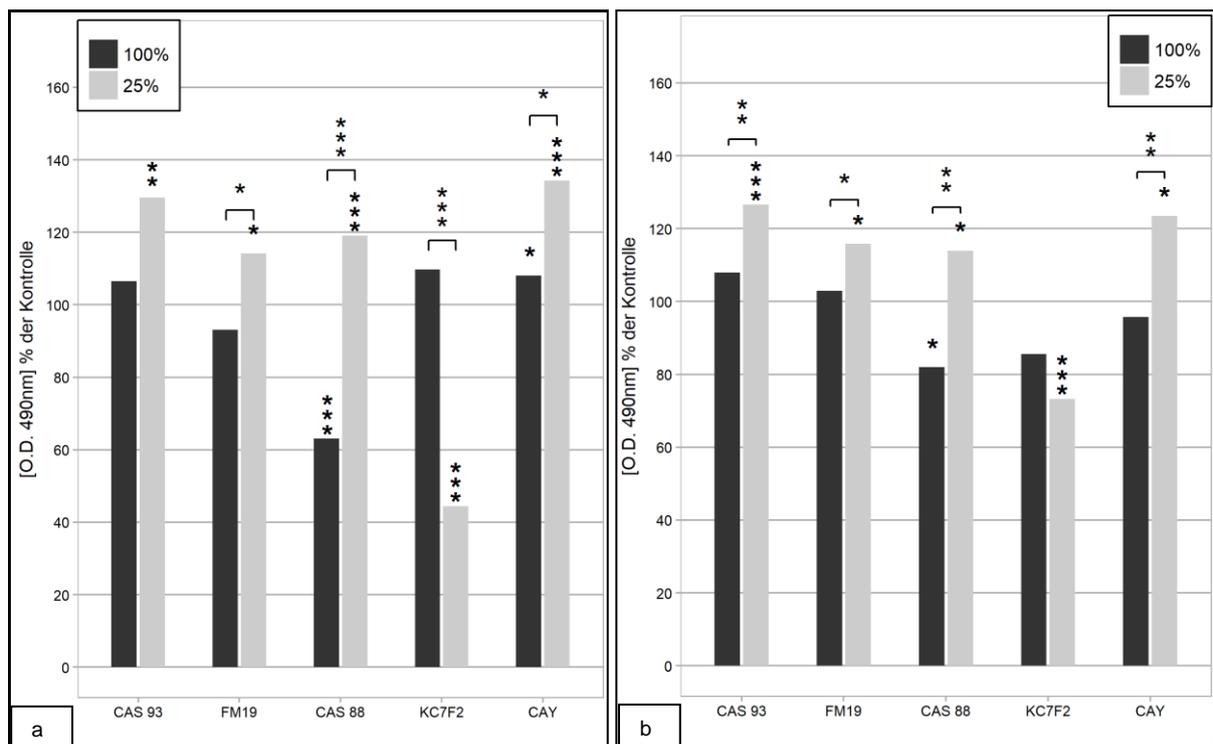


Abbildung 14 a. A375, HIF-Inhibitoren. b. Preyer, HIF-Inhibitoren. Darstellung der Messwerte der optischen Dichte im Bezug auf die jeweilige unbehandelte Referenzkultur. Diese ist als 100 % gesetzt und nicht mit abgebildet. (*p<0,05; **p<0,01; *p<0,001). Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).**

Abbildungen 14 a, b zeigen die entsprechenden graphischen Darstellungen für die Melanomzellen A375 und Preyer. Die graphischen Darstellungen für die Zelllinien IGR-1, MeWo und Sk-Mel 28 finden sich im Anhang (Abb. 35 a, b, Abb. 36).

Bei A375 kam es nach Zugabe der 25 % Konzentration von CAS93, FM19, CAS88 und CAY zu signifikant größeren Messwerten im Vergleich zur unbehandelten Referenzkultur. Dabei zeigte die Messung bei FM19, CAS88 und CAY zudem einen signifikanten Unterschied zur 100 % Konzentration. KC7F2 führte in 25 % Konzentration zu einer signifikanten Abnahme der Messwerte, während bei 100 % eine nicht signifikante Zunahme beobachtet wurde. Der Unterschied zwischen der 25 % und 100 % Messung bei KC7F2 war signifikant.

Nach Zugabe der 100 % Konzentration von CAS93, FM19 und KC7F2 ergaben sich signifikante Unterschiede zu den Messwerten der Referenzkultur. Bei CAS88 ergab sich, bezogen auf die Referenz, nach Zugabe der 100 % Konzentration eine signifikante Verringerung der Messwerte. Bei CAY 100 % zeigte sich eine signifikante Zunahme der Messwerte.

Bei Preyer zeigte sich nach Zugabe der 25 % Konzentration von CAS93, FM19, CAS88 und CAY eine signifikante Erhöhung der Messwerte im Vergleich zur Referenz. Dabei fielen die

Messwerte nach Zugabe der 25 % Konzentration signifikant größer als die der 100 % Konzentration. Die Messung nach Zugabe der 100 % Konzentration von CAS93, FM19, KC7F2 und CAY ergab bei Preyer keine signifikante Abweichung von den Messwerten der Referenz. Die 100 % Konzentration von CAS88 bewirkte eine signifikante Abnahme der Messwerte im Vergleich zur Referenz.

Hemmung der SOD 1 durch ATTM

Ammonium tetrathiomolybdate (ATTM) hemmt die Superoxid Dismutase 1 (SOD 1) und bewirkt so eine Hemmung der Angiogenese und des Tumorwachstums [203, 204] Auch eine Inhibition des Transkriptionsfaktors NfκB durch ATTM wurde beschrieben [205, 206].

Die graphische Darstellung der an ATTM gewonnenen Daten findet sich in Abbildung 15. Die statistischen Daten finden sich in Tabelle 11 im Anhang.

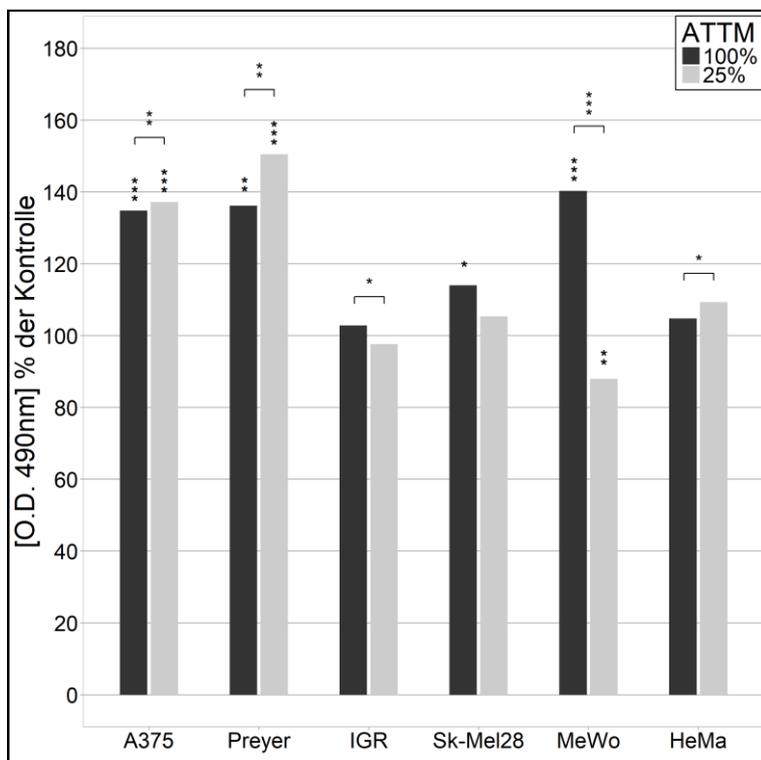


Abbildung 15: Erhöhung der Hypoxie durch Bildung von H₂O₂ und Sauerstoffradikalen mittels ATTM in 100 % und 25 % Konzentration. Darstellung der Messwerte der optischen Dichte im Bezug auf die jeweilige unbehandelte Referenzkultur. Diese ist als 100 % gesetzt und nicht mit abgebildet. (*p<0,05; **p<0,01; *p<0,001). Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).**

Die Zugabe von ATTM in 100 % Konzentration führte, im Vergleich zur Referenzkultur, zu einer signifikanten Erhöhung der Messwerte bei A375, Preyer, Sk-Mel 28 und MeWo. Bei IGR-1 und HeMa-LP waren die Ergebnisse bei dieser Konzentration nicht signifikant. Bei

A375 und Preyer waren die Messwerte nach Zugabe von ATTM 25 % signifikant größer als die der jeweiligen Referenz. Dabei zeigte sich zudem ein signifikanter Unterschied zwischen den Messungen der 25 % und 100 % Konzentration. Bei IGR-1, Sk-Mel 28 und HeMa-LP zeigten die Messwerte nach Zugabe von 25 % ATTM keine signifikanten Abweichungen von der Referenz. Bei MeWo fielen die Messwerte, bezogen auf die Referenz sowie auf die 100 % Konzentration, nach 25 % ATTM signifikant kleiner aus. Bei HeMa-LP führten beide Konzentrationen zu keiner signifikanten Änderung der Messwerte bezogen auf die Referenz, jedoch ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten der 25 % und der 100 % Konzentration.

Beeinflussung der zellulären ROS-Produktion durch Hemmung der NADPH-Oxidase

Die Stoffe DPI und Apocynin bewirken durch die Hemmung der NADPH-Oxidase eine Reduzierung der zellulären ROS-Produktion und –Konzentration [40, 207].

Bei allen untersuchten Zelllinien führte die Zugabe von DPI in beiden Konzentrationen zu einer signifikanten Abnahme der Messwerte verglichen mit der jeweiligen Referenzkultur. Zudem wurden bei A375, Preyer, Sk-Mel 28, MeWo und HeMa-LP signifikante Unterschiede zwischen den Messwerten der 100 % und der 25 % Konzentration festgestellt. Dabei führte die 25 % zu einer signifikant geringeren Abnahme der Messwerte als die 100 % Konzentration. Die graphische Darstellung dieser Ergebnisse findet sich in Abbildung 16 a, die statistischen Daten finden sich in Tabelle 12 im Anhang.

Die Zugabe von Apocynin führte in beiden untersuchten Konzentrationen zu einer signifikanten Erhöhung der Messwerte bei A375, Preyer, IGR-1 und MeWo. Bei Sk-Mel 28 und HeMa-LP führten beide Konzentrationen zu keiner signifikanten Veränderung der Messwerte. Die graphische Darstellung dieser Ergebnisse findet sich in Abbildung 16 b. Die statistischen Daten sind in Tabelle 13 im Anhang angegeben.

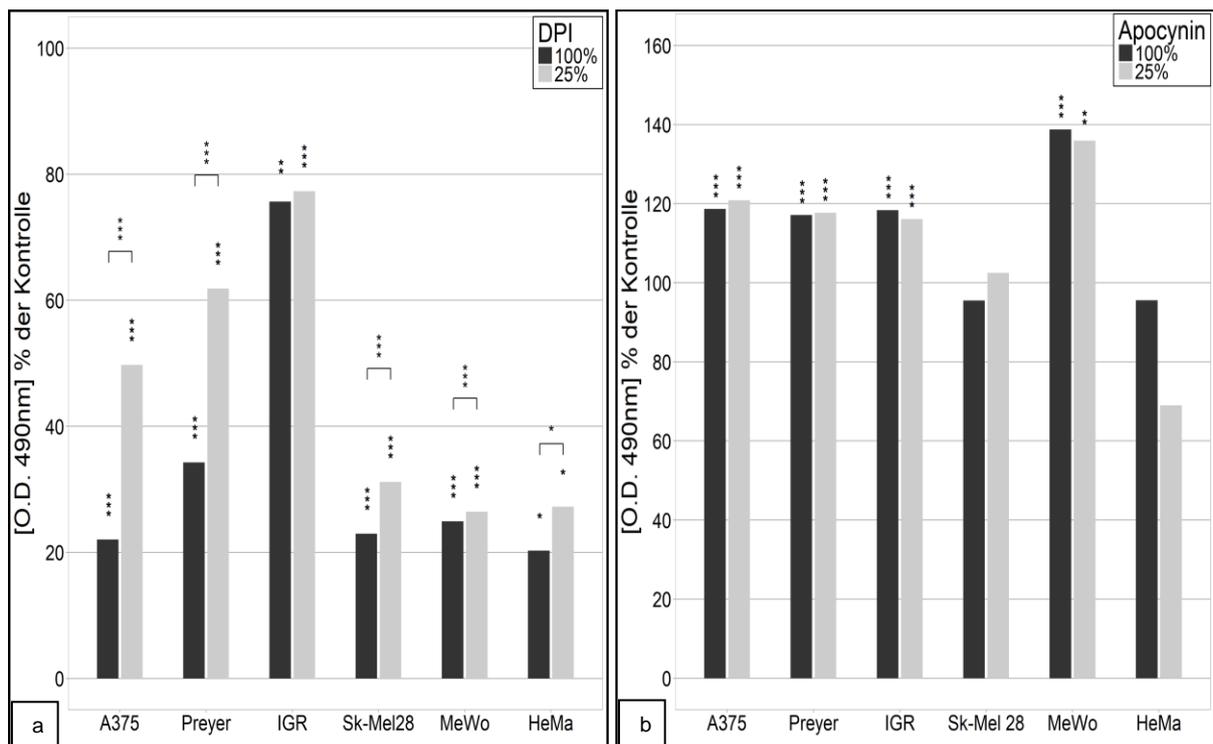


Abbildung 16 Hemmung der ROS-Produktion durch Zugabe von a. DPI, b. Apocynin. Darstellung der Messwerte der optischen Dichte im Bezug auf die jeweilige unbehandelte Referenzkultur. Diese ist als 100 % gesetzt und nicht mit abgebildet. (*p<0,05; **p<0,01; *p<0,001). Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). Bei Apocynin gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den jeweiligen Gruppen.**

Beeinflussung des Transkriptionsfaktors Nrf2 durch Trigonelline, Luteolin und Cucurbitacin B

Hier wurden Substanzen getestet, die die Aktivität und Akkumulation des Transkriptionsfaktors Nrf2 beeinflussen und dadurch Einfluss auf die zelluläre ROS-Produktion und –Resistenz nehmen.

Trigonelline hemmt die Nrf2-Aktivität und -Akkumulation, gleichzeitig reduziert es den oxidativen Stress durch Hemmung der NADPH-Oxidase [210, 211]

Luteolin verringert die zelluläre ROS-Produktion und führt zudem zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors Nrf2 und Hemmung von HIF-1 sowie Akt, mTOR und NFκB. [208, 209].

Cucurbitacin B reduziert ebenfalls die ROS-Produktion und vermittelt eine Aktivierung von Nrf2 sowie einer Hemmung von HIF-1α und NFκB [212–215].

Bei HeMa-LP waren die Messwerte nach Zugabe von Luteolin in 100 % sowie in 25 % Konzentration signifikant kleiner als die Messwerte der Referenzkultur. Dabei fielen die Messwerte der 25 % Konzentration zudem signifikant niedriger aus als die Messwerte der

100% Konzentration. Cucurbitacin B bewirkte in beiden untersuchten Konzentrationen ebenfalls eine signifikante Abnahme der Messwerte verglichen mit der Referenz. Zwischen der 100 % und der 25 % Konzentration ergab sich kein signifikanter Messwerteunterschied. Verglichen zur unbehandelten Referenzkultur waren die Werte der optischen Dichte nach Zugabe von Trigonelline in 100 % Konzentration signifikant niedriger. Nach Zugabe der 25 % Konzentration fielen die Messwerte leicht erhöht aus, wobei dieser Effekt nicht signifikant war. Der der Unterschied nach Zugabe von 25 % Trigonelline und 100 % Trigonelline war signifikant. Die Ergebnisse von HeMa-LP sind in Abbildung 17 graphisch dargestellt. Die statistischen Daten finden sich in Tabelle 14 im Anhang.

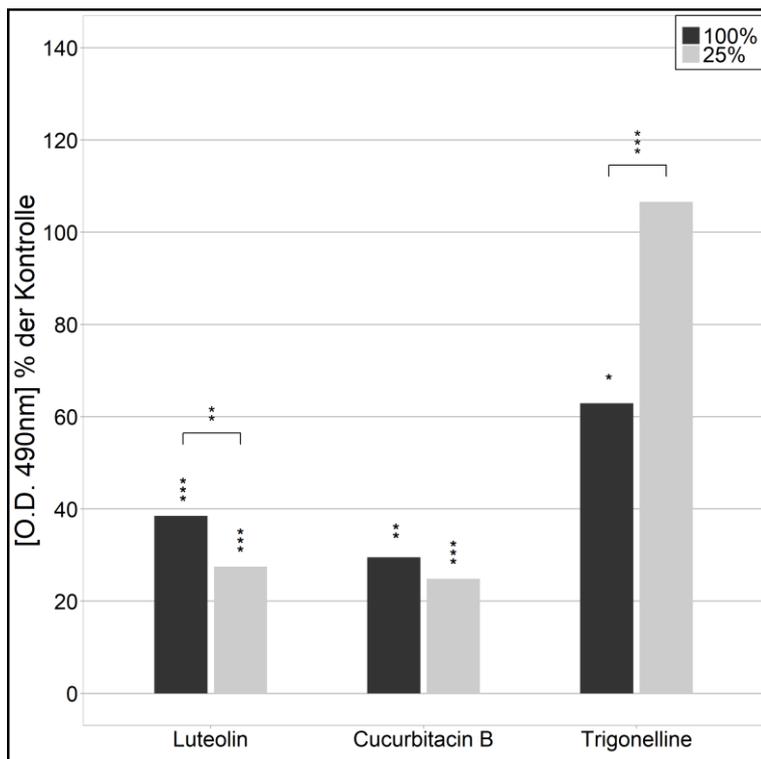


Abbildung 17: Melanozyten HeMa-LP. Beeinflussung von Nrf2 durch Luteolin, Cucurbitacin B und Trigonelline jeweils in 100 % und 25 % Konzentration. Darstellung der Messwerte der optischen Dichte im Bezug auf die jeweilige unbehandelte Referenzkultur. Diese ist als 100 % gesetzt und nicht mit abgebildet. (*p<0,05; **p<0,01; *p<0,001). Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).**

Bei allen untersuchten Melanomzelllinien fielen nach Zugabe von Cucurbitacin B in beiden Konzentrationen die Messwerte signifikant kleiner aus, als die der jeweiligen Referenz. Dabei ergaben sich nach Zugabe der 100 % Konzentration bei A375, Preyer und Sk-Mel 28 signifikant niedrigere Werte als nach Zugabe der 25 % Konzentration. Bei IGR-1 führte die 25 % Konzentration zu signifikant niedrigeren Werten als die 100% Konzentration. Bei MeWo gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Messwerten der 100 % und der 25 %

Konzentration. Diese Daten sind in Abbildung 18 graphisch dargestellt. In Tabelle 15 im Anhang finden sich die entsprechenden statistischen Daten.

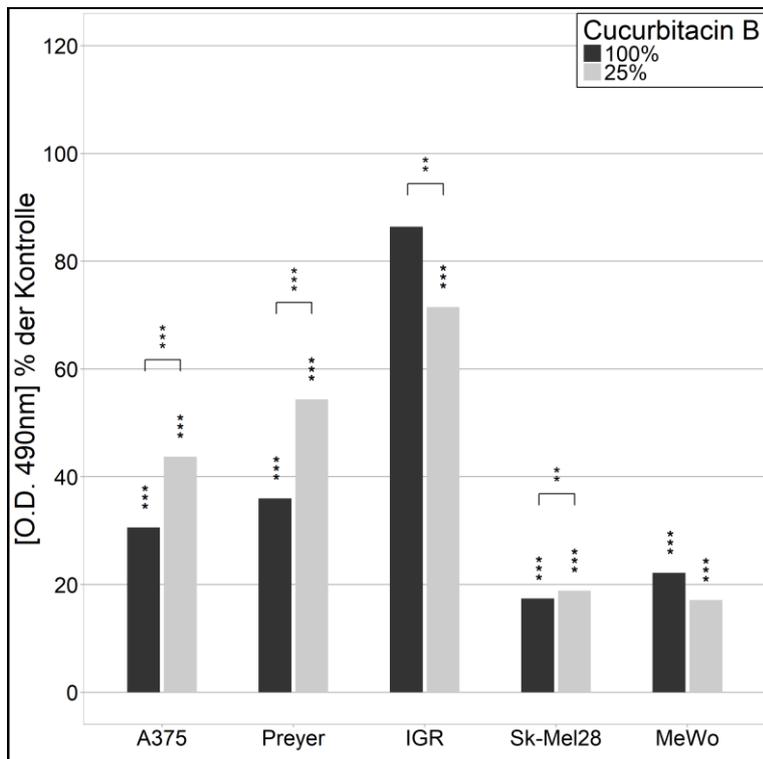


Abbildung 18: Melanomzellen. Beeinflussung von Nrf2 durch Cucurbitacin B. Darstellung der Messwerte der optischen Dichte im Bezug auf die jeweilige unbehandelte Referenzkultur. Diese ist als 100 % gesetzt und nicht mit abgebildet. (*p<0,05; **p<0,01; *p<0,001). Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).**

Abbildung 19 zeigt die Änderung der optischen Dichte nach Zugabe von Luteolin zu den Melanomzellen. Die entsprechenden statistischen Daten finden sich in Tabelle 16 im Anhang. Die Messwerte fielen bei der Mehrzahl der Melanomzellen nach Zugabe der 100 % Konzentration signifikant kleiner aus als die Messwerte der jeweiligen Referenz. Nur bei IGR-1 war der Unterschied zur Referenzkultur nicht signifikant. Bei Preyer führte die 25% Konzentration, bezogen auf die Referenz, zu signifikant größeren Messwerten. Bei IGR-1, Sk-Mel 28 und MeWo kam es nach Zugabe von 25 % Luteolin zu signifikant kleineren Messwerten im Vergleich mit der jeweiligen Referenzkultur. Bei A375, Preyer und Sk-Mel 28 fielen die Messwerte nach Zugabe der 100 % Konzentration signifikant kleiner aus, als die Messwerte der 25 % Konzentration. Bei IGR-1 zeigte sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten der 100 % und der 25 % Konzentration Luteolin, wobei hier die Werte der 25 % Konzentration kleiner ausfielen. Das Ergebnis der Messung nach Zugabe der 100 % Konzentration war jedoch nicht signifikant.

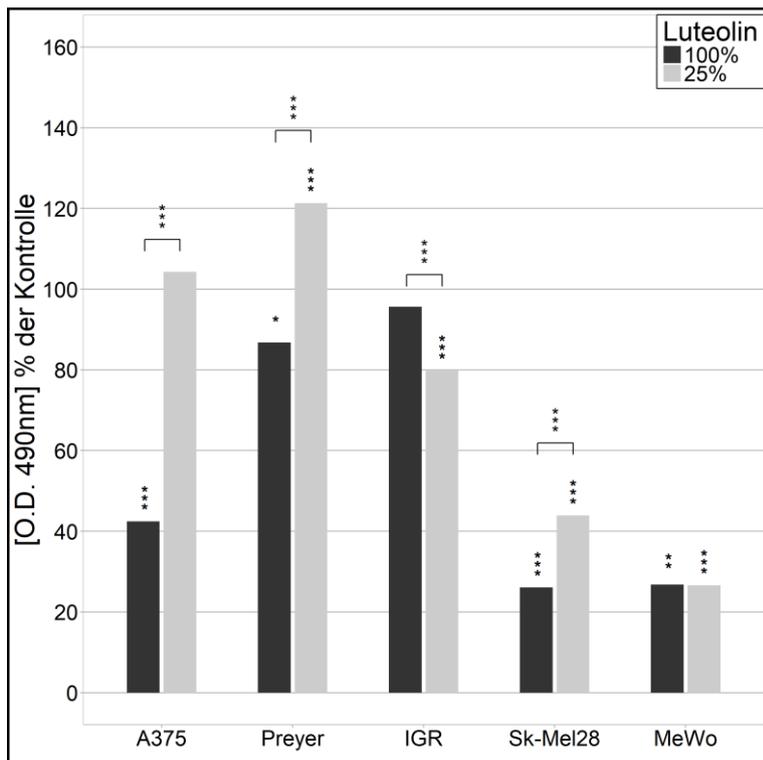


Abbildung 19: Melanomzellen. Beeinflussung von Nrf2 durch Luteolin. Darstellung der Messwerte der optischen Dichte im Bezug auf die jeweilige unbehandelte Referenzkultur. Diese ist als 100 % gesetzt und nicht mit abgebildet. (*p<0,05; **p<0,01; *p<0,001). Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).**

Nach Zugabe von Trigonelline 100 % ergaben sich bezogen auf die Referenzkultur signifikant niedrigere Messwerte bei Preyer sowie signifikant größere Messwerte bei IGR-1 und MeWo. Bei Preyer fielen die Messwerte nach Zugabe der 25 % Konzentration signifikant größer aus, als die Messwerte der Referenz.

Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den Messwerten der 100 % und 25 % Konzentration bei Preyer, IGR-1 und MeWo. Dabei führte bei IGR-1 und MeWo die 100 % Konzentration zu signifikant größeren Werten als die 25 % Konzentration. Bei Preyer fielen die Messwerte der 100 % Konzentration signifikant kleiner aus als die 25% Konzentration. Abbildung 20 stellt diese Ergebnisse graphisch dar. Eine Übersicht über die statistischen Daten liefert Tabelle 17 im Anhang.

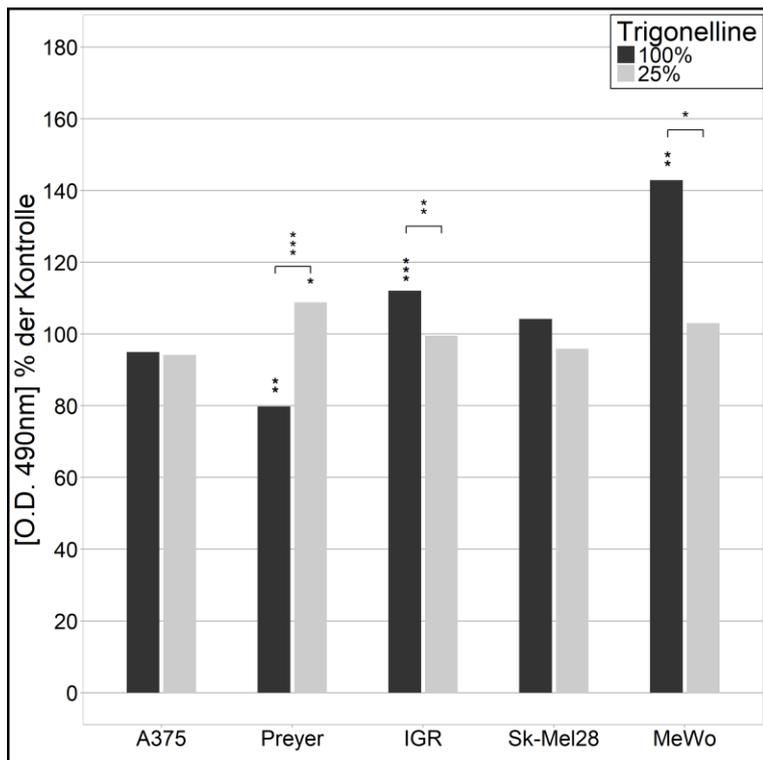


Abbildung 20: Beeinflussung von Nrf2 durch Trigonelline. Darstellung der Messwerte der optischen Dichte im Bezug auf die jeweilige unbehandelte Referenzkultur. Diese ist als 100 % gesetzt und nicht mit abgebildet. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$). Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).**

Um die Wirkung von Trigonelline, Luteolin und Cucurbitacin B weiter zu untersuchen, um weitere Konzentrationen zu berücksichtigen, sowie um einen hypoxischen bzw. ROS-Gradienten zu simulieren, wurden bei den Melanomzellen A375 und Preyer Verdünnungsreihen dieser Chemikalien getestet. Es wurden Konzentrationen von 200 % bis 6,25 %, also von der achtfachen IC_{50} bis zur 25 %igen Konzentration der IC_{50} angewandt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 und 22 dargestellt. Eine ausführliche Darstellung der statistischen Daten findet sich in den Tabellen 18 bis 23 im Anhang.

Bei A375 ergab sich nach Zugabe der verschiedenen Konzentrationen von Trigonelline eine Erhöhung der Messwerte im Vergleich zur unbehandelten Referenzkultur. Diese Messwerte waren bis auf die Ergebnisse der 50 % und 25 % Konzentration signifikant. Die Ergebnisse der verschiedenen Konzentrationen unterschieden sich nicht signifikant.

Bei Preyer ergaben sich nach Zugabe der verschiedenen Konzentrationen von Trigonelline ähnliche Ergebnisse. Wie bei A375 fielen die Messwerte im Vergleich zur unbehandelten Referenzkultur größer aus. Dabei war nur das Ergebnis der 25 % Konzentration nicht signifikant. Bei Preyer zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen den Konzentrationen.

Die Zugabe von Luteolin führte bei A375 und Preyer in allen untersuchten Konzentrationen zu geringeren Messwerten im Vergleich mit der jeweiligen Referenz. Dabei war nur die Messung der 12,5 % Konzentration bei Preyer nicht signifikant. Zusätzlich wurden bei beiden Zelllinien signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Konzentrationen registriert. Dabei fielen bei höheren Konzentrationen die Messwerte signifikant kleiner aus, als bei den stark verdünnten Substanzen.

Die Zugabe von Cucurbitacin B bewirkte in allen untersuchten Konzentrationen bei Preyer und A375 eine signifikante Verringerung der Messwerte verglichen mit der jeweiligen Referenzkultur. Auch hier wurden signifikante Unterschiede zwischen den jeweiligen Verdünnungen festgestellt. Dabei fielen die Messwerte nach Zugabe höherer Konzentrationen signifikant kleiner aus, als die Messwerte nach Zugabe von stärker verdünntem Cucurbitacin B.

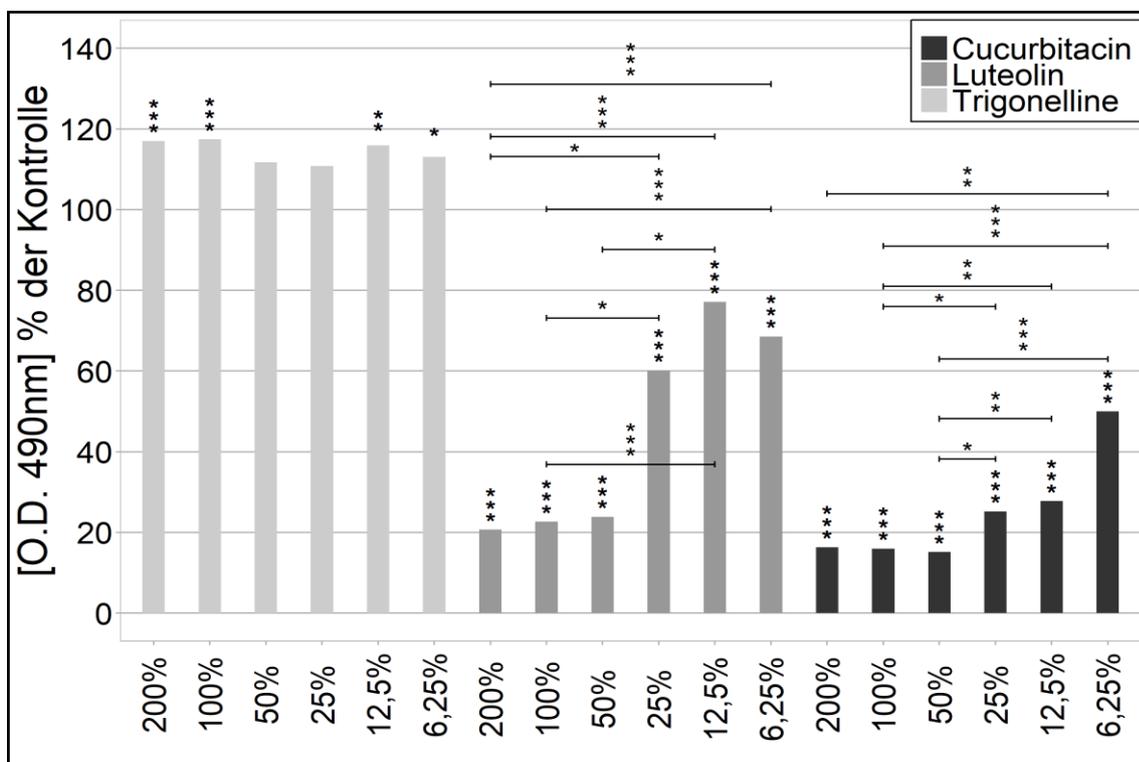


Abbildung 21: A375. Verdünnungsreihe der Nrf2- Inhibitoren. Darstellung der Messwerte der optischen Dichte im Bezug auf die jeweilige unbehandelte Referenzkultur. Diese ist als 100 % gesetzt und nicht mit abgebildet. (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001). Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).

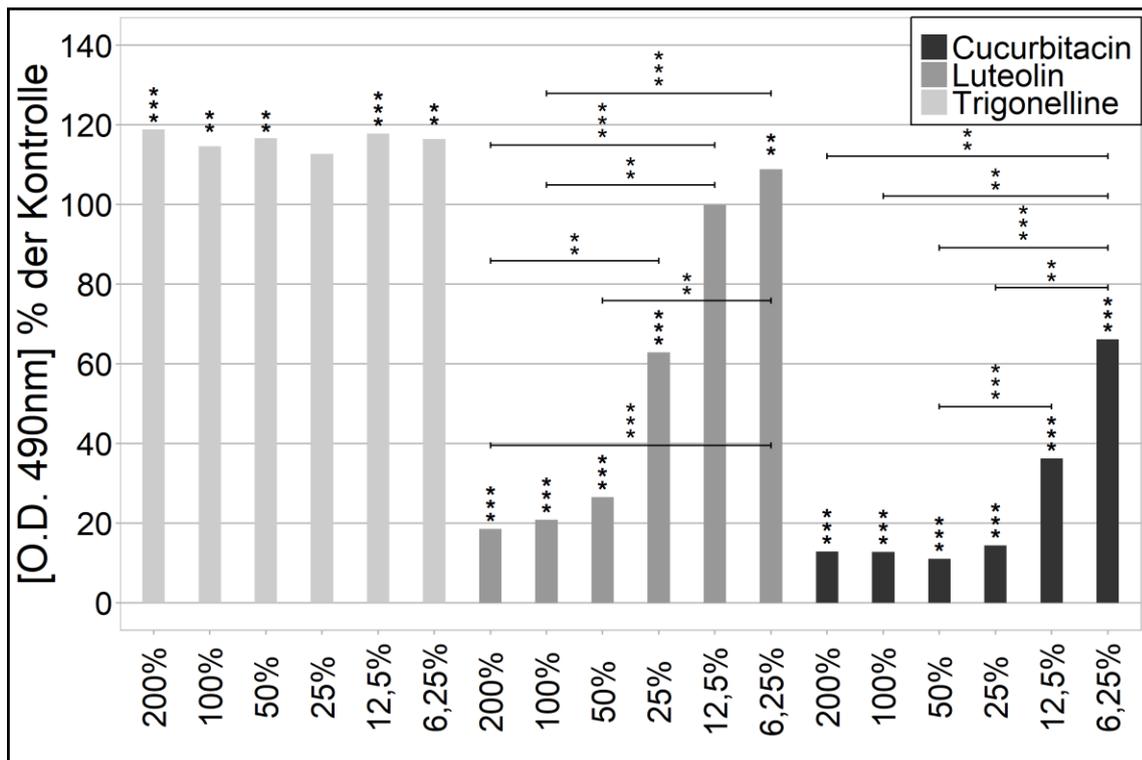


Abbildung 22: Preyer. Verdünnungsreihen der Nrf2- Inhibitoren. Darstellung der Messwerte der optischen Dichte im Bezug auf die jeweilige unbehandelte Referenzkultur. Diese ist als 100 % gesetzt und nicht mit abgebildet. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Beeinflussung der Signalkaskaden von mTOR und Rac1

Rapamycin hemmt direkt mTOR und wirkt dadurch inhibitorisch auf das Tumorwachstum und die Zellproliferation [217–219]. NSC23766 inhibiert Rac1 und hemmt auf diese Weise die Zellproliferation und -migration [7, 216, 220].

Die nach Zugabe von Rapamycin erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 23 graphisch dargestellt. Die statistischen Daten finden sich in Tabelle 24 im Anhang. Verglichen mit der jeweiligen Referenzkultur kam es bei allen Zelllinien nach Zugabe beider untersuchten Konzentrationen von Rapamycin zu einer signifikanten Verringerung der optischen Dichte. Dabei ergab sich nur bei IGR-1 ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der 25 % und der 100 % Konzentration. Bei den übrigen Zelllinien war der Unterschied zwischen der 25 % und der 100 % Konzentration nicht signifikant.

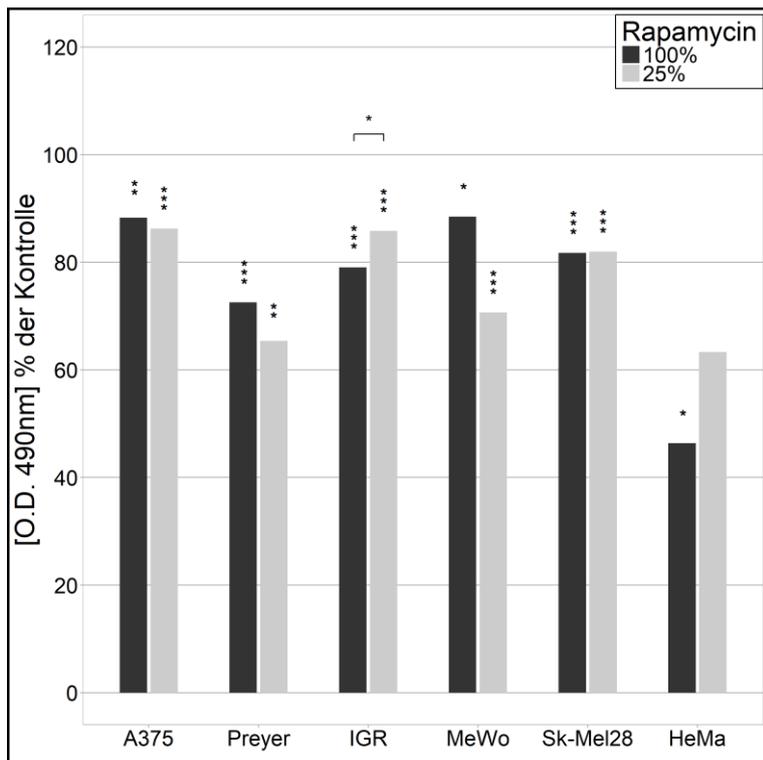


Abbildung 23: Hemmung von mTOR durch Rapamycin. Darstellung der Messwerte der optischen Dichte im Bezug auf die jeweilige unbehandelte Referenzkultur. Diese ist als 100 % gesetzt und nicht mit abgebildet. (*p<0,05; **p<0,01; *p<0,001). Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).**

Die Zugabe von NSC23766 in 100 % Konzentration führte bei allen untersuchten Zelllinien zu einer signifikanten Abnahme der Messwerte im Vergleich mit der jeweiligen Referenzkultur. Signifikante Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Konzentrationen gab es bei den Zelllinien A375, Preyer und HeMa-LP. Dabei führte die 25 % Konzentration zu keiner signifikanten Veränderung der Messwerte bei A375, IGR-1 und HeMa-LP. Bei Preyer kam es durch die 25 % Konzentration zu einer signifikanten Erhöhung der Messwerte. Zu einem signifikanten Rückgang der Messwerte nach Zugabe der 25 % Konzentration kam es bei Sk-Mel 28 und MeWo. Die Ergebnisse nach Zugabe dieser Substanz sind in Abbildung 24 dargestellt. Die entsprechenden statistischen Daten finden sich in Tabelle 25 im Anhang.

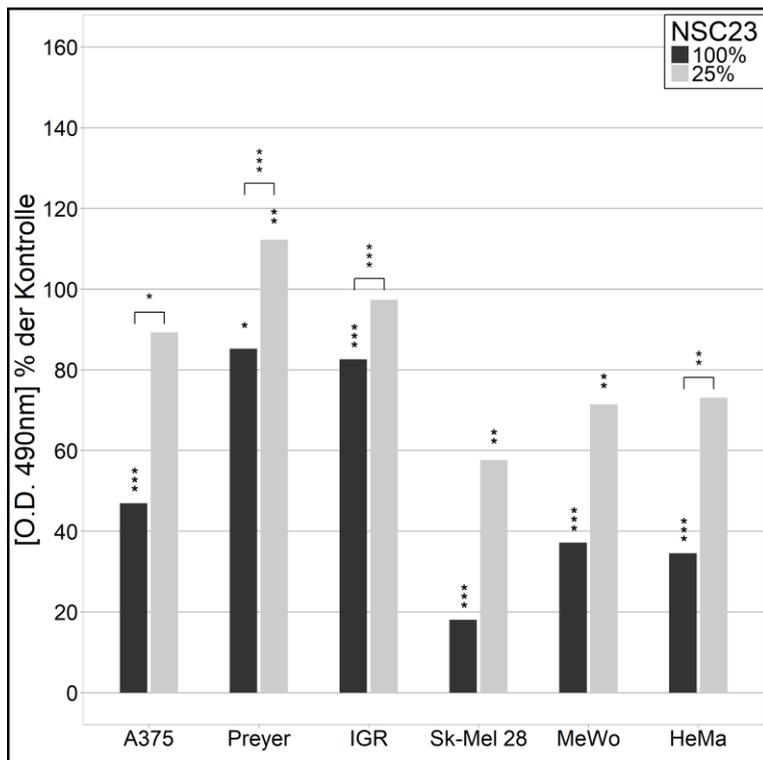


Abbildung 24: Hemmung von Rac1 durch NSC23766. Darstellung der Messwerte der optischen Dichte im Bezug auf die jeweilige unbehandelte Referenzkultur. Diese ist als 100 % gesetzt und nicht mit abgebildet. (*p<0,05; **p<0,01; *p<0,001). Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).**

3.5. Immunhistologische Untersuchungen

Um Rückschlüsse auf die Aktivität der durch Hypoxie und ROS aktivierten Signalwege *in vivo* zu erhalten, wurden Gewebepreparate sowie kultivierte Zellen auf die Expression von Hypoxiemarkern untersucht. Ferner wurde die Expression von potentiellen Melanomstammzellmarkern untersucht und auf eine Kolo-kalisation mit den Hypoxiemarkern geachtet. So sollte festgestellt werden, ob insbesondere mit Hypoxie und ROS assoziierte Signalwege exprimiert werden, ähnlich wie dies bei hämatologischen Stammzellen und hämatologischen Malignomen der Fall ist [221, 222].

3.5.1. Untersuchungen an Gewebepreparaten

Untersucht wurden einzelne Präparate von Nävuszellnävus, Primärmelanomen und Metastasen dieser Melanome. Die Melanompräparate umfassten die Subtypen akrolentiginöses, amelanotisches, Lentigo Maligna, noduläres und superfiziell spreitendes Melanom. Die Präparate wurden im Rahmen der Routinediagnostik der Universitäts-hautklinik Magdeburg nach entsprechender Aufklärung und schriftlicher Einwilligung der Patienten entnommen. Gefärbt wurden sie jeweils mit einer Kombination aus Antikörpern gegen Hypoxiemarker und Stammzellmarker.

Die Abbildungen 25 bis 30 zeigen Ergebnisse dieser Färbungen.

In Abbildung 25 und 26 sind die Aufnahmen eines superfiziell spreitenden Melanoms (Abb. 25 a, c, 26 a, c) und einer Metastase desselben Melanoms (Abb. 25 b, d, 26 b, d) zu sehen. Bei Abbildung 26 a, b ist zur besseren Strukturerkennung die Lichtbildaufnahme des Präparates unterlegt.

Dieses SSM wurde bei einem 56-jährigen männlichen Patienten am rechtsseitigen Abdomen entdeckt. Histologisch handelte es sich um ein primäres superfiziell spreitendes malignes Melanom mit nodulärem Anteil. Das Tumorstadium entsprach bei Diagnose einer Tumordicke von 3,4 mm, Clark Level V, pT3 N2b M1c, Stadium IV (AJCC 2002). Bei der Metastase handelte es sich um eine subkutane Metastase, die zehn Monate nach Erstdiagnose entfernt wurde.

Es zeigte sich eine starke Expression der Hypoxiemarker (rot) HIF-1 α (Abb. 25 a-d), VEGF (Abb. 25 c, d) und Nrf2 (Abb. 26 c, d) innerhalb des primären malignen Melanoms (Abb. 25 a, c, 26 c) sowie innerhalb der Metastasen dieses Melanoms (Abb. 25 b, d, 26 d). Gelb angefärbte Bereiche wiesen eine Überlagerung der Färbungen von Stammzellmarker (grün) und Hypoxiemarker auf, was einer Kolo-kalisation von HIF-1 α und ABCB5

(Abb. 25 a, b) bzw. von Nrf2 und JARID-1B (Abb. 26 c, d) entsprach. Areale mit einer Kolokalisation der Hypoxiemarker HIF-1 α , VEGF und ABCB5 wiesen eine helle Färbung auf (Abb. 25 d). Der Stammzellmarker ABCB5 war in der Metastase stärker exprimiert als im primären Melanom.

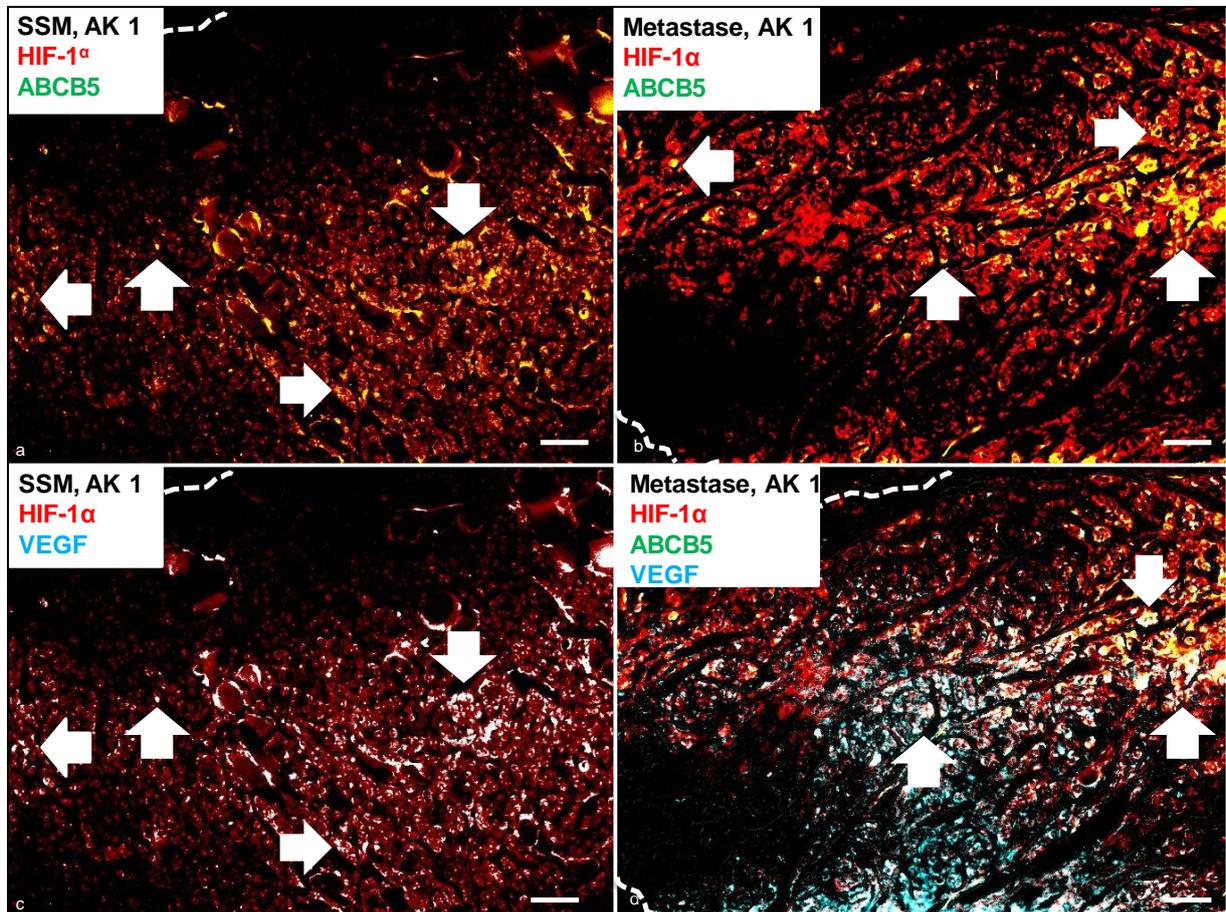


Abbildung 25: SSM und Metastase, AK 1. a: SSM, b: Metastase: die Pfeile zeigen auf Areale mit Kolokalisation des Hypoxiemarkers HIF-1 α und des Stammzellmarkers ABCB5. c:SSM: die Pfeile zeigen auf Areale mit Kolokalisation des Hypoxiemarkers HIF-1 α und des Hypoxiemarkers VEGF. d: Metastase: die Pfeile zeigen auf Kolokalisation der Hypoxiemarker HIF-1 α und VEGF sowie des Stammzellmarkers ABCB5. (Balken 100 μ m).

Die Abbildung 26 a, b zeigt Ergebnisse einer Färbung mit einer Antikörperkombination gegen die Stammzellmarker ABCB5 und ALDH1A1. Innerhalb der Metastase (Abb. 26 b) stellten sich beide Marker stärker da, als im primären Melanom (Abb. 26 a) und insbesondere der Marker ABCB5 war innerhalb der Metastase stärker nachweisbar. Für beide Marker fanden sich Areale mit gemeinsamer Lokalisation, als auch solche in denen sie getrennt auftraten.

Abb. 26 c, d zeigt Ergebnisse der Antikörperkombination von Hypoxiemarker Nrf2 und Stammzellmarker JARID-1B. Der Stammzellmarker zeigte sich nur in gemeinsamer Lokalisation mit dem Hypoxiemarker, während der Hypoxiemarker auch unabhängig vom Stammzellmarker nachgewiesen werden konnte.

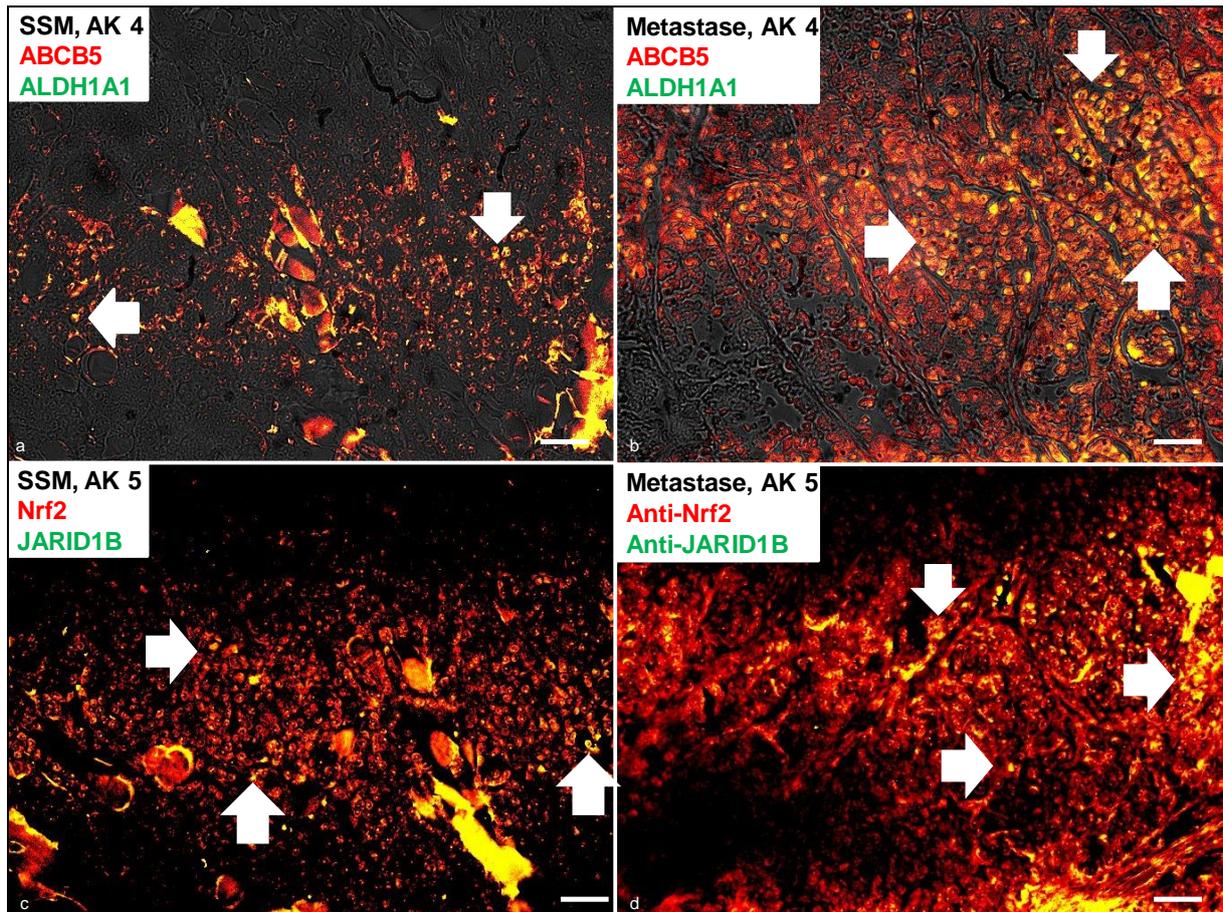


Abbildung 26: SSM und Metastase. Zur besseren Strukturerkennung ist bei a und b eine Lichtbildaufnahme unterlegt. a: SSM, AK 4, b: Metastase, AK 4: die Pfeile zeigen auf Areale mit Kolokalisation der Stammzellmarker ABCB5 und ALDH1A1. c: SSM, AK 5, d: Metastase, AK 5: die Pfeile zeigen auf Areale mit Kolokalisation des Hypoxiemarkers Nrf2 und des Stammzellmarkers JARID-1B. (Balken 100 µm).

Abbildung 27 und 28 zeigen Aufnahmen eines nodulären Melanoms (Abb. 27 a, c, 28 a) und einer Metastase desselben Melanoms (Abb. 27 b, d, 28 b).

Dieses noduläre Melanom wurde bei einer 95-jährigen Patientin an der linken Wange diagnostiziert. Diese sonnenexponierte Lokalisation lässt eine UV-induzierte Melanomentstehung vermuten. Histologisch handelte es sich um ein primär noduläres malignes Melanom, Clark Level IV, Tumordicke nach Breslow 4 mm. Zum Diagnosezeitpunkt lagen bereits multiple kutane Metastasen vor. Bei der hier dargestellten Metastase handelte es sich um eine kutan-subkutan lokalisierte Metastase aus unmittelbarer Nähe des primären Melanoms.

Es zeigte sich eine starke Expression der Hypoxiemarker (rot) Nrf2 (Abb. 27 a, b) und HIF-2 α (Abb. 27 c, d) innerhalb des primären malignen Melanoms (Abb. 27 a, c) sowie innerhalb der Metastasen dieses Melanoms (Abb. 27 b, d). In den gelb dargestellten Bereichen lag eine Überlagerung der Färbung von Stammzellmarker (grün) und Hypoxiemarker vor, was auf

eine Koloalisation von Nrf2 und p75 NGF (Abb. 27 a, b) sowie HIF-2 α und CD133 (Abb. 27 c, d) hinweist. Beide Stammzellmarker waren in der Metastase stärker nachweisbar, als im primären Melanom. Zudem fanden sich Bereiche, in denen p75 NGF bzw. CD133 unabhängig von einem Hypoxiemarker exprimiert wurden. Diese Bereiche sind in den Abbildungen mit blauen Pfeilen markiert.

Abbildung 28 zeigt dasselbe noduläre Melanom und dieselbe Metastase, gefärbt mit einer Antikörperkombination gegen die Stammzellmarker ABCB5 und ALDH1A1. Innerhalb der Metastase (Abb. 28 b) stellten sich beide Marker wesentlich stärker dar, als im primären Melanom (Abb. 28 a).

Zu einigen der untersuchten Melanompräparate lagen auch Präparate von Nävuszellnävus derselben Patienten vor. Abbildung 29 und 30 zeigen beispielhaft eine Färbung mit AK 3 bzw. AK 4. Hier war ebenfalls eine deutliche Expression der untersuchten Hypoxiemarker HIF-2 α bzw. Nrf2 nachweisbar (s. Abb. 29 a, b bzw. Abb. 30 a, b) Eine Expression des Stammzellmarkers CD 133 zeigte sich nicht (Abb. 29 b, c). Es fand sich eine Expression des Stammzellmarkers p75 NGF (Abb. 30 b, c).

Weitere Stammzellmarker waren in Nävuszellnävus nicht detektierbar. Diese Ergebnisse sind hier nicht dargestellt.

Insgesamt zeigte sich bei der Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Gewebepräparate neben der spezifischen Bindung der Antikörper an die entsprechenden Zielantigene auch eine unspezifische Bindung der Antikörper am Bindegewebe.

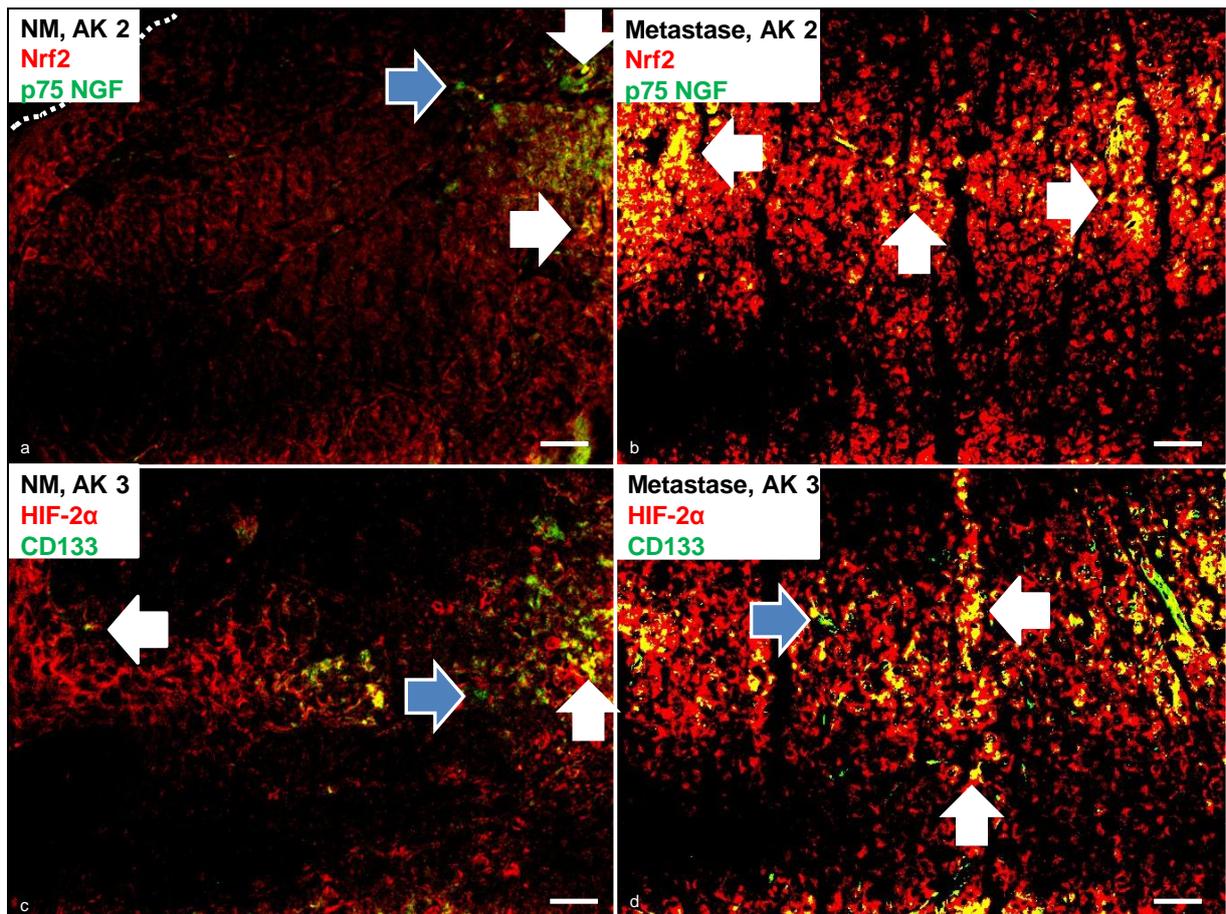


Abbildung 27: NM und Metastase. a: NM, AK 2, b: Metastase, AK 2: die weißen Pfeile zeigen auf Areale mit Kolokalisation des Hypoxiemarkers Nrf2 und des Stammzellmarkers p75 NGF, der blaue Pfeil zeigt auf ein Areal mit alleiniger Stammzellmarker-Expression. c: NM, AK 3, d: Metastase: die weißen Pfeile zeigen auf Areale mit Kolokalisation des Hypoxiemarkers HIF-2 α und des Stammzellmarkers CD133, die blauen Pfeile zeigen auf Areale mit alleiniger Expression des Stammzellmarkers. (Balken 100 μ m).

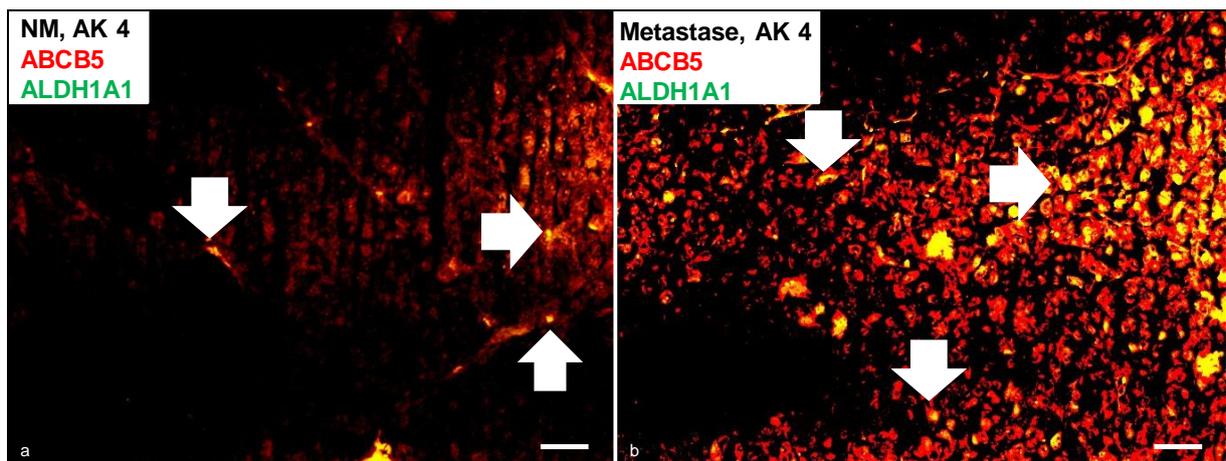


Abbildung 28: NM und Metastase, AK 4. a: NM, b: Metastase: die Pfeile zeigen auf Areale mit Kolokalisation der Stammzellmarker ABCB5 und ALDH1A1. (Balken 100 μ m).

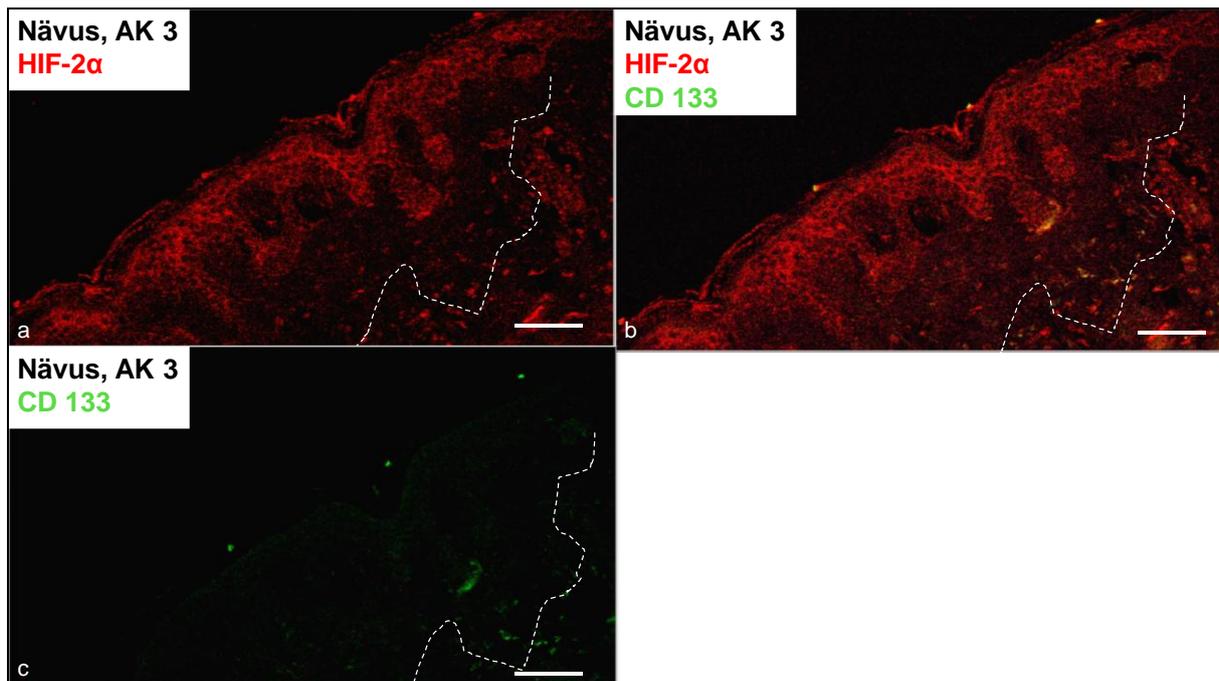


Abbildung 29: Nävuszellnaevus, AK 3: deutlich zeigt sich die Expression des Hypoxiemarkers HIF-2 α (a.,b.). Eine Expression des Stammzellmarkers CD 133 ist nicht erkennbar. c: Die Bindung der Antikörper gegen CD133 in der Epidermis und Dermis wird als unspezifisch gewertet. (Balken 200 μ m).

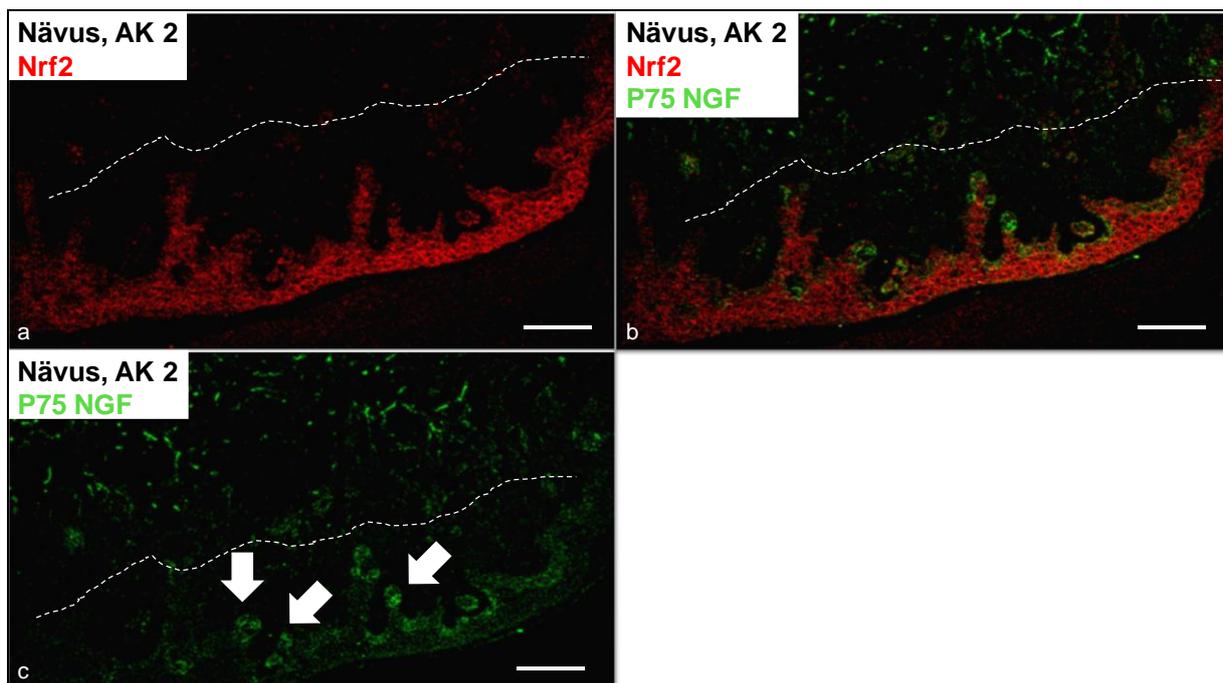


Abbildung 30: Naevuszellnaevus, AK 2: deutlich zeigt sich die Expression des Stammzellmarkers Nrf 2 in der Epidermis und Dermis sowie vereinzelt in Naevuszell-Nestern. Die Bindung in der Epidermis und Dermis wird als überwiegend unspezifische Bindung gewertet (a,b). c: Die Pfeile weisen auf Areale mit einer Expression des Stammzellmarkers p75 NGF hin. (Balken ca. 200 μ m).

3.5.2. Untersuchungen an Zellkulturen

Die Melanomzelllinien A375, MeWo, Preyer und Sk-Mel 28 wurden auf Deckgläsern kultiviert und immunhistochemisch gefärbt. Verwendet wurden, wie auch bei den Gewebepräparaten, Kombinationen aus Antikörpern gegen Hypoxie- und Stammzellmarker. Statt Melan-A wurde hier der Farbstoff DAPI verwendet, der selektiv Strukturen der Zellkerne färbt. Dies ermöglichte eine bessere Übersicht und Orientierung innerhalb des Präparates.

Die Abbildungen 31 bis 33 zeigen die Ergebnissen der Färbungen mit diesen Antikörperkombinationen (AK) an den Zelllinien MeWo und Sk-Mel 28. Markiert wurden mit AK 2, 3, 5 jeweils ein Hypoxiemarker (rot) und ein Stammzellmarker (grün).

Mit AK 1 wurden zwei Hypoxiemarker (rot, cyan) und ein Stammzellmarker (grün) angefärbt. So konnte eine Koexpression der beiden Hypoxiemarker VEGF und HIF-1 α untersucht werden. Mit AK 4 wird die Expression der beiden Stammzellmarker ABCB5 (rot) und ALDH1A1 (grün) untersucht. Tabelle 3 bietet eine Übersicht über die genutzten Antikörperkombinationen und markierten Strukturen.

In allen untersuchten Präparaten wurde eine Expression der Hypoxiemarker HIF-1 α , HIF-2 α , VEGF und Nrf2 nachgewiesen. Der Marker VEGF fand sich nur in gemeinsamer Lokalisation mit HIF-1 α (Abb. 31 a, 33 a)

In allen Präparaten wurden Zellen markiert, die eine Expression von Stammzellmarkern zeigten. Dabei fanden sich ABCB5 und JARID-1B in gemeinsamer Lokalisation mit den Hypoxiemarkern HIF-1 α bzw. Nrf2 (Abb. 31 a, 32 a, b, 33 a). Der Stammzellmarker ALDH1A1 war nur an solchen Zellen nachweisbar, an denen sich auch eine Expression von ABCB5 fand (Abb. 31 d, 33 d). Die Marker p75 NGF und CD133 traten sowohl in gemeinsamer Lokalisation mit den Hypoxiemarkern Nrf2 bzw. HIF-2 α , als auch unabhängig von diesen auf (Abb. 31 b, c, Abb. 33 b, c).

Die oben beschriebenen Ergebnisse entsprechen denen, der hier nicht dargestellten Färbungen an den Zellkulturen A375 und Preyer.

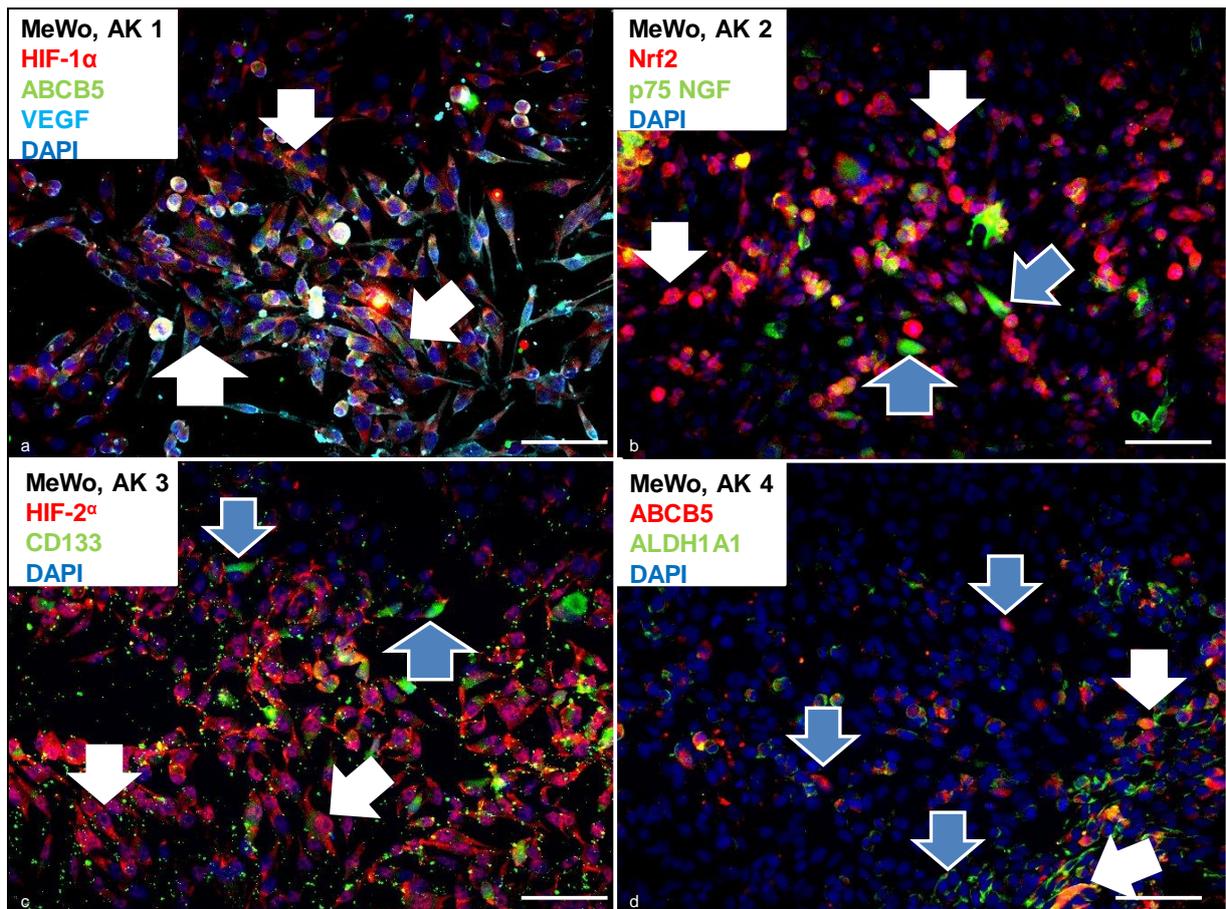


Abbildung 31: MeWo. a, AK 1: die weißen Pfeile zeigen auf Zellen mit Kolokalisation der Hypoxiemarker HIF-1 α , VEGF und des CSC-Markers ABCB5. b, AK 2: die weißen Pfeile zeigen auf Zellen mit Kolokalisation des Hypoxiemarkers Nrf2 und des CSC-Markers p75 NGF, die blauen Pfeile zeigen auf Zellen mit alleiniger Expression des Stammzellmarkers. c, AK 3: die weißen Pfeile zeigen auf Zellen mit Kolokalisation des Hypoxiemarkers HIF-2 α und des CSC-Markers CD133, die blauen Pfeile zeigen auf Zellen mit alleiniger Expression des Stammzellmarkers. d, AK 4: die Pfeile zeigen auf Zellen mit Kolokalisation der CSC-Marker ABCB5 und ALDH1A1, die blauen Pfeile weisen auf Zellen die nur einen der CSC-Marker exprimieren. (Balken 50 μ m).

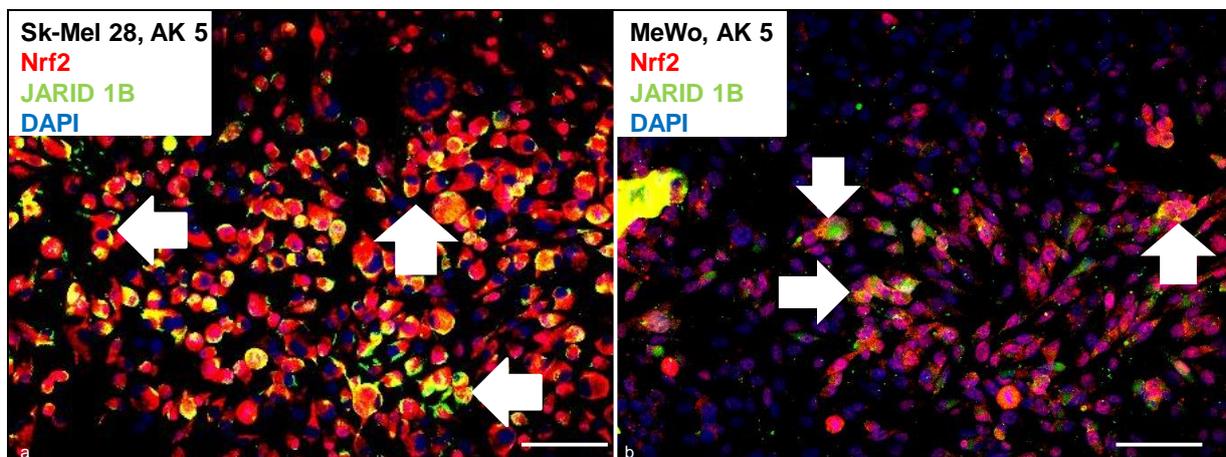


Abbildung 32: a, Sk-Mel 28, AK 5: die Pfeile zeigen auf Zellen mit Kolokalisation des Hypoxiemarkers Nrf2 und des CSC-Markers JARID-1B. b, MeWo, AK 5: die Pfeile zeigen auf Zellen mit Kolokalisation des Hypoxiemarkers Nrf2 und des CSC-Markers JARID-1B. (Balken 50 μ m).

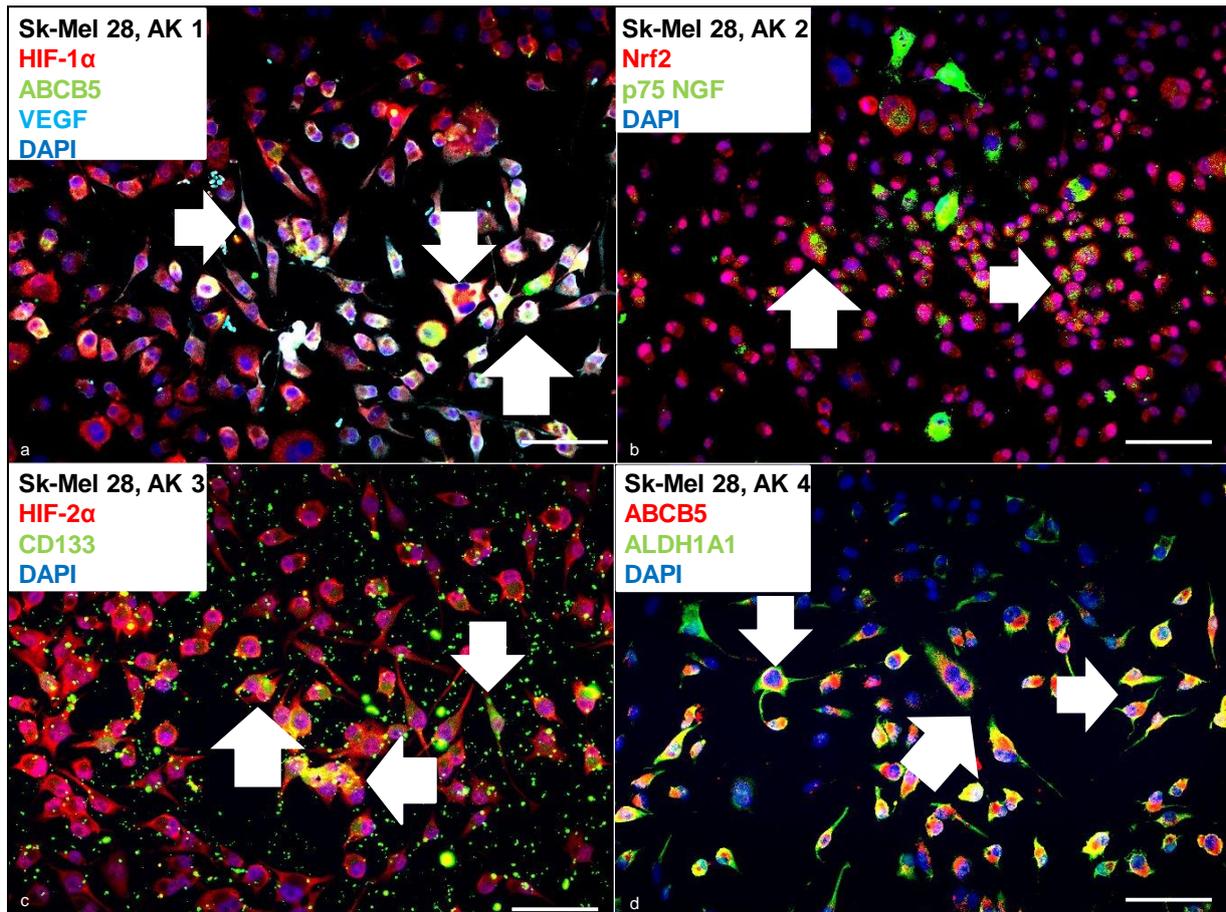


Abbildung 33: Sk-Mel 28. a, AK 1: die Pfeile zeigen auf Zellen mit Kolokalisation der Hypoxiemarker HIF-1 α , VEGF und des CSC-Markers ABCB5. b, AK 2: die Pfeile zeigen auf Zellen mit Kolokalisation des Hypoxiemarkers Nrf2 und des CSC-Markers p75 NGF. c, AK 3: die Pfeile zeigen auf Zellen mit Kolokalisation des Hypoxiemarkers HIF-2 α und des CSC-Markers CD133. d, AK 4: die Pfeile zeigen auf Zellen mit Kolokalisation der CSC-Marker ABCB5 und ALDH1A1. (Balken 50 μ m).

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden der Einfluss von Hypoxie und ROS auf die Proliferation und die Progression des malignen Melanoms untersucht. Insbesondere die zur Anpassung an diese Bedingungen relevanten Signalkaskaden und die daran beteiligten Transkriptionsfaktoren HIF-1, HIF-2, Nrf2 und NFκB wurden betrachtet. Es wurde überprüft, ob Melanomzellen über eine größere Menge ROS verfügen als Melanozyten. Untersucht wurde zudem, ob oxidativer Stress und die vermehrte Expression der Hypoxiemarker mit einem aggressiveren Melanomphänotypen einhergehen sowie, ob die Expression von Melanomstammzellen durch ROS reguliert wird und die Expression der Hypoxiemarker als Prognosefaktor für die Tumorprogression geeignet ist.

In der Literatur wird ein erhöhtes Aufkommen von oxidativem Stress für verschiedene Karzinome beschrieben und ein Zusammenhang zwischen erhöhter ROS-Bildung und der Tendenz zur Metastasierung hergestellt [52, 223]. Auch für die Karzinogenese des malignen Melanoms spielt die gesteigerte Bildung von Sauerstoffradikalen eine wichtige Rolle und unter hypoxischen Bedingungen kommt es eher zu einer malignen Transformation der Melanozyten [29, 46, 224].

In dieser Arbeit wurden bei 37 %- 53 % der Melanomzellen erhöhte Mengen ROS nachgewiesen, wohingegen nur 13 % der Melanozyten erhöhte ROS-Level aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass in Melanomzellen verstärkt oxidative Prozesse aktiv sind und erhöhte Level oxidativen Stresses vorliegen. Die hier untersuchten Melanomzellen wiesen eine verstärkte Expression der Transkriptionsfaktoren HIF-1α, HIF-2α und Nrf2 auf. Insbesondere wurde eine deutliche Expressionssteigerung von HIF-1α in allen Melanomzelllinien registriert. Dies lässt auf eine erhöhte Toleranz dieser Zellen gegenüber oxidativem Stress schließen. Dass sich nach Zugabe von Kobalddichlorid zu A375 eine weitere Expressionssteigerung von HIF-1α zeigte, bei gleichzeitigem Rückgang der Expression von HIF-2α und Nrf2, verdeutlicht die besondere Bedeutung von HIF-1α in der Anpassung an oxidativen Stress. Auch *Chandel et al* zeigten, dass der Effekt der durch CoCl₂ initiierten Hypoxie über die Bildung von ROS vermittelt wird und zur Aktivierung HIF-1 vermittelter Signalkaskaden führt [225].

Verschiedene Melanomzelllinien und eine Melanozytenzelllinie wurden unter hypoxischen Bedingungen kultiviert, um den Einfluss von Hypoxie auf die zelluläre Proliferation genauer zu untersuchen. Dabei zeigte sich eine signifikante Steigerung der melanozytären Proliferation, wobei die Stärke dieses Effekts mit der Dauer der Stimulation zunahm. Die Bestimmung der Zellen mit erhöhter ROS-Menge ergab, dass nur ein geringer Anteil der

Melanozyten erhöhte ROS-Level aufwies. Gleichzeitig zeigte sich im Westernblot bei Melanozyten die geringste Expression der zur Anpassung an Hypoxie und ROS relevanten Transkriptionsfaktoren. Hypoxische Wachstumsbedingungen oder die Steigerung der zellulären H₂O₂-Menge durch Zugabe des SOD^o1-Inhibitors ATTM wirkte stimulierend auf die Proliferation der Melanozyten. Die chemische Inhibition der HIF-Signalwege (CAS93, FM19, CAS88, KC7F2, CAY) oder der ROS-Produktion (DPI, Apocynin) wirkte überwiegend proliferationshemmend. Dabei war der Rückgang der Messwerte bei den Melanozyten teilweise so ausgeprägt, dass auch von einem Sterben der Zellen ausgegangen werden kann. Es ist bekannt, dass zelluläre Hypoxie über die Bildung von Sauerstoffradikalen proliferationsfördernde Signalkaskaden in Melanozyten aktiviert [39, 44, 48, 55]. Die Aufgabe der Melanozyten besteht darin, durch Bildung von Melanin, vor der teratogenen UV-Wirkung zu schützen. Melanozyten reagieren auf UV-Exposition mit einer Steigerung der Melanin-Synthese und der Mitoserate [226]. Insbesondere bei UV-A Strahlung wird dieser Effekt durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies vermittelt [19]. Dies erklärt, weshalb es durch Hypoxie und ROS zu einer Stimulation der melanozytären Proliferation kommt. Interessanterweise kam es durch Simulation von Hypoxie durch CoCl₂ zu einer deutlichen Proliferationshemmung. Dies lässt vermuten, dass hier eine zu starke Konzentration angewandt wurde, so dass es zu einer Zellschädigung der Melanozyten kam.

Bei den Melanomzellen kam es, abhängig von der jeweiligen Zelllinie, durch hypoxische Wachstumsbedingungen oder die chemische Beeinflussung der nachgeschalteten Signalwege zu unterschiedlichen Ergebnissen.

Die Melanomzelllinie A375 wird als aggressiv und rasch proliferierend beschrieben. Sie wurde aus einem primären malignen Melanom isoliert [157]. A375 ist *BRAF* mutiert und *RAC-1* Wildtyp. Die aktivierende *BRAF*-Mutation führt zu einer Aktivitätssteigerung des Akt-Signalweges und trägt so zu einer besseren Toleranz der Zelle gegenüber ROS bei [9, 10, 115]. Die Aktivierung des Akt-Signalweges führt zu einer vermehrten Synthese der HIF-1 α Untereinheit auch unter Normoxie [96]. Dies konnte durch die Ergebnisse des Westernblots bestätigt werden, der bei A375 die höchste Expression von HIF-1 α ergab. Diese Zelllinie wies den geringsten Anteil ROS-positiver Melanomzellen auf. Kultivierung für 24 Stunden in Hypoxie führte zu keiner signifikanten Änderung der Proliferation. Eine längere hypoxische Episode wirkte signifikant proliferationshemmend und scheint zum Zelltod zu führen. Die chemische Inhibition HIF-vermittelter Signalwege hatte, abhängig von der jeweiligen Substanz und der verwendeten Konzentration, sowohl proliferationshemmende als auch – stimulierende Effekte. Dabei zeigte sich nach Zugabe der stärker verdünnten HIF-Inhibitoren bis auf bei KC7F2 eine signifikante Proliferationssteigerung. Die stärker konzentrierten Substanzen hingegen führten zu keiner signifikanten Proliferationsänderung oder zu einem

Rückgang der Proliferation. Die Verstärkung des oxidativen Stresses durch Zugabe von ATTM stimulierte die Proliferation, wobei dieser Effekt bei der geringeren Konzentration signifikant stärker ausfiel. Insgesamt scheint A375, bei bereits hoher Ausgangsexpression, eine weitere Expressions- und Aktivitätssteigerung der Hypoxie-relevanten Signalwege nur schlecht zu tolerieren. Durch eine weitere Stimulation kommt es rasch zum Erreichen der Toleranzgrenze und schließlich zur Proliferationshemmung und zum Zelltod.

Die Zelllinie MC wurde wie A375 aus einem primären malignen Melanom isoliert [162]. Über ihren Mutationsstatus fanden sich bei der Literaturrecherche keine Angaben. Im Westernblot zeigte sich eine starke Expression von HIF-1 α . Durch Kultivierung in Hypoxie kam es hier zu einer Hemmung der Proliferation und zum Zelltod. Dabei ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Messungen nach 24 Stunden und 72 Stunden Hypoxie, so dass die Vermutung naheliegt, dass eine längere Exposition gegenüber Hypoxie zu einer Anpassung an diese Wachstumsbedingungen führt.

Die Zelllinie MeWo entstammt einer Lymphknoten-Metastase eines malignen Melanoms [163, 164]. Diese Zelllinie ist *BRAF* Wildtyp und *N-RAS* Wildtyp [161, 165]. MeWo wies nur einen geringen Anteil ROS-positiver Zellen auf und zeigte eine geringe Expression der Hypoxiemarker. Diese Zelle zeigte bei Kultivierung für 24 Stunden unter Hypoxie keine signifikante Änderung ihres Proliferationsverhaltens. Nach 72 Stunden zeigte sich eine signifikante Steigerung der Proliferation. Die Steigerung des oxidativen Stresses durch ATTM in 100 % Konzentration wirkte stimulierend auf die Proliferation von MeWo. Die niedrigere Konzentration von ATTM wirkte signifikant proliferationshemmend. Durch chemische Inhibition der HIF-Signalwege kam es überwiegend zu einer Proliferationshemmung. Dabei fiel jedoch bei den höheren Konzentrationen von CAS93, FM18 und CAY eine deutliche, signifikante Proliferationssteigerung auf, während die stärker verdünnten Stoffe eine Hemmung der Proliferation bewirkten. Durch den nativen *BRAF* und *N-RAS* Mutationsstatus liegt bei MeWo nur eine geringe Expressionssteigerung der hypoxierelevanten Signalwege und Transkriptionsfaktoren vor, so dass Hypoxie und ROS als starker Proliferationsreiz wirken können.

Die Zelllinie Sk-Mel 28 wurde aus einer axillären Lymphknotenmetastase gewonnen und ist *BRAF* mutiert und *N-RAS* Wildtyp [164, 167]. Dies lässt auf eine Aktivierung der Akt-Signalkaskade und eine Steigerung der Expression von HIF-1 α schließen. Eine weitere Stimulation durch hypoxische Wachstumsbedingungen führte zu einer Proliferationssteigerung. Dabei wurde jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Messungen nach 24 Stunden und 72 Stunden Hypoxie festgestellt. Daher scheint es, dass bei längerer Exposition der proliferationsstimulierende Effekt nachlässt. Die durch ATTT

vermittelte Steigerung der H₂O₂-Produktion wirkte proliferationsstimulierend. Die chemische Inhibition der HIF-vermittelten Signalwege führte überwiegend zu einem Rückgang der Proliferation. Sk-Mel 28 ist mit einem Anteil von 45 % ROS-positiver Zellen bereits an ein hohes Ausgangslevel oxidativen Stresses angepasst. Hypoxie sowie eine weitere Stimulation der mit Hypoxie assoziierten Signalwege werden von dieser Zelllinie gut toleriert und wirken sich positiv auf die Zellproliferation aus. Die Inhibition dieser Signalwege wirkt jedoch schädigend und proliferationshemmend.

Die Zelllinie Preyer entstammt einer subkutanen Melanommetastase [166]. Über den Mutationsstatus dieser Zelllinie fanden sich bei der Literaturrecherche keine Angaben. Durch kurzzeitige Hypoxie kam es zu einer Proliferationssteigerung, während nach 72 Stunden Hypoxie keine signifikante Änderung des Proliferationsverhaltens im Vergleich zur Referenz mehr nachweisbar war. Zudem unterschieden sich die Messwerte nach 72 Stunden Hypoxie nicht signifikant von denen nach 24 Stunden Hypoxie. Dies spricht dafür, dass ein längeres hypoxisches Intervall bei dieser Zelllinie proliferationshemmend wirkt. Die durch Zugabe von ATTM vermittelte Erhöhung des zellulären H₂O₂-Levels wirkte proliferationssteigernd. Nach Zugabe der verschiedenen HIF-Inhibitoren wurde sowohl eine Steigerung der Proliferation als auch eine Hemmung beobachtet. Dabei führten die stärker verdünnten Substanzen überwiegend zu einer Steigerung der Proliferation, während die konzentrierten Chemikalien hemmend auf die Proliferation wirkten. Preyer verfügte mit einem Anteil von 53 % ROS-positiver Zellen bereits über eine große Menge ROS. Im Westernblot fiel jedoch eine eher geringe Expression der Hypoxiemarker auf. Diese Daten zeigen erneut, dass die Proliferation von Melanomzellen durch Hypoxie und ROS nicht unbegrenzt stimuliert werden kann. Es scheint einen Schwellenwert zu geben, ab dessen Erreichen dieser stimulierende Effekt aufgehoben wird und bei dessen Überschreiten es zum Proliferationsstopp und schließlich zum Zelltod kommt.

Die Zelllinie IGR-1 wurde aus einer Lymphknoten-Metastase eines malignen Melanoms isoliert [159]. IGR-1 ist *BRAF* mutiert, *RAC-1* mutiert und *N-RAS* Wildtyp [118, 160, 161] Mit 51 % ROS-positiver Zellen war der Anteil ähnlich hoch wie bei Preyer. Jedoch zeigte sich eine höhere Expression der hypoxierelevanten Transkriptionsfaktoren. Bei IGR-1 kam es nach Zugabe der HIF-Inhibitoren zu einer Proliferationshemmung. Die Steigerung der ROS-Menge durch Zugabe von ATTM beeinflusste die Proliferation nicht signifikant. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass diese Zelllinie bereits an ein hohes Level oxidativen Stresses adaptiert ist und die entsprechenden Signalwege bereits maximal aktiviert sind. Durch Hemmung der HIF-vermittelten Signalwege überwiegt der schädigende Effekt der Sauerstoffradikale und es kommt zu Apoptose und Proliferationshemmung. Diese Zelllinie

kann Änderungen der Sauerstoffkonzentration oder der zellulären ROS-Menge nur noch schlecht tolerieren.

Bei allen untersuchten Melanomzelllinien kam es durch DMOG zu einer Hemmung der Proliferation. Diese Substanz sorgt für eine Stabilisierung von HIF-1 α unter Normoxie [201, 202]. Dies lässt vermuten, dass die alleinige Aktivierung von HIF-1 α keine Proliferationsstimulation der Melanomzellen verursachen kann, sondern eine gleichzeitige Erhöhung der ROS-Bildung notwendig ist, um diesen Effekt zu verursachen.

Die Substanzen DPI und Apocynin hemmen die NADPH-Oxidase, so wird die zelluläre ROS-Bildung gehemmt und der oxidative Stress verringert [40, 207]. Die Zugabe von DPI wirkte auf alle Melanomzelllinien proliferationshemmend, während Apocynin überwiegend proliferationsstimulierend wirkte.

Es scheint eine feine Balance zwischen oxidativen und antioxidativen Mechanismen zu geben, so dass die Änderung eines Parameters, abhängig von der Stärke der Änderung und abhängig von den Kompensationsmechanismen, zu einer Proliferationshemmung oder –stimulation führen kann (s. Abb. 34).

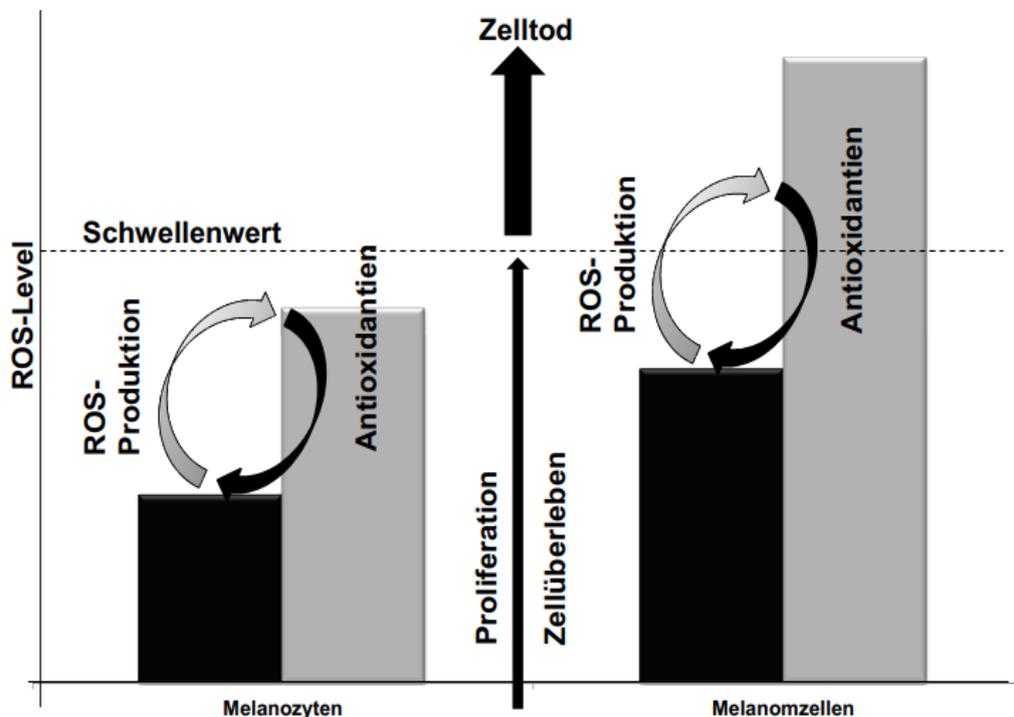


Abbildung 34: Möglicher Mechanismus: Melanomzellen verfügen bereits unter normalen Wachstumsbedingungen über höhere ROS-Werte als Melanozyten. Um den Zelltod zu verhindern sind daher bereits antioxidative Mechanismen, wie etwa eine Hochregulation von Nrf2, verstärkt aktiv. Eine Erhöhung des oxidativen Stresses wirkt proliferationsstimulierend. Ab Überschreiten eines Schwellenwertes kann der schädigende Effekt der ROS nicht mehr ausgeglichen werden und es kommt zum Zelltod. Deshalb ist eine fein justierte ROS-Adaption mit ROS-induzierenden und ROS-reduzierenden Mechanismen entscheidend (adaptiert nach Trachootham *et al* 2008 [227]).

Nrf2 gilt als der bedeutendste Transkriptionsfaktor in der Regulation der Zellantwort auf oxidativen Stress und trägt zudem zur Entwicklung der Apoptose-Resistenz von Krebszellen bei [52, 58, 228]. Für viele maligne Tumore ist eine Überexpression und erhöhte Stabilität von Nrf2 beschrieben. Durch die verstärkte Aktivität der antioxidativen Prozesse wird das Zellüberleben gesichert und eine weitere Zellproliferation ermöglicht [54, 68].

Luteolin inhibiert die zelluläre ROS-Produktion und erhöht die Proteinmenge von Nrf2 und Nrf2-Zielgenen. Zudem inhibiert Luteolin HIF-1, mTOR/Akt und NFκB [208, 209]. So verringert sich der oxidative Stress der Zelle und es kommt zu einem Anstieg antioxidativer Mechanismen durch Expressionssteigerung der Nrf2-Zielgenen. Gleichzeitig werden die proliferationsaktivierenden Signalwege von HIF und mTOR gehemmt. Auch Cucurbitacin B inhibiert die zelluläre ROS-Produktion und führt zu einer Aktivierung von Nrf2 und Hemmung von HIF-1α [212, 213, 229]. Trigonelline bewirkt ebenfalls eine Reduzierung der zellulären ROS-Produktion und –Konzentration inhibiert jedoch Nrf2 [210, 211].

Die Zugabe von Cucurbitacin B führte bei allen untersuchten Melanomzelllinien sowie bei den Melanozyten zu einem Rückgang der Proliferation. Dabei fiel der Rückgang der Messwerte nach Zugabe von Cucurbitacin B überwiegend so stark aus, dass von einem zytotoxischen Effekt ausgegangen werden kann. Die Ergebnisse der an A375 und Preyer durchgeführten Verdünnungsreihe mit Cucurbitacin B bestätigten diese Ergebnisse.

Die Zugabe von Luteolin wirkte auf Melanozyten deutlich proliferationshemmend. Hier kann aufgrund der Stärke dieses Effekts ebenfalls von einer zytotoxischen Wirkung ausgegangen werden. Auch bei den Melanomzellen führte die 100 % Konzentration von Luteolin zu einer deutlichen Hemmung der Proliferation und zum Zelltod. Nach Zugabe der 25 % Konzentration zeigte sich überwiegend eine Hemmung der Zellproliferation. Nur bei Preyer wurde nach Zugabe der 25 % Konzentration eine Proliferationssteigerung registriert. Die Verdünnungsreihe des Luteolins bestätigte einen deutlichen proliferationshemmenden und zytotoxischen Effekt bei A375. Bei Preyer zeigte sich ebenfalls eine proliferationshemmende und zytotoxische Wirkung bis zur 25 % Konzentration. Die 12,5 % Konzentration hatte keinen signifikanten Einfluss und 6,25 % Luteolin führte zu einer geringen, aber signifikanten Proliferationssteigerung. Insgesamt deuten die Ergebnisse jedoch auf eine deutliche proliferationshemmende Wirkung des Luteolins hin, so dass die Ergebnisse bei Preyer als Ausreißer gewertet werden.

Die durch Zugabe von Cucurbitacin B und Luteolin gewonnenen Daten zeigen, dass die Aktivierung von Nrf2 bei gleichzeitiger Hemmung der ROS-Bildung und der durch HIF-1α vermittelten Signalwege zu einer Proliferationshemmung und zum Zelltod führen. Nrf2

vermittelt die Aktivierung antioxidativer Signalwege. Da oxidativer Stress jedoch entscheidend für die Proliferation von Melanomzellen und Melanozyten ist, führt die isolierte Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors zu einem Rückgang der Proliferation und zum Zelltod.

Die untersuchten Melanozyten reagierten auf die Zugabe von 100 % Trigonelline mit einem deutlichen Rückgang der Proliferation, wobei aufgrund der Stärke dieses Effekts auch von einem zytotoxischen Effekt ausgegangen werden kann. Die verdünnte Substanz hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation der Melanozyten. Bei den Melanomzellen deuten die nach Zugabe von 100 % und 25 % Trigonelline erhaltenen Ergebnisse auf einen geringen, proliferationsstimulierenden Effekt hin. Die bei Preyer und A375 durchgeführte Verdünnungsreihe von Trigonelline bestätigte dessen proliferationsstimulierende Wirkung. Dabei ergaben sich jedoch keine konzentrationsabhängigen Effekte.

ATTM bewirkt neben einer Erhöhung der zellulären ROS-Menge durch chemische Inhibition der SOD 1 auch eine Inhibition von NFκB [205, 206]. Luteolin und Cucurbitacin B führen ebenfalls zu einer Hemmung von NFκB, bewirken jedoch eine Verringerung der zellulären ROS-Produktion [208, 212]. Weiter oben wurde bereits darauf eingegangen, dass Luteolin und Cucurbitacin B überwiegend inhibitorisch auf die Melanomproliferation wirken, während ATTM proliferationsstimulierend wirkte. Trigonelline inhibiert wie auch Cucurbitacin B und Luteolin die zelluläre ROS-Produktion. Im Gegensatz zu diesen beiden Substanzen kommt es durch Trigonelline jedoch zu einer gleichzeitigen Hemmung von Nrf2. Diese Konstellation führte zu einer Proliferationssteigerung bei Melanomzellen. Die durch Zugabe von ATTM und Trigonelline gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass eine Reduzierung des oxidativen Stresses bei gleichzeitiger Hemmung von NFκB bzw. Nrf2 proliferationsstimulierend auf Melanomzellen wirken kann. Vermutlich fallen durch die Hemmung dieser Transkriptionsfaktoren antioxidative Mechanismen weg, wodurch die oxidativen Prozesse innerhalb der Zelle überwiegen. Dies stimuliert die Proliferation der Melanomzellen.

Multiple an Zellproliferation und –überleben beteiligte Signalkaskaden werden über das Schlüsselenzym mTOR vermittelt. Die Hemmung von mTOR verlangsamt das Tumorwachstum. [59, 218, 230]. Dieser Effekt wurde auch für das maligne Melanom beschrieben [115].

Rapamycin ist ein direkter mTOR-Inhibitor [218, 219]. Die Zugabe von Rapamycin hemmte die Proliferation aller hier untersuchten Zelllinien.

Rac ist eine GTPase, die in ihrer aktiven Form an Zellmigration und Metastasierung beteiligt ist. Diese Wirkung wird über eine Aktivierung von mTOR vermittelt. Bei 4 – 7 % der

Melanom-Patienten ist eine aktivierende Mutation des Rac-Subtyps *RAC-1* nachweisbar. Die Aktivität dieses Subtyps lässt sich durch NSC23766 hemmen [7, 220, 231]. Für die untersuchten Zelllinien fanden sich bezüglich des *RAC-1* Mutationsstatus die Angaben dass A375 *RAC-1* Wildtyp ist und IGR-1 *RAC-1* P29S mutiert ist. Diese Mutation führt zu einer Aktivitätssteigerung nachgeschalteter Signalwege, wie etwa dem MAPK-Weg [118]. Die Zugabe von NSC23766 führte bei den hier untersuchten Zelllinien überwiegend zu einer Hemmung der Proliferation.

Die inhibitorische Wirkung von NSC23766 und Rapamycin auf Melanomzellen und Melanozyten bestätigten, dass die ungehemmte Aktivierung von mTOR eine Schlüsselposition in der Proliferation und Progression des malignen Melanoms einnimmt.

Die immunhistochemischen Untersuchungen der Gewebepräparate und Melanomzellen zeigten eine deutliche Expression der Hypoxiemarker HIF-1 α , HIF-2 α , Nrf2 und VEGF. Bei VEGF und HIF-1 α wurde eine gemeinsame Expression festgestellt. Dies ist wenig überraschend, da beide Transkriptionsfaktoren bei Hypoxie exprimiert werden. Der Stammzellmarker CD133 fand sich im Melanom sowohl kolokalisiert mit HIF-2 α , als auch unabhängig davon. In den Zellkulturen war eine starke Expression von HIF-1 α und HIF-2 α nachweisbar. Diese Ergebnisse sind gut mit den Ergebnissen des Westernblots vereinbar, da sich hier auch eine starke Expression dieser Marker in den entsprechenden Zelllinien gezeigt hatte. In den Zellkulturen und den Gewebepräparaten war der Stammzellmarker p75 NGF sowohl in Kolokalisation als auch unabhängig von dem Hypoxiemarker Nrf2 nachweisbar. ABCB5 fand sich nur in gemeinsamer Lokalisation mit HIF-1 α und JARID-1B nur in gemeinsamer Lokalisation mit Nrf2. Zudem fanden sich vereinzelt die Marker ABCB5 und ALDH1A in gemeinsamer Lokalisation. In den Gewebepräparaten der Nävuszellnävi waren die untersuchten Hypoxiemarker ebenfalls nachweisbar. Dies ist gut vereinbar damit, dass UV-induzierte Hypoxie und ROS die melanozytäre Proliferation regulieren. Registriert wurde zudem eine Expression des Stammzellmarkers p75 NGF in Naevuszellnaevi. Dabei handelt es sich um einen neuronalen Stammzellmarker, der auch in etwa 17 % der malignen Melanome registriert wird [145, 153]. Eine Expression anderer CSC-Markern konnte nicht gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung für die Expression von p75 NGF in Melanozyten findet sich in der Embryogenese. Während der Embryonalentwicklung wandern die Melanozytenvorläuferzellen, die Melanoblasten, aus der Neuralleiste in die Haut ein. Melanozyten haben daher denselben Ursprung wie ein Großteil des peripheren Nervensystems und die Sinneszellen der Haut [232, 233]. Daher erscheint eine Expression von p75 NGF auch an Melanozyten möglich. Da die hier untersuchten melanozytären Naevi von Patienten stammen, die bereits unter einem malignen Melanom leiden, wäre auch eine mögliche CSC-Marker Expression im Rahmen einer beginnenden Melanomentstehung

denkbar. Allerdings wiesen die untersuchten Naevi histologisch keine Malignitätskriterien auf. Zudem zeigte sich in der Auswertung der Gewebepreparate eine unspezifische Bindung der verwendeten Antikörper an Bindegewebe und Epidermis. Daher kann eine zufällige Markierung der Naevi mit anti-p75 NGF nicht sicher ausgeschlossen werden.

Die Ergebnisse der Immunhistochemie sind gut vereinbar mit der Annahme, dass insbesondere HIF-1 α und HIF-2 α für die Proliferation und Progression des malignen Melanoms bedeutsam sind. Zudem weisen die Ergebnisse darauf hin, dass es während der Entstehung und Progression des Tumors zur Expression von Melanomstammzellmarkern kommt. Insbesondere im Zuge der Metastasierung scheint es zu einer verstärkten Expression der Melanomstammzellmarker zu kommen [141]. Eine eindeutige Korrelation der Expression von Hypoxiemarkern und Melanomstammzellmarkern, die annehmen ließe, dass Melanomstammzellen besonders durch Hypoxie und Hypoxie-induzierte Signalwege reguliert werden, konnte anhand der Daten nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die in der Literatur beschriebene Bedeutung von ROS und Hypoxie sowie der nachgeschalteten Signalwege für die Progression des malignen Melanoms [113, 234]. Es wurde gezeigt, dass Melanomzellen über größere Mengen ROS verfügen als Melanozyten und die Expression der untersuchten Hypoxiemarker gesteigert ist. Dabei wiesen die metastatischen Zelllinien IGR-1, Preyer und Sk-Mel 28 den höchsten Anteil ROS-positiver Zellen auf. Dies bestätigt, dass hohe Level oxidativen Stresses mit einem aggressiven Melanomphänotyp einhergehen [228]. Zudem bestätigte sich, dass es bei fortschreitender Progression und Metastasierung zu einer Expressionssteigerung von Melanomstammzellmarkern kommt [141]. Es fand sich jedoch kein Hinweis dafür, dass dies durch Hypoxie und Hypoxie-induzierte Signalwege reguliert wird, weshalb die Expression der Hypoxiemarker als Prognosefaktor für die Tumorprogression nicht geeignet scheint. Die gewonnenen Daten zeigen, dass Hypoxie sowie die Aktivitätssteigerung nachgeschalteter Signalwege nicht zwangsläufig proliferationsstimulierend auf Melanomzellen wirkt. Vielmehr scheint eine feine Balance zwischen oxidativen und antioxidativen Mechanismen wichtig, so dass es durch Änderung eines Parameters abhängig von der Stärke der Änderung und den verfügbaren Kompensationsmechanismen zu einer Proliferationshemmung oder –stimulation kommen kann.

5. Zusammenfassung

Durch das schnelle Wachstum von Melanomgewebe nimmt die Entfernung zu den versorgenden Blutgefäßen zu, wodurch es zu zellulärer Hypoxie und oxidativem Stress kommt. Daher ist eine Anpassung der Melanomzellen an eine reduzierte Sauerstoffversorgung notwendig. Die Zellantwort auf Hypoxie und ROS wird insbesondere durch die Transkriptionsfaktoren HIF-1, HIF-2, Nrf2 und NFκB vermittelt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass Melanomzellen auch bei guter Oxygenierung über größere Mengen ROS verfügen als Melanozyten. Dabei wiesen die Melanomzellen eine deutlich gesteigerte Expression der für die Anpassung an Hypoxie und ROS entscheidenden Transkriptionsfaktoren HIF-1α, HIF-2α und Nrf2 auf. Bei allen Melanomzelllinien zeigte sich eine starke Expressionssteigerung des Transkriptionsfaktors HIF-1α. Auch in den untersuchten Gewebepreparaten von malignen Melanomen und Naevuszellnaevi wurden diese Transkriptionsfaktoren sowie Marker nachgeschalteter Signalkaskaden exprimiert. In Präparaten des malignen Melanoms wurde zudem eine Expression verschiedener, als Melanom-Stammzellmarker beschriebener Marker festgestellt. Eine Korrelation zwischen der Expression der untersuchten Hypoxiemarker und der Expression der Stammzellmarker fand sich hingegen nicht.

Durch Kultivierung unter Hypoxie sowie durch die gezielte chemische Beeinflussung der durch Hypoxie und ROS regulierten Signalkaskaden kam es zu Proliferationsänderungen bei Melanomzellen und Melanozyten. Dabei führten Hypoxie sowie die Stimulation der Signalwege zu einer Steigerung der melanozytären Proliferation, während die Inhibition dieser Signalwege proliferationshemmend wirkte. Bei den untersuchten Melanomzellen wurden sowohl stimulierende als auch hemmende Effekte registriert. Es scheint einen Schwellenwert der Stimulationsfähigkeit zu geben, bei dessen Erreichen es zu einem Proliferationsstopp kommt und bei dessen Überschreiten schließlich der Zelltod eintritt. Da Melanomzellen bereits deutlich erhöhte ROS-Werte aufweisen, sind hier antioxidative Mechanismen verstärkt aktiv. Insbesondere die hier untersuchten metastatischen Zelllinien verfügten nur noch über eine sehr geringe Toleranz für Abweichungen vom Schwellenwert. Für die Proliferation des malignen Melanoms scheint somit eine feine Balance zwischen gesteigerter ROS-Produktion und Aktivitätssteigerung antioxidativer Signalwege entscheidend.

6. Literaturverzeichnis

- [1] Robert Koch-Institut: Krebs in Deutschland für 2013/2014, 2017.
- [2] Bertz, J.: Epidemiologie des malignen Melanoms der Haut. Robert Koch Institut, Berlin (2001), S. 484–490.
- [3] Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe: Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms , Langversion 2.0 , 2016. AWMF Registernummer: 032/024OL, <http://leitlinienprogramm-onkologie.de/Melanom.65.0.html>.
- [4] Tronnier, M.; Semkova, K.; Wollina, U. et al.: Malignant melanoma: epidemiologic aspects, diagnostic and therapeutic approach. Wiener medizinische Wochenschrift (1946) 163 (2013), 15-16, S. 354–358.
- [5] Braun-Falco, O.; Burgdorf, W. H.; Landthaler, M. et al.: Dermatologie und Venerologie. Springer-Verlag, s.l., 2005.
- [6] Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. Cell (2015) 161, Heft 7, S. 1681–1696.
- [7] Halaban, R.: RAC1 and melanoma. Clinical therapeutics 37 (2015), Heft 3, S. 682–685.
- [8] Brose, M. S.; Volpe, P.; Feldman, M. et al.: BRAF and RAS mutations in human lung cancer and melanoma. Cancer research 62 (2002), Heft 23, S. 6997–7000.
- [9] Cheung, M.; Sharma, A.; Madhunapantula, S. V. et al.: Akt3 and mutant V600E B-Raf cooperate to promote early melanoma development. Cancer research 68 (2008), Heft 9, S. 3429–3439.
- [10] Davies, H.; Bignell, G. R.; Cox, C. et al.: Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature 417 (2002), Heft 6892, S. 949–954.
- [11] Hodis, E.; Watson, I. R.; Kryukov, G. V. et al.: A landscape of driver mutations in melanoma. Cell 150 (2012), Heft 2, S. 251–263.
- [12] Krauthammer, M.; Kong, Y.; Ha, B. H. et al.: Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. Nature genetics 44 (2012), Heft 9, S. 1006–1014.
- [13] Vu, H. L.; Rosenbaum, S.; Purwin, T. J. et al.: RAC1 P29S regulates PD-L1 expression in melanoma. Pigment cell & melanoma research 28 (2015), Heft 5, S. 590–598.
- [14] Kantrow, S. M.; Boyd, A. S.; Ellis, D. L. et al.: Expression of activated Akt in benign nevi, Spitz nevi and melanomas. Journal of cutaneous pathology 34 (2007), Heft 8, S. 593–596.
- [15] Nogueira, C.; Kim, K.-H.; Sung, H. et al.: Cooperative interactions of PTEN deficiency and RAS activation in melanoma metastasis. Oncogene 29 (2010), Heft 47, S. 6222–6232.
- [16] Celebi, J. T.; Shendrik, I.; Silvers, D. N. et al.: Identification of PTEN mutations in metastatic melanoma specimens. Journal of medical genetics 37 (2000), Heft 9, S. 653–657.
- [17] Dai, D. L.; Martinka, M.; Li, G.: Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 23 (2005), Heft 7, S. 1473–1482.

- [18] Stahl, J. M.; Sharma, A.; Cheung, M. et al.: Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. *Cancer research* 64 (2004), Heft 19, S. 7002–7010.
- [19] Ananthaswamy, H. N.; Pierceall, W. E.: Molecular mechanisms of ultraviolet radiation carcinogenesis. *Photochemistry and photobiology* 52 (1990), Heft 6, S. 1119–1136.
- [20] Sarasin, A.: The molecular pathways of ultraviolet-induced carcinogenesis. *Mutation research* 428 (1999), 1-2, S. 5–10.
- [21] van Kranen, H. J.; Grujil, F. R. de: Mutations in cancer genes of UV-induced skin tumors of hairless mice. *Journal of epidemiology / Japan Epidemiological Association* 9 (1999), 6 Suppl, S. 65.
- [22] Wang, S. Q.; Setlow, R.; Berwick, M. et al.: Ultraviolet A and melanoma: a review. A review. *Journal of the American Academy of Dermatology* 44 (2001), Heft 5, S. 837–846.
- [23] Kaatsch, P.; Spix, C.; Katalinic, A. et al.: Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes - Krebs in Deutschland 2011/2012. Gesundheitsberichterstattung für Deutschland. Robert Koch-Institut, Berlin, 2015.
- [24] Pflugfelder, Kochs, Czeschik, Garbe, Schadendorf: S3 Leitlinie Malignes Melanom, Version 1.1. - Februar 2013 (2013), AWMF-Register-Nummer 032-024OL.
- [25] Braud, F. de; Khayat, D.; Kroon, B. B. et al.: Malignant melanoma. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 47 (2003), Heft 1, S. 35–63.
- [26] Breslow, A.: Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Annals of surgery* 172 (1970), Heft 5, S. 902–908.
- [27] Clark, W. H.; From, L.; Bernardino, E. A. et al.: The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer research* 29 (1969), Heft 3, S. 705–727.
- [28] Thomlinson R H, Gray L H: The histological structure of some human lung cancers and the possible implications for radiotherapy. *British journal of cancer* 9 (1955), Heft 4, S. 539–549.
- [29] Bedogni, B.; Powell, M. B.: Skin hypoxia: a promoting environmental factor in melanomagenesis. A Promoting Environmental Factor in Melanomagenesis. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 5 (2006), Heft 12, S. 1258–1261.
- [30] Hanahan, D.; Weinberg, R. A.: The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100 (2000), Heft 1, S. 57–70.
- [31] Hanahan, D.; Weinberg, R. A.: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144 (2011), Heft 5, S. 646–674.
- [32] Harris, A. L.: Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nature reviews. Cancer* 2 (2002), Heft 1, S. 38–47.
- [33] Dang, C. V.; Semenza, G. L.: Oncogenic alterations of metabolism. *Trends in biochemical sciences* 24 (1999), Heft 2, S. 68–72.
- [34] Höckel, M.; Vaupel, P.: Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects. *Journal of the National Cancer Institute* 93 (2001), Heft 4, S. 266–276.

- [35] Höckel, M.; Schlenger, K.; Höckel, S. et al.: Hypoxic cervical cancers with low apoptotic index are highly aggressive. *Cancer research* 59 (1999), Heft 18, S. 4525–4528.
- [36] Fidler, I. J.; Ellis, L. M.: The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis. *Cell* 79 (1994), Heft 2, S. 185–188.
- [37] Hanahan, D.; Folkman, J.: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86 (1996), Heft 3, S. 353–364.
- [38] Zetter, B. R.: Angiogenesis and tumor metastasis. *Annual review of medicine* 49 (1998), S. 407–424.
- [39] Finkel, T.: Oxygen radicals and signaling. *Current opinion in cell biology* 10 (1998), Heft 2, S. 248–253.
- [40] Li, N.; Zhang, G.; Yi, F.-X. et al.: Activation of NAD(P)H oxidase by outward movements of H⁺ ions in renal medullary thick ascending limb of Henle. *American journal of physiology. Renal physiology* 289 (2005), Heft 5, S. 56.
- [41] Ma, Q.: Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacology & therapeutics* 125 (2010), Heft 3, S. 376–393.
- [42] Murphy, M. P.: How mitochondria produce reactive oxygen species. *The Biochemical journal* 417 (2009), Heft 1, S. 1–13.
- [43] Warburg, O.: On the Origin of Cancer Cells. *Science* 123 (1956), Heft 3191, S. 309–314.
- [44] Lambeth, J. D.; Cheng, G.; Arnold, R. S. et al.: Novel homologs of gp91phox. *Trends in biochemical sciences* 25 (2000), Heft 10, S. 459–461.
- [45] Semenza, G. L.; Artemov, D.; Bedi, A. et al.: 'The metabolism of tumours': 70 years later. *Novartis Foundation symposium* 240 (2001), 251-60; discussion 260-4.
- [46] Bedogni, B.; Powell, M. B.: Hypoxia, melanocytes and melanoma - survival and tumor development in the permissive microenvironment of the skin. *Pigment cell & melanoma research* 22 (2009), Heft 2, S. 166–174.
- [47] Evans, S. M.; Schrlau, A. E.; Chalian, A. A. et al.: Oxygen levels in normal and previously irradiated human skin as assessed by EF5 binding. *The Journal of investigative dermatology* 126 (2006), Heft 12, S. 2596–2606.
- [48] Finkel, T.: Signal transduction by mitochondrial oxidants. *The Journal of biological chemistry* 287 (2012), Heft 7, S. 4434–4440.
- [49] Cerutti, P. A.: Prooxidant states and tumor promotion. *Science (New York, N.Y.)* 227 (1985), Heft 4685, S. 375–381.
- [50] Peak, J. G.; Peak, M. J.: Comparison of initial yields of DNA-to-protein crosslinks and single-strand breaks induced in cultured human cells by far- and near-ultraviolet light, blue light and X-rays. *Mutation research* 246 (1991), Heft 1, S. 187–191.
- [51] Freeman, B. A.; Crapo, J. D.: Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 47 (1982), Heft 5, S. 412–426.

- [52] Pelicano, H.; Carney, D.; Huang, P.: ROS stress in cancer cells and therapeutic implications. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 7 (2004), Heft 2, S. 97–110.
- [53] Toyokuni, S.: Oxidative Stress and Cancer: The Role of Redox Regulation. *Biotherapy* 11 (1998), 2/3, S. 147–154.
- [54] Ma, Q.: Role of nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual review of pharmacology and toxicology* 53 (2013), S. 401–426.
- [55] Finkel, T.: Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of cell biology* 194 (2011), Heft 1, S. 7–15.
- [56] Thannickal, V. J.; Fanburg, B. L.: Reactive oxygen species in cell signaling. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology* 279 (2000), Heft 6, S. 28.
- [57] Cairns, R. A.; Harris, I. S.; Mak, T. W.: Regulation of cancer cell metabolism. *Nature reviews. Cancer* 11 (2011), Heft 2, S. 85–95.
- [58] Wittgen, H. G. M.; van Kempen, Léon C L T: Reactive oxygen species in melanoma and its therapeutic implications. *Melanoma research* 17 (2007), Heft 6, S. 400–409.
- [59] Guertin, D. A.; Sabatini, D. M.: Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer Cell* 12 (2007), Heft 1, S. 9–22.
- [60] Ma, Q.; He, X.: Molecular basis of electrophilic and oxidative defense: promises and perils of Nrf2. *Pharmacological reviews* 64 (2012), Heft 4, S. 1055–1081.
- [61] Itoh, K.; Chiba, T.; Takahashi, S. et al.: An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 236 (1997), Heft 2, S. 313–322.
- [62] Venugopal, R.; Jaiswal, A. K.: Nrf1 and Nrf2 positively and c-Fos and Fra1 negatively regulate the human antioxidant response element-mediated expression of NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (1996), Heft 25, S. 14960–14965.
- [63] Itoh, K.; Wakabayashi, N.; Katoh, Y. et al.: Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes & development* 13 (1999), Heft 1, S. 76–86.
- [64] McMahon, M.; Itoh, K.; Yamamoto, M. et al.: Keap1-dependent proteasomal degradation of transcription factor Nrf2 contributes to the negative regulation of antioxidant response element-driven gene expression. *The Journal of biological chemistry* 278 (2003), Heft 24, S. 21592–21600.
- [65] Nguyen, T.; Sherratt, P. J.; Huang, H.-C. et al.: Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *The Journal of biological chemistry* 278 (2003), Heft 7, S. 4536–4541.
- [66] Stewart, D.; Killeen, E.; Naquin, R. et al.: Degradation of transcription factor Nrf2 via the ubiquitin-proteasome pathway and stabilization by cadmium. *The Journal of biological chemistry* 278 (2003), Heft 4, S. 2396–2402.

- [67] Nguyen, T.; Sherratt, P. J.; Nioi, P. et al.: Nrf2 controls constitutive and inducible expression of ARE-driven genes through a dynamic pathway involving nucleocytoplasmic shuttling by Keap1. *The Journal of biological chemistry* 280 (2005), Heft 37, S. 32485–32492.
- [68] Kensler, T. W.; Wakabayashi, N.: Nrf2: friend or foe for chemoprevention? *Carcinogenesis* 31 (2010), Heft 1, S. 90–99.
- [69] Taguchi, K.; Motohashi, H.; Yamamoto, M.: Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* 16 (2011), Heft 2, S. 123–140.
- [70] Gregg L. Semenza; Guang L. Wang: A Nuclear Factor Induced by Hypoxia via De Novo Protein Synthesis Binds to the Human Erythropoietin Gene Enhancer at a Site Required for Transcriptional Activation. *Molecular and Cellular Biology* 12 (1992), S. 5447–5454.
- [71] Guang L. Wang; Gregg L. Semenza: General involvement of hypoxia-inducible factor 1 in transcriptional response to hypoxia. *Genetics* 90 (1993), S. 4304–4308.
- [72] Wang, G. L.; Semenza, G. L.: Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia. *The Journal of biological chemistry* 268 (1993), Heft 29, S. 21513–21518.
- [73] Wang, G. L.; Jiang, B. H.; Rue, E. A. et al.: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92 (1995), Heft 12, S. 5510–5514.
- [74] Huang, L. E.; Arany, Z.; Livingston, D. M. et al.: Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *The Journal of biological chemistry* 271 (1996), Heft 50, S. 32253–32259.
- [75] Kaelin, W. G.: Proline hydroxylation and gene expression. *Annual review of biochemistry* 74 (2005), S. 115–128.
- [76] Schofield, C. J.; Ratcliffe, P. J.: Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (2004), Heft 5, S. 343–354.
- [77] Semenza, G. L.: Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda, Md.)* 24 (2009), S. 97–106.
- [78] Semenza, G. L.: Defining the role of hypoxia-inducible factor 1 in cancer biology and therapeutics. *Oncogene* 29 (2010), Heft 5, S. 625–634.
- [79] Semenza, G. L.: HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Current opinion in genetics & development* 20 (2010), Heft 1, S. 51–56.
- [80] Ema, M.; Taya, S.; Yokotani, N. et al.: A novel bHLH-PAS factor with close sequence similarity to hypoxia-inducible factor 1 α regulates the VEGF expression and is potentially involved in lung and vascular development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (1997), Heft 9, S. 4273–4278.
- [81] Flamme, I.; Fröhlich, T.; Reuter, M. von et al.: HRF, a putative basic helix-loop-helix-PAS-domain transcription factor is closely related to hypoxia-inducible factor-1 α and developmentally expressed in blood vessels. *Mechanisms of development* 63 (1997), Heft 1, S. 51–60.

- [82] Loboda, A.; Jozkowicz, A.; Dulak, J.: HIF-1 and HIF-2 transcription factors--similar but not identical. *Molecules and cells* 29 (2010), Heft 5, S. 435–442.
- [83] Tian, H.; McKnight, S. L.; Russell, D. W.: Endothelial PAS domain protein 1 (EPAS1), a transcription factor selectively expressed in endothelial cells. *Genes & development* 11 (1997), Heft 1, S. 72–82.
- [84] Wiesener, M. S.; Jürgensen, J. S.; Rosenberger, C. et al.: Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17 (2003), Heft 2, S. 271–273.
- [85] Flamme, I.; Krieg, M.; Plate, K. H.: Up-regulation of vascular endothelial growth factor in stromal cells of hemangioblastomas is correlated with up-regulation of the transcription factor HRF/HIF-2alpha. *The American journal of pathology* 153 (1998), Heft 1, S. 25–29.
- [86] Wenger, R. H.; Gassmann, M.: Oxygen(es) and the hypoxia-inducible factor-1. *Biological chemistry* 378 (1997), Heft 7, S. 609–616.
- [87] Ferrara, N.; Davis-Smyth, T.: The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine reviews* 18 (1997), Heft 1, S. 4–25.
- [88] Forsythe, J. A.; Jiang, B. H.; Iyer, N. V. et al.: Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Molecular and Cellular Biology* 16 (1996), Heft 9, S. 4604–4613.
- [89] Leung, D. W.; Cachianes, G.; Kuang, W. J. et al.: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science (New York, N.Y.)* 246 (1989), Heft 4935, S. 1306–1309.
- [90] Toker, A.; Newton, A. C.: Cellular Signaling. *Cell* 103 (2000), Heft 2, S. 185–188.
- [91] Alessi, D. R.; James, S. R.; Downes, C. P. et al.: Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Current biology : CB* 7 (1997), Heft 4, S. 261–269.
- [92] Stokoe, D.; Stephens, L. R.; Copeland, T. et al.: Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase B. *Science (New York, N.Y.)* 277 (1997), Heft 5325, S. 567–570.
- [93] Plas, D. R.; Thompson, C. B.: Akt-dependent transformation: there is more to growth than just surviving. *Oncogene* 24 (2005), Heft 50, S. 7435–7442.
- [94] Vivanco, I.; Sawyers, C. L.: The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nature reviews. Cancer* 2 (2002), Heft 7, S. 489–501.
- [95] Wong, K.-K.; Engelman, J. A.; Cantley, L. C.: Targeting the PI3K signaling pathway in cancer. *Current opinion in genetics & development* 20 (2010), Heft 1, S. 87–90.
- [96] Laughner, E.; Taghavi, P.; Chiles, K. et al.: HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Molecular and Cellular Biology* 21 (2001), Heft 12, S. 3995–4004.

- [97] Elstrom, R. L.; Bauer, D. E.; Buzzai, M. et al.: Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. *Cancer research* 64 (2004), Heft 11, S. 3892–3899.
- [98] Govindarajan, B.; Sligh, J. E.; Vincent, B. J. et al.: Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. *The Journal of clinical investigation* 117 (2007), Heft 3, S. 719–729.
- [99] Robey, R. B.; Hay, N.: Is Akt the "Warburg kinase"?-Akt-energy metabolism interactions and oncogenesis. *Seminars in cancer biology* 19 (2009), Heft 1, S. 25–31.
- [100] Guertin, D. A.; Sabatini, D. M.: An expanding role for mTOR in cancer. *Trends in molecular medicine* 11 (2005), Heft 8, S. 353–361.
- [101] Sarbassov, D. D.; Ali, S. M.; Sabatini, D. M.: Growing roles for the mTOR pathway. *Current opinion in cell biology* 17 (2005), Heft 6, S. 596–603.
- [102] Huang, B.; Porter, G.: Expression of proline-rich Akt-substrate PRAS40 in cell survival pathway and carcinogenesis. *Acta pharmacologica Sinica* 26 (2005), Heft 10, S. 1253–1258.
- [103] Kovacina, K. S.; Park, G. Y.; Bae, S. S. et al.: Identification of a proline-rich Akt substrate as a 14-3-3 binding partner. *The Journal of biological chemistry* 278 (2003), Heft 12, S. 10189–10194.
- [104] Sancak, Y.; Thoreen, C. C.; Peterson, T. R. et al.: PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Molecular cell* 25 (2007), Heft 6, S. 903–915.
- [105] Vander Haar, E.; Lee, S.-I.; Bandhakavi, S. et al.: Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nature cell biology* 9 (2007), Heft 3, S. 316–323.
- [106] Crino, P. B.; Nathanson, K. L.; Henske, E. P.: The tuberous sclerosis complex. *The New England journal of medicine* 355 (2006), Heft 13, S. 1345–1356.
- [107] Wullschleger, S.; Loewith, R.; Hall, M. N.: TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* 124 (2006), Heft 3, S. 471–484.
- [108] Feng, Z.; Zhang, H.; Levine, A. J. et al.: The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (2005), Heft 23, S. 8204–8209.
- [109] Brugarolas, J.; Lei, K.; Hurley, R. L. et al.: Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes & development* 18 (2004), Heft 23, S. 2893–2904.
- [110] Dames, S. A.; Mulet, J. M.; Rathgeb-Szabo, K. et al.: The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability. *The Journal of biological chemistry* 280 (2005), Heft 21, S. 20558–20564.
- [111] Reiling, J. H.; Hafen, E.: The hypoxia-induced paralogs Scylla and Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in *Drosophila*. *Genes & development* 18 (2004), Heft 23, S. 2879–2892.
- [112] Evans, N. T.; Naylor, P. F.: The systemic oxygen supply to the surface of human skin. *Respiration physiology* 3 (1967), Heft 1, S. 21–37.

- [113] Nys, K.; Maes, H.; Dudek, A. M. et al.: Uncovering the role of hypoxia inducible factor-1 α in skin carcinogenesis. *Biochimica et biophysica acta* 1816 (2011), Heft 1, S. 1–12.
- [114] O'Hara, J. A.; Goda, F.; Dunn, J. F. et al.: Potential for EPR oximetry to guide treatment planning for tumors. *Advances in experimental medicine and biology* 411 (1997), S. 233–242.
- [115] Bedogni, B.; Welford, S. M.; Cassarino, D. S. et al.: The hypoxic microenvironment of the skin contributes to Akt-mediated melanocyte transformation. *Cancer Cell* 8 (2005), Heft 6, S. 443–454.
- [116] Horikoshi, T.; Balin, A. K.; Carter, D. M.: Effects of oxygen tension on the growth and pigmentation of normal human melanocytes. *The Journal of investigative dermatology* 96 (1991), Heft 6, S. 841–844.
- [117] Kumar, S. M.; Yu, H.; Edwards, R. et al.: Mutant V600E BRAF increases hypoxia inducible factor-1 α expression in melanoma. *Cancer research* 67 (2007), Heft 7, S. 3177–3184.
- [118] Watson, I. R.; Li, L.; Cabeceiras, P. K. et al.: The RAC1 P29S hotspot mutation in melanoma confers resistance to pharmacological inhibition of RAF. *Cancer research* 74 (2014), Heft 17, S. 4845–4852.
- [119] Vojtek, A. B.; Der, C. J.: Increasing complexity of the Ras signaling pathway. *The Journal of biological chemistry* 273 (1998), Heft 32, S. 19925–19928.
- [120] Berra, E.; Milanini, J.; Richard, D. E. et al.: Signaling angiogenesis via p42/p44 MAP kinase and hypoxia. *Biochemical pharmacology* 60 (2000), Heft 8, S. 1171–1178.
- [121] Semenza, G.: Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. *Biochemical pharmacology* 64 (2002), 5-6, S. 993–998.
- [122] Trisciuglio, D.; Iervolino, A.; Zupi, G. et al.: Involvement of PI3K and MAPK signaling in bcl-2-induced vascular endothelial growth factor expression in melanoma cells. *Molecular biology of the cell* 16 (2005), Heft 9, S. 4153–4162.
- [123] Adams, A. E.; Chudnovsky, Y.; Khavari, P. A.: Oxygen deprivation provokes melanoma. *Nature medicine* 12 (2006), Heft 2, S. 168–169.
- [124] Dhawan, P.; Singh, A. B.; Ellis, D. L. et al.: Constitutive activation of Akt/protein kinase B in melanoma leads to up-regulation of nuclear factor-kappaB and tumor progression. *Cancer research* 62 (2002), Heft 24, S. 7335–7342.
- [125] Amiri, K. I.; Richmond, A.: Role of nuclear factor-kappa B in melanoma. *Cancer metastasis reviews* 24 (2005), Heft 2, S. 301–313.
- [126] Poser, I.; Bosserhoff, A.-K.: Transcription factors involved in development and progression of malignant melanoma. *Histology and histopathology* 19 (2004), Heft 1, S. 173–188.
- [127] Bhoumik, A.; Huang, T.-G.; Ivanov, V. et al.: An ATF2-derived peptide sensitizes melanomas to apoptosis and inhibits their growth and metastasis. *The Journal of clinical investigation* 110 (2002), Heft 5, S. 643–650.

- [128] Bonnet, D.; Dick, J. E.: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature medicine* 3 (1997), Heft 7, S. 730–737.
- [129] Clarke, M. F.; Dick, J. E.; Dirks, P. B. et al.: Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer research* 66 (2006), Heft 19, S. 9339–9344.
- [130] Lapidot, T.; Sirard, C.; Vormoor, J. et al.: A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 367 (1994), Heft 6464, S. 645–648.
- [131] Reya, T.; Morrison, S. J.; Clarke, M. F. et al.: Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 414 (2001), Heft 6859, S. 105–111.
- [132] Al-Hajj, M.; Wicha, M. S.; Benito-Hernandez, A. et al.: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (2003), Heft 7, S. 3983–3988.
- [133] Dalerba, P.; Clarke, M. F.: Cancer stem cells and tumor metastasis: first steps into uncharted territory. *Cell stem cell* 1 (2007), Heft 3, S. 241–242.
- [134] Ricci-Vitiani, L.; Lombardi, D. G.; Pilozzi, E. et al.: Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 445 (2007), Heft 7123, S. 111–115.
- [135] Singh, S. K.; Hawkins, C.; Clarke, I. D. et al.: Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432 (2004), Heft 7015, S. 396–401.
- [136] Roesch, A.; Fukunaga-Kalabis, M.; Schmidt, E. C. et al.: A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* 141 (2010), Heft 4, S. 583–594.
- [137] Visvader, J. E.; Lindeman, G. J.: Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nature reviews. Cancer* 8 (2008), Heft 10, S. 755–768.
- [138] Dou, J.; Pan, M.; Wen, P. et al.: Isolation and identification of cancer stem-like cells from murine melanoma cell lines. *Cellular & Molecular Immunology* 4 (2007), Heft 6, S. 467–472.
- [139] Fang, D.; Nguyen, T. K.; Leishear, K. et al.: A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer research* 65 (2005), Heft 20, S. 9328–9337.
- [140] Grichnik, J. M.; Burch, J. A.; Schulteis, R. D. et al.: Melanoma, a tumor based on a mutant stem cell? *The Journal of investigative dermatology* 126 (2006), Heft 1, S. 142–153.
- [141] Klein, W. M.; Wu, B. P.; Zhao, S. et al.: Increased expression of stem cell markers in malignant melanoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 20 (2007), Heft 1, S. 102–107.
- [142] Monzani, E.; Facchetti, F.; Galmozzi, E. et al.: Melanoma contains CD133 and ABCG2 positive cells with enhanced tumourigenic potential. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 43 (2007), Heft 5, S. 935–946.

- [143] Schatton, T.; Murphy, G. F.; Frank, N. Y. et al.: Identification of cells initiating human melanomas. *Nature* 451 (2008), Heft 7176, S. 345–349.
- [144] Christensen, J.; Agger, K.; Cloos, P. A. C. et al.: RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri- and dimethylated lysine 4 on histone 3. *Cell* 128 (2007), Heft 6, S. 1063–1076.
- [145] Fukunaga-Kalabis, M.; Roesch, A.; Herlyn, M.: From cancer stem cells to tumor maintenance in melanoma. *The Journal of investigative dermatology* 131 (2011), Heft 8, S. 1600–1604.
- [146] Roesch, A.; Becker, B.; Meyer, S. et al.: Retinoblastoma-binding protein 2-homolog 1: a retinoblastoma-binding protein downregulated in malignant melanomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 18 (2005), Heft 9, S. 1249–1257.
- [147] Vogt, T.; Kroiss, M.; McClelland, M. et al.: Deficiency of a novel retinoblastoma binding protein 2-homolog is a consistent feature of sporadic human melanoma skin cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 79 (1999), Heft 12, S. 1615–1627.
- [148] Yamane, K.; Tateishi, K.; Klose, R. J. et al.: PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation. *Molecular cell* 25 (2007), Heft 6, S. 801–812.
- [149] Roesch, A.; Vultur, A.; Bogeski, I. et al.: Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells. *Cancer Cell* 23 (2013), Heft 6, S. 811–825.
- [150] Blagosklonny, M. V.: Why therapeutic response may not prolong the life of a cancer patient: selection for oncogenic resistance. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 4 (2005), Heft 12, S. 1693–1698.
- [151] Luo, Y.; Dallaglio, K.; Chen, Y. et al.: ALDH1A isozymes are markers of human melanoma stem cells and potential therapeutic targets. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 30 (2012), Heft 10, S. 2100–2113.
- [152] Yue, L.; Huang, Z.-M.; Fong, S. et al.: Targeting ALDH1 to decrease tumorigenicity, growth and metastasis of human melanoma. *Melanoma research* 25 (2015), Heft 2, S. 138–148.
- [153] Boiko, A. D.; Razorenova, O. V.; van de Rijn, M. et al.: Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature* 466 (2010), Heft 7302, S. 133–137.
- [154] Stemple, D. L.; Anderson, D. J.: Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. *Cell* 71 (1992), Heft 6, S. 973–985.
- [155] Thermo Fisher Scientific: Human Epidermal Melanocytes, adult, lightly pigmented donor, (HEMa-LP). <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/C0245C> (Abruf: 25.02.2017).
- [156] cell lines service: A-375. http://www.clsghmbh.de/p852_A-375.html (Abruf: 02.07.2016).

- [157] Giard, D. J.; Aaronson, S. A.; Todaro, G. J. et al.: In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *Journal of the National Cancer Institute* 51 (1973), Heft 5, S. 1417–1423.
- [158] ATCC: Melanoma Cancer Cell Panel. ATCC® No. TCP-1013™. <https://www.lgcstandards-atcc.org/~media/B490DDC0F19642F8B15A067268E46E10.ashx> (Abruf: 04.08.2017).
- [159] Aubert, C.; Rouge, F.; Galindo, J. R.: Tumorigenicity of human malignant melanocytes in nude mice in relation to their differentiation in vitro. *Journal of the National Cancer Institute* 64 (1980), Heft 5, S. 1029–1040.
- [160] CLS Cell Lines Service GmbH: IGR-1. Artikelnummer: 300219. http://www.clsmbh.de/p483_IGR-1.html (Abruf: 04.08.2017).
- [161] Ranzani, M.; Alifrangis, C.; Perna, D. et al.: BRAF/NRAS wild-type melanoma, NF1 status and sensitivity to trametinib. *Pigment cell & melanoma research* 28 (2015), Heft 1, S. 117–119.
- [162] Byers, H. R.; Etoh, T.; Doherty, J. R. et al.: Cell migration and actin organization in cultured human primary, recurrent cutaneous and metastatic melanoma. Time-lapse and image analysis. *The American journal of pathology* 139 (1991), Heft 2, S. 423–435.
- [163] ATCC: MeWo. https://www.lgcstandards-atcc.org/Products/All/HTB-65.aspx?geo_country=de#characteristics (Abruf: 24.02.2017).
- [164] Carey, T. E.; Takahashi, T.; Resnick, L. A. et al.: Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (1976), Heft 9, S. 3278–3282.
- [165] Haq, R.; Shoag, J.; Andreu-Perez, P. et al.: Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell* 23 (2013), Heft 3, S. 302–315.
- [166] Geserick, P.; Drewniok, C.; Hupe, M. et al.: Suppression of cFLIP is sufficient to sensitize human melanoma cells to TRAIL- and CD95L-mediated apoptosis. *Oncogene* 27 (2008), Heft 22, S. 3211–3220.
- [167] Memorial Sloan Kettering Cancer Center: SK-MEL-28: Human Melanoma Cell Line (ATCC HTB-72). <https://www.mskcc.org/research-advantage/support/technology/tangible-material/human-melanoma-cell-line-sk-mel-28> (Abruf: 25.02.2017).
- [168] Promega: CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS). https://www.promega.de/products/cell-health-and-metabolism/cell-viability-assays/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-_mts_/ (Abruf: 26.02.2017).
- [169] Tocris Bioscience: NSC 23766. Certificate of Analysis. https://www.tocris.com/literature/2161_6_coa.pdf?1488382994 (Abruf: 01.03.2017).
- [170] Merck Millipore: HIF-1 Inhibitor CAS 934593-90-5-Calbiochem. http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/HIF-1-Inhibitor---CAS-934593-90-5---Calbiochem,EMD_BIO-400083#anchor_REF (Abruf: 01.03.2017).

- [171] Moreno-Manzano, V.; Rodriguez-Jimenez, F. J.; Acena-Bonilla, J. L. et al.: FM19G11, a new hypoxia-inducible factor (HIF) modulator, affects stem cell differentiation status. *The Journal of biological chemistry* 285 (2010), Heft 2, S. 1333–1342.
- [172] Merck Millipore: HIF-1a Translation Inhibitor, KC7F2-CAS927822-86-4-Calbiochem. http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/HIF-1%CE%B1-Translation-Inhibitor%2C-KC7F2---CAS-927822-86-4---Calbiochem,EMD_BIO-400088?CategoryName=00000026000283e300020023&CategoryDomainName=Merck-MerckMillipore (Abruf: 01.03.2017).
- [173] Merck Millipore: HIF-2a Translation Inhibitor-CAS882268-69-Calbiochem. http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/HIF-2%CE%B1-Translation-Inhibitor---CAS-882268-69-1---Calbiochem,EMD_BIO-400087?CategoryName=00000026000283e300020023&CategoryDomainName=Merck-MerckMillipore (Abruf: 01.03.2017).
- [174] Satheeshkumar, N.; Mukherjee, P. K.; Bhadra, S. et al.: Acetylcholinesterase enzyme inhibitory potential of standardized extract of *Trigonella foenum graecum* L and its constituents. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 17 (2010), 3-4, S. 292–295.
- [175] Zhou, J.; Chan, L.; Zhou, S.: Trigonelline: a plant alkaloid with therapeutic potential for diabetes and central nervous system disease. *Current medicinal chemistry* 19 (2012), Heft 21, S. 3523–3531.
- [176] Wiart, C.: *Medicinal plants of China, Korea, and Japan*, p. 215. *Bioresources for tomorrow's drugs and cosmetics*, p. 215. CRC Press, Boca Raton, FL, 2012.
- [177] Cayman Chemical: DMOG Product Information. <https://www.caymanchem.com/pdfs/71210.pdf> (Abruf: 01.03.2017).
- [178] Cayman Chemical: CAY10585. tem № 10012682 Item No 10012682, CAS No 934593-90-5, Purity ≥97%. <https://www.caymanchem.com/product/10012682> (Abruf: 28.01.2018).
- [179] Selleckchem.com Inhibitor Expert: Rapamycin (Sirolimus). <http://www.selleckchem.com/products/Rapamycin.html> (Abruf: 04.08.2017).
- [180] Selleckchem.com Inhibitor Expert: Apocynin. Cat. No S2425. <http://www.selleckchem.com/products/apocynin-acetovanillone.html> (Abruf: 04.08.2017).
- [181] Massart, C.; Giusti, N.; Beauwens, R. et al.: Diphenyleneiodonium, an inhibitor of NOXes and DUOXes, is also an iodide-specific transporter. *FEBS open bio* 4 (2013), S. 55–59.
- [182] Sigma-Aldrich: Dihydroethidium; BioReagent, suitable for fluorescence, ≥95% (HPCE). http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/37291?lang=de®ion=DE#cited_Na N (Abruf: 02.03.016).
- [183] Thermo Fisher Scientific: Dihydroethidium (Hydroethidine). <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/D1168> (Abruf: 02.03.2016).
- [184] abcam: Anti-HIF-2-alpha antibody - ChIP Grade (ab199). <http://www.abcam.com/hif-2-alpha-antibody-chip-grade-ab199.html>.

- [185] Lau, A.; Tian, W.; Whitman, S. A. et al.: The Predicted Molecular Weight of Nrf2. It Is What It Is Not. *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (2013), Heft 1, S. 91–93.
- [186] Wang, G. L.; Semenza, G. L.: Purification and Characterization of Hypoxia-inducible Factor 1. *Journal of Biological Chemistry* 270 (1995), Heft 3, S. 1230–1237.
- [187] Borsi, E.; Perrone, G.; Terragna, C. et al.: Hypoxia inducible factor-1 alpha as a therapeutic target in multiple myeloma. *Oncotarget* 5 (2014), Heft 7, S. 1779–1792.
- [188] Du, J.; Sun, B.; Zhao, X. et al.: Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation by inducing epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology* 133 (2014), Heft 3, S. 575–583.
- [189] McDonough, M. A.; Li, V.; Flashman, E. et al.: Cellular oxygen sensing: Crystal structure of hypoxia-inducible factor prolyl hydroxylase (PHD2). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (2006), Heft 26, S. 9814–9819.
- [190] Han, D.-L.; Liu, K.-Q.; Guo, S.-S. et al.: [Dose-effect relationship of DMSO and Tween 80 influencing the growth and viability of murine bone marrow-derived cells in vitro]. *Zhongguo shi yan xue ye xue za zhi / Zhongguo bing li sheng li xue hui = Journal of experimental hematology / Chinese Association of Pathophysiology* 16 (2008), Heft 2, S. 377–380.
- [191] Jiang, Z.; Zhang, H.; Wang, Y. et al.: Altered Hepa1-6 cells by dimethyl sulfoxide (DMSO)-treatment induce anti-tumor immunity in vivo. *Oncotarget* (2016).
- [192] Oz, E. S.; Aydemir, E.; Fişkın, K.: DMSO exhibits similar cytotoxicity effects to thalidomide in mouse breast cancer cells. *Oncology letters* 3 (2012), Heft 4, S. 927–929.
- [193] Wenger, A. S.; Hall, M.; Mickey, G. H. et al.: Dimethylsulfoxide-induced changes in a rat prostate adenocarcinoma. *The Prostate* 6 (1985), Heft 4, S. 329–341.
- [194] Breig, O.; Théoleyre-Schaal, O.; Baklouti, F.: Combined inhibition of PI3K and activation of MAPK p38 signaling pathways trigger erythroid alternative splicing switch of 4.1R pre-mRNA in DMSO-induced erythroleukemia cells. *Cellular signalling* 25 (2013), Heft 12, S. 2453–2461.
- [195] Zimmer, M.; Ebert, B. L.; Neil, C. et al.: Small-molecule inhibitors of HIF-2a translation link its 5'UTR iron-responsive element to oxygen sensing. *Molecular cell* 32 (2008), Heft 6, S. 838–848.
- [196] Lee, K.; Lee, J. H.; Boovanahalli, S. K. et al.: (Aryloxyacetylamino)benzoic acid analogues: A new class of hypoxia-inducible factor-1 inhibitors. *Journal of medicinal chemistry* 50 (2007), Heft 7, S. 1675–1684.
- [197] Lee, K.; Kang, J. E.; Park, S.-K. et al.: LW6, a novel HIF-1 inhibitor, promotes proteasomal degradation of HIF-1alpha via upregulation of VHL in a colon cancer cell line. *Biochemical pharmacology* 80 (2010), Heft 7, S. 982–989.
- [198] Lee, K.; Ban, H. S.; Naik, R. et al.: Identification of malate dehydrogenase 2 as a target protein of the HIF-1 inhibitor LW6 using chemical probes. *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 52 (2013), Heft 39, S. 10286–10289.

- [199] Merck Millipore, [http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/HIF-1%CE%B12%CE%B1-Inhibitor-IV%2C-FM19G11---CAS-329932-55-0---Calbiochem,EMD_BIO-400089?CategoryName=00000026000283e300020023&CategoryDomainName=Merck-MerckMillipore:400089|HIF-1 \$\alpha\$ /2 \$\alpha\$ Inhibitor IV, FM19G11 - CAS 329932-55-0 - Calbiochem](http://www.merckmillipore.com/DE/de/product/HIF-1%CE%B12%CE%B1-Inhibitor-IV%2C-FM19G11---CAS-329932-55-0---Calbiochem,EMD_BIO-400089?CategoryName=00000026000283e300020023&CategoryDomainName=Merck-MerckMillipore:400089|HIF-1%CE%B12%CE%B1-Inhibitor-IV,FM19G11-CAS-329932-55-0-Calbiochem) (Abruf: 26.02.2016).
- [200] Narita, T.; Yin, S.; Gelin, C. F. et al.: Identification of a novel small molecule HIF-1 α translation inhibitor. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 15 (2009), Heft 19, S. 6128–6136.
- [201] Bruick, R. K.; McKnight, S. L.: A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science (New York, N.Y.)* 294 (2001), Heft 5545, S. 1337–1340.
- [202] Ivan, M.; Kondo, K.; Yang, H. et al.: HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science (New York, N.Y.)* 292 (2001), Heft 5516, S. 464–468.
- [203] Donate, F.; Juarez, J. C.; Burnett, M. E. et al.: Identification of biomarkers for the antiangiogenic and antitumour activity of the superoxide dismutase 1 (SOD1) inhibitor tetrathiomolybdate (ATN-224). *British journal of cancer* 98 (2008), Heft 4, S. 776–783.
- [204] Juarez, J. C.; Betancourt, O., JR; Pirie-Shepherd, S. R. et al.: Copper binding by tetrathiomolybdate attenuates angiogenesis and tumor cell proliferation through the inhibition of superoxide dismutase 1. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12 (2006), Heft 16, S. 4974–4982.
- [205] Brewer, G. J.: Copper lowering therapy with tetrathiomolybdate as an antiangiogenic strategy in cancer. *Current cancer drug targets* 5 (2005), Heft 3, S. 195–202.
- [206] Wei, H.; Zhang, W.-J.; Leboeuf, R. et al.: Copper induces--and copper chelation by tetrathiomolybdate inhibits--endothelial activation in vitro. *Redox report : communications in free radical research* 19 (2014), Heft 1, S. 40–48.
- [207] Stefanska, J.; Sokolowska, M.; Sarniak, A. et al.: Apocynin decreases hydrogen peroxide and nitrate concentrations in exhaled breath in healthy subjects. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 23 (2010), Heft 1, S. 48–54.
- [208] Pratheeshkumar, P.; Son, Y.-O.; Divya, S. P. et al.: Luteolin inhibits Cr(VI)-induced malignant cell transformation of human lung epithelial cells by targeting ROS mediated multiple cell signaling pathways. *Toxicology and applied pharmacology* 281 (2014), Heft 2, S. 230–241.
- [209] Paredes-Gonzalez, X.; Fuentes, F.; Jeffery, S. et al.: Induction of NRF2-mediated gene expression by dietary phytochemical flavones apigenin and luteolin. *Biopharmaceutics & drug disposition* 36 (2015), Heft 7, S. 440–451.
- [210] Arlt, A.; Sebens, S.; Krebs, S. et al.: Inhibition of the Nrf2 transcription factor by the alkaloid trigonelline renders pancreatic cancer cells more susceptible to apoptosis through decreased proteasomal gene expression and proteasome activity. *Oncogene* 32 (2013), Heft 40, S. 4825–4835.
- [211] Yoshinari, O.; Takenake, A.; Igarashi, K.: Trigonelline ameliorates oxidative stress in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rats. *Journal of medicinal food* 16 (2013), Heft 1, S. 34–41.

- [212] Kim, M.; Park, S. Y.; Jin, M. L. et al.: Cucurbitacin B inhibits immunomodulatory function and the inflammatory response in macrophages. *Immunopharmacology and immunotoxicology* 37 (2015), Heft 5, S. 473–480.
- [213] Dat, N. T.; Jin, X.; Hong, Y.-S. et al.: An isoaurone and other constituents from *Trichosanthes kirilowii* seeds inhibit hypoxia-inducible factor-1 and nuclear factor-kappaB. *Journal of natural products* 73 (2010), Heft 6, S. 1167–1169.
- [214] Kausar, H.; Munagala, R.; Bansal, S. S. et al.: Cucurbitacin B potently suppresses non-small-cell lung cancer growth: identification of intracellular thiols as critical targets. *Cancer letters* 332 (2013), Heft 1, S. 35–45.
- [215] Zhang, M.; Sun, C.; Shan, X. et al.: Inhibition of pancreatic cancer cell growth by cucurbitacin B through modulation of signal transducer and activator of transcription 3 signaling. *Pancreas* 39 (2010), Heft 6, S. 923–929.
- [216] Gao, Y.; Dickerson, J. B.; Guo, F. et al.: Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2004), Heft 20, S. 7618–7623.
- [217] Dumont, F. J.; Su, Q.: Mechanism of action of the immunosuppressant rapamycin. *Life sciences* 58 (1996), Heft 5, S. 373–395.
- [218] Sabers, C. J.; Martin, M. M.; Brunn, G. J. et al.: Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 270 (1995), Heft 2, S. 815–822.
- [219] Wiederrecht, G. J.; Sabers, C. J.; Brunn, G. J. et al.: Mechanism of action of rapamycin: new insights into the regulation of G1-phase progression in eukaryotic cells. *Progress in cell cycle research* 1 (1995), S. 53–71.
- [220] Lee, J.-W.; Ryu, Y.-K.; Ji, Y.-H. et al.: Hypoxia/reoxygenation-experienced cancer cell migration and metastasis are regulated by Rap1- and Rac1-GTPase activation via the expression of thymosin beta-4. *Oncotarget* 6 (2015), Heft 12, S. 9820–9833.
- [221] Cipolleschi, M. G.; Marzi, I.; Rovida, E. et al.: Chronic Myeloid Leukemia and Hepatoblastoma: Two Cancer Models to Link Metabolism to Stem Cells. *Frontiers in oncology* 6 (2016), S. 95.
- [222] Lau, E. Y.-T.; Ho, N. P.-Y.; Lee, T. K.-W.: Cancer Stem Cells and Their Microenvironment: Biology and Therapeutic Implications. *Stem cells international* 2017 (2017), S. 3714190.
- [223] Sotgia, F.; Martinez-Outschoorn, U. E.; Lisanti, M. P.: Mitochondrial oxidative stress drives tumor progression and metastasis: should we use antioxidants as a key component of cancer treatment and prevention? *BMC medicine* 9 (2011), S. 62.
- [224] Comito, G.; Calvani, M.; Giannoni, E. et al.: HIF-1 α stabilization by mitochondrial ROS promotes Met-dependent invasive growth and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *Free radical biology & medicine* 51 (2011), Heft 4, S. 893–904.
- [225] Chandel N.S.; Maltepe E.; Goldwasser E. et al.: Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Cell Biology* 95 (1998), S. 11715–11720.

- [226] Fritsch, P.: Dermatologie und Venerologie für das Studium. Mit 113 Tabellen. Springer, Berlin, 2009.
- [227] Trachootham, D.; Lu, W.; Ogasawara, M. A. et al.: Redox regulation of cell survival. *Antioxidants & Redox Signaling* 10 (2008), Heft 8, S. 1343–1374.
- [228] Gorrini, C.; Harris, I. S.; Mak, T. W.: Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nature reviews. Drug discovery* 12 (2013), Heft 12, S. 931–947.
- [229] Yasuda, S.; Yogosawa, S.; Izutani, Y. et al.: Cucurbitacin B induces G2 arrest and apoptosis via a reactive oxygen species-dependent mechanism in human colon adenocarcinoma SW480 cells. *Molecular nutrition & food research* 54 (2010), Heft 4, S. 559–565.
- [230] Hung, C.-M.; Garcia-Haro, L.; Sparks, C. A. et al.: mTOR-dependent cell survival mechanisms. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4 (2012), Heft 12, S. a008771–a008771.
- [231] Saci, A.; Cantley, L. C.; Carpenter, C. L.: Rac1 regulates the activity of mTORC1 and mTORC2 and controls cellular size. *Molecular cell* 42 (2011), Heft 1, S. 50–61.
- [232] Cichorek, M.; Wachulska, M.; Stasiewicz, A. et al.: Skin melanocytes: biology and development. *Postepy dermatologii i alergologii* 30 (2013), Heft 1, S. 30–41.
- [233] Schatton, T.; Frank, M. H.: Cancer stem cells and human malignant melanoma. *Pigment cell & melanoma research* 21 (2008), Heft 1, S. 39–55.
- [234] Chen, Z.; Zhang, T.; Wu, B. et al.: Insights into the therapeutic potential of hypoxia-inducible factor-1alpha small interfering RNA in malignant melanoma delivered via folate-decorated cationic liposomes. *International journal of nanomedicine* 11 (2016), S. 991–1002.

7. Danksagungen

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. Sven Quist für die Bereitstellung des Themas und die freundliche Betreuung.

Für die Unterstützung bei der Arbeit im Labor gilt mein besonderer Dank Frau Ines Dörig und Herrn Dr. Bernhard Pätzold sowie den Mitarbeiterinnen des histologischen Labors der Universitätshautklinik Magdeburg.

Bedanken möchte mich auch bei Herrn Prof. Dr. Thomas Wex für die Durchsicht der Arbeit und die wertvollen Hinweise.

Insbesondere möchte ich Herrn Timon Kirschke herzlich danken, der mich bei der statistischen Auswertung dieser Arbeit unterstützte.

Besonders danken möchte ich an dieser Stelle auch meinen Eltern und Geschwistern, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Mein besonderer Dank gilt dabei meinem Vater und meiner Schwester für die konstruktive Kritik, geduldige Beratung und aufmunternden Worte.

8. Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Einfluss von Hypoxie und Hypoxie-relevanter Signalwege auf die Entstehung und Progression des malignen Melanoms“

in der Universitätshautklinik Magdeburg

mit Unterstützung durch Prof. Dr. Dr. Sven Quist

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Aachen, den 15.07.2018

Sara Geyer

9. Erklärung zur strafrechtlichen Verurteilung

Ich erkläre hiermit, nicht wegen einer Straftat verurteilt worden zu sein, die Wissenschaftsbezug hat.

Aachen, den 15.07.2018

Sara Geyer

10. Darstellung des Bildungsweges

Name	Sara Geyer
Geburtsdatum	02.04.1989
Geburtsort:	Ostercappeln
Nationalität	Deutsch

Bildungsweg

1995-1999	Grundschule St. Engelbert, 59929 Brilon
1999-2008	Gymnasium Petrinum Brilon Erwerb der allgemeinen Hochschulreife
2008-2009	Ausbildung zur Gesundheits- und Krankenpflegerin, Krankenpflegeschule Brilon Abbruch zugunsten Studienplatzes
2009-2011	Studium der Humanmedizin an der Semmelweis Universität Budapest, Ungarn
2011	Studium der Humanmedizin an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Juni 2011	1. Staatsexamen
2011-2015	Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Oktober 2014	2. Staatsexamen Humanmedizin, schriftlicher Teil
26.11.2015	Mündliches Staatsexamen Humanmedizin
09.12.2015	Erteilung der Approbation als Ärztin

Beruflicher Werdegang

Seit Mai 2016 Ärztin in Weiterbildung
Klinik für Dermatologie und Allergologie
Uniklinik RWTH Aachen

Aachen, den 15.07.2018

Sara Geyer

11. Anlagen

11.1. Statistische Daten und Tabellen

11.1.1. Statistische Daten und Tabellen zu Abschnitt 3.3.

Tabelle 5: Experimentelle Hypoxie. Statistische Daten zu Abbildung 7- 9. Mittels Kruskal-Wallis Test wurde auf Gruppenunterschiede getestet, bei Signifikanz folgte ein Post-hoc Test (Dunn's-Test).

		p-Wert (Dunn's Test)		
Zell- linie	p-Wert (Kruskal- Wallis Test)	24 h Hypoxie vs. Referenz	72 h Hypoxie vs. Referenz	24 h Hypoxie vs. 72 h Hypoxie
A375	0,0000000000475 60	0,6589282515449 95	0,0000000019290 63	0,0000000191473 76
Preyer	0,0308800000000 00	0,0296940700000 00	0,4157524000000 00	0,1549396500000 00
MC	0,0000006071000 00	0,0000004778192 00	0,0007651860929 00	0,0910862522059 00
Sk- Mel 28	0,0000000108500 00	0,0000028100369 40	0,0000000709474 30	0,4480650477116 20
MeWo	0,0000073710000 00	0,4480650477100 00	0,0000170309900 00	0,0003143747800 00
HeMa- LP	0,0000000000094 43	0,0041169784323 93232	0,0000000000042 32489	0,0000501936435 26186

11.1.2. Statistische Daten und Tabellen zu Abschnitt 3.4.

Tabelle 6: Beeinflussung der Messwerte durch DMSO. Statistische Daten zu Abbildung 10. Mittels Kruskal-Wallis Test wurde auf Gruppenunterschiede getestet, bei Signifikanz folgte ein Post-hoc Test (Dunn's-Test). Bei A375 ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede. Bei HeMa-LP erfolgte die Testung mittels ANOVA, hier ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede. Die Fehlerkorrektur erfolgte nach der Holm-Methode.

		p-Wert (Dunn's Test)		
Zell- linie	p-Wert (Kruskal- Wallis Test)	DMSO 100 % vs. DMSO 25 %	DMSO 100 % vs. Referenz	DMSO 25 % vs. Referenz
A375	0,05838	entfällt	entfällt	entfällt
Preyer	9,288e-07	6,077839e-01	2,535547e-04	2,444791e-05

IGR-1	5,554e-06	3,372671e-01	2,100251e-05	1,420267e-03
Sk-Mel 28	0,2353	entfällt	entfällt	entfällt
MeWo	1,726e-05	3,526024e-02	5,557685e-02	1,090039e-05
HeMa-LP	0,363 (ANOVA)	entfällt	entfällt	entfällt

Simulation der Wirkung von Hypoxie durch Zugabe von CoCl₂ und DMOG

Tabelle 7: CoCl₂. Statistische Daten zu Abbildung 11. Mittels Kruskal-Wallis Test wurde auf Gruppenunterschiede getestet, bei Signifikanz folgte ein Post-hoc Test (Dunn's-Test). Die Fehlerkorrektur erfolgte nach der Holm-Methode.

		p-Wert (Dunn's Test)		
Zell- linie	p-Wert (Kruskal-Wallis Test)	CoCl ₂ 100 % vs. CoCl ₂ 25 %	CoCl ₂ 100 % vs. Referenz	CoCl ₂ 25 % vs. Referenz
A375	4,061e-06	2,228657e-01	1,491441e-05	4,237045e-03
Preyer	2,303e-06	1,204542e-06	7,167573e-03	8,685026e-04
IGR-1	0,005583	0,017992975	0,006932449	0,975446175
Sk-Mel 28	8,927e-05	6,995436e-02	6,509529e-05	6,246449e-02
MeWo	0,01699	0,2854301	0,0132612	0,2485073
HeMa-LP	0,0004222	0,002925433	0,000931981	0,671373241

Tabelle 8: DMOG. Statistische Daten zu Abbildung 12. Die Auswertung erfolgte mit einem Mann-Whitney-U-Test. Die Fehlerkorrektur erfolgte nach der Holm-Methode.

		p-Wert (Mann-Whitney-U-Test)		
Zell- linie	DMOG 100 % vs. DMOG 25 %	DMOG 100 % vs. Referenz (DMSO 100 %)	DMOG 25 % vs. Referenz (DMSO 25 %)	
A375	0,0004662005	0,0004662005	0,0104118104	
Preyer	0,0139860140	0,0004662005	0,0649572650	
IGR-1	0,7984459984	0,0004662005	0,0004662005	
Sk-Mel 28	0,129914530	0,003263403	0,505361305	
MeWo	0,8784770785	0,0004662005	0,0004662005	

HeMa-LP	0,05714286	0,01212121	0,07272727
----------------	------------	------------	------------

HIF-Signalwege

Tabelle 9: HIF-Inhibitoren. Statistische Daten zu Abbildung 13 und 14. Die Auswertung erfolgte mit einem Mann-Whitney-U-Test. Die Fehlerkorrektur erfolgte nach der Holm-Methode.

	HeMa-LP	A375	Preyer
CAS93 100 % vs. Referenz	0,0004662005	0,209790210	0,4418026418
CAS93 25 % vs. Referenz	0,8784770785	0,001864802	0,0009324009
CAS93 100 % vs. CAS93 25 %	0,0004662005	0,400467550	0,0037296037
FM19 100 % vs. Referenz	0,08438228	0,08289641	0,72090132
FM19 25 % vs. Referenz	0,08438228	0,03123543	0,03123543
FM19 100 % vs. FM19 25 %	0,08438228	0,04769047	0,03123543
CAS88 100 % vs. Referenz	0,0037296037	0,0004662005	0,020823621
CAS88 25 % vs. Referenz	0,0147630148	0,0004662005	0,020823621
CAS88 100 % vs. CAS88 25 %	0,0004662005	0,0004662005	0,005594406
KC72 100 % vs. Referenz	0,0004662005	0,1048951049	0,1659673660
KC72 100 % vs. KC72 25 %	0,0006216006	0,0004662005	0,0004662005
KC72 100 % vs. KC72 25 %	0,0649572650	0,0004662005	0,9591297591
CAY 100 % vs. Referenz	0,0004662005	0,0295260295	0,441802642
CAY 25 % vs. Referenz	0,1303807304	0,0004662005	0,020823621
CAY 100 % vs. CAY 25 %	0,0004662005	0,0295260295	0,005594406

Tabelle 10: HIF-Inhibitoren Fortsetzung

	IGR-1	Sk-Mel 28	MeWo
CAS93 100 % vs. Referenz	0,0004662005	0,1048951049	0,0021756022
CAS93 25 % vs. Referenz	0,0004662005	0,0004662005	0,0004662005
CAS93 100 % vs. CAS93 25 %	0,0004662005	0,0004662005	0,0021756022
FM19 100 % vs. Referenz	0,0004662005	0,2607615	0,0004662005
FM19 25 % vs. Referenz	0,0004662005	0,1496503	0,0295260295
FM19 100 % vs. FM19 25 %	0,1605283605	0,7984460	0,9591297591
CAS88 100 % vs. Referenz	0,0004662005	0,32105672	0,0004662005
CAS88 25 % vs. Referenz	0,0004662005	0,32105672	0,0004662005
CAS88 100 % vs. CAS88 25 %	0,2476478461	0,04428904	0,0010878011

KC72 100 % vs. Referenz	0,0004662005	0,0004662005	0,505361305
KC72 100 % vs. KC72 25 %	0,0004662005	0,0139860140	0,005594406
KC72 100 % vs. KC72 25 %	0,0006216006	0,0649572650	0,013986014
CAY 100 % vs. Referenz	0,009759243	0,03123543	0,0004662005
CAY 25 % vs. Referenz	0,656410256	0,46899767	0,0018648019
CAY 100 % vs. CAY 25 %	0,959129759	0,46899767	0,0004662005

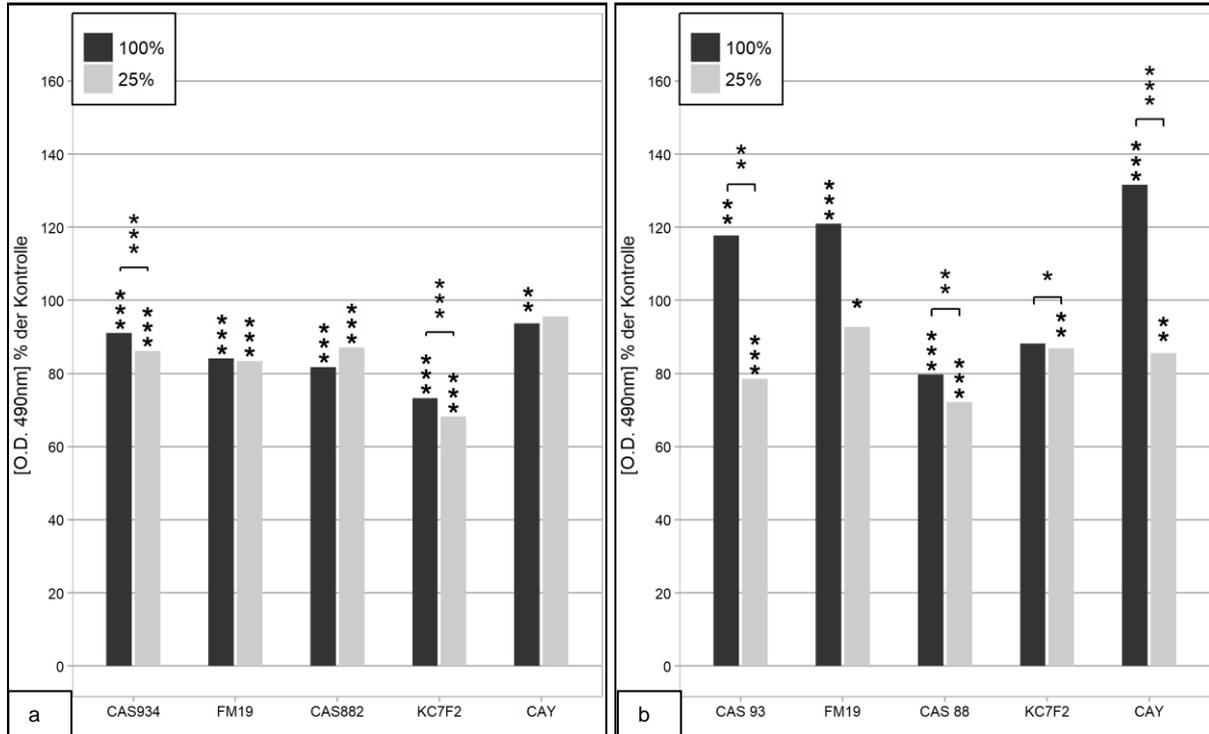


Abbildung 35 a: IGR-1, HIF-Inhibitoren. b: MeWo, HIF-Inhibitoren. Darstellung der Messwerte der optischen Dichte im Bezug auf die jeweilige unbehandelte Referenzkultur. Diese ist als 100 % gesetzt und nicht mit abgebildet. (*p<0,05; **p<0,01; *p<0,001). Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).**

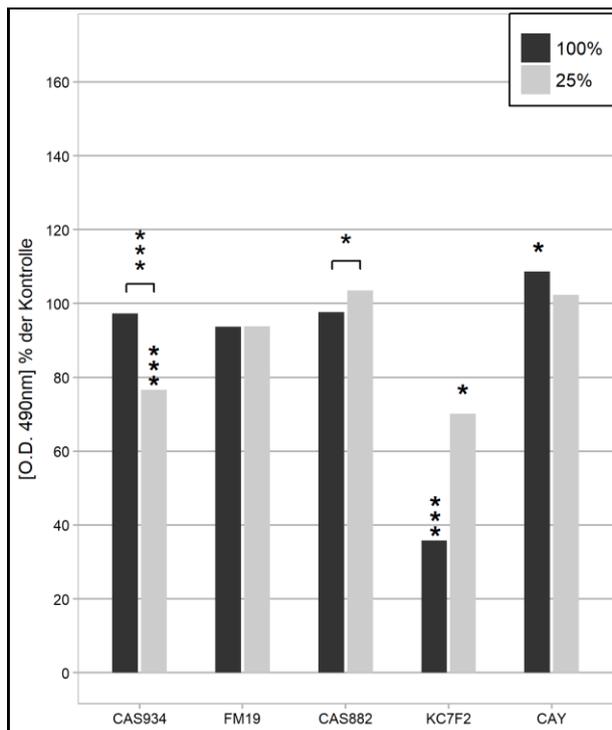


Abbildung 36: Sk-Mel 28, HIF-Inhibitoren. Darstellung der Messwerte der optischen Dichte im Bezug auf die jeweilige unbehandelte Referenzkultur. Diese ist als 100 % gesetzt und nicht mit abgebildet. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Signifikante Gruppenunterschiede sind durch Klammern über den Balken gekennzeichnet (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Hemmung der SOD 1 durch ATTM

Tabelle 11: ATTM. Statistische Daten zu Abbildung 15. Die Auswertung erfolgte mit einem Mann-Whitney-U-Test. Die Fehlerkorrektur erfolgte nach der Holm-Methode.

Zell- linie	p-Wert (Mann-Whitney-U-Test)		
	ATTM 100 % vs. ATTM 25 %	ATTM 100 % vs. Referenz (DMSO 100 %)	ATTM 25 % vs. Referenz (DMSO 25 %)
A375	0,0010878011	0,0004662005	0,0004662005
Preyer	0,0046620047	0,0012432012	0,0004662005
IGR-1	0,01398601	0,26076146	0,27863248
Sk- Mel 28	0,20979021	0,02097902	0,20979021
MeWo	0,0004662005	0,0004662005	0,0018648019
HeMa- LP	0,04428904	0,46899767	0,46899767

Beeinflussung der zellulären ROS-Produktion durch Hemmung der NADPH-Oxidase

Tabelle 12: DPI. Statistische Daten zu Abbildung 16 a. Die Auswertung erfolgte mit einem Mann-Whitney-U-Test. Die Fehlerkorrektur erfolgte nach der Holm-Methode.

Zelllinie	p-Wert (Mann-Whitney-U-Test)		
	DPI 100 % vs. DPI 25 %	DPI 100 % vs. Referenz (DMSO 100 %)	DPI 25 % vs. Referenz (DMSO 25 %)
A375	0,0004662005	0,0004662005	0,0004662005
Preyer	0,0004662005	0,0004662005	0,0004662005
IGR-1	0,5632366271	0,0018619445	0,0004662005
Sk-Mel 28	0,0004662005	0,0004662005	0,0004662005
MeWo	0,0004662005	0,0004662005	0,0004662005
HeMa-LP	0,02857143	0,01212121	0,01212121

Tabelle 13: Apocynin. Statistische Daten zu Abbildung 16 b. Bei Mittels Kruskal-Wallis Test wurde auf Gruppenunterschiede getestet, bei Signifikanz folgte ein Post-hoc Test (Dunn's-Test). Bei Sk-Mel 28 und HeMa-LP ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede. Bei IGR-1 erfolgte die Testung mittels ANOVA. Die Fehlerkorrektur erfolgte nach der Holm-Methode.

Zelllinie	p-Wert (Kruskal-Wallis Test)	p-Wert (Dunn's Test)		
		Apocynin 100 % vs. Apocynin 25 %	Apocynin 100 % vs. Referenz	Apocynin 25 % vs. Referenz
A375	5,511e-06	0,7974630903	0,0003859395	0,0001587511
Preyer	7,912e-07	9,658849e-01	7,434700e-05	6,243704e-05
IGR-1	6,82e-12 (ANOVA)	0,5291852	0,0000000	0,0000000
Sk-Mel 28	0,06591	entfällt	entfällt	entfällt
MeWo	9,145e-05	0,7090730857	0,0005893985	0,0019846243
HeMa-LP	0,1142	entfällt	entfällt	entfällt

Beeinflussung des Transkriptionsfaktors Nrf2 durch Trigonelline, Luteolin und Cucurbitacin B

Tabelle 14: Melanozyten, Beeinflussung von Nrf2. Statistische Daten zu Abbildung 17. Die Auswertung erfolgte mit einem Mann-Whitney-U-Test. Die Fehlerkorrektur erfolgte nach der Holm-Methode.

HeMa-LP	p-Wert (Mann-Whitney-U-Test)
Luteolin 100 % vs. Referenz (DMSO 100 %)	0,0004662005
Luteolin 25 % vs. Referenz (DMSO 25 %)	0,0004662005
Luteolin 100 % vs. Luteolin 25 %	0,0046620047
Cucurbitacin B 100 % vs. Referenz (DMSO 100 %)	0,0080808081
Cucurbitacin B 25 % vs. Referenz (DMSO 25 %)	0,0004662005
Cucurbitacin B 100 % vs. Cucurbitacin B 25 %	0,8080808081
Trigonelline 100 % vs. Referenz	0,0413364413
Trigonelline 25 % vs. Referenz	0,5737373737
Trigonelline 100 % vs. Trigonelline 25 %	0,0004662005

Tabelle 15: Melanomzellen, Cucurbitacin B. Statistische Daten zu Abbildung 18. Die Auswertung erfolgte mit einem Mann-Whitney-U-Test. Die Fehlerkorrektur erfolgte nach der Holm-Methode.

	p-Wert (Mann-Whitney-U-Test)		
Zell- linie	Cucurbitacin B 100 % vs. Cucurbitacin B 25 %	Cucurbitacin B 100 % vs. Referenz (DMSO 100 %)	Cucurbitacin B 25 % vs. Referenz (DMSO 25 %)
A375	0,0004662005	0,0004662005	0,0004662005
Preyer	0,0004662005	0,0004662005	0,0004662005
IGR-1	0,0037296037	0,1048951049	0,0004662005
Sk-Mel 28	0,0069930070	0,0004662005	0,0004662005
MeWo	0,2786324786	0,0004662005	0,0004662005

Tabelle 16: Melanomzellen, Luteolin. Statistische Daten zu Abbildung 19. Die Auswertung erfolgte mit einem Mann-Whitney-U-Test. Die Fehlerkorrektur erfolgte nach der Holm-Methode.

	p-Wert (Mann-Whitney-U-Test)		
Zell- linie	Luteolin 100 % vs. Luteolin 25 %	Luteolin 100 % vs. Referenz (DMSO 100 %)	Luteolin 25 % vs. Referenz (DMSO 25 %)
A375	0,0004662005	0,0004662005	0,8784770785
Preyer	0,0004662005	0,0281274281	0,0004662005

IGR-1	0,0004662005	0,1605283605	0,0004662005
Sk-Mel 28	0,0004662005	0,0004662005	0,0004662005
MeWo	0,1033079701	0,0018619445	0,0004662005

Tabelle 17: Melanomzellen, Trigonelline. Statistische Daten zu Abbildung 20. Mittels Kruskal-Wallis Test wurde auf Gruppenunterschiede getestet, bei Signifikanz folgte ein Post-hoc Test (Dunn's-Test). Bei Sk-Mel 28 ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede. Die Fehlerkorrektur erfolgte nach der Holm-Methode.

		p-Wert (Dunn's Test)		
Zelllinie	p-Wert (Kruskal-Wallis Test)	Trigonelline 100 % vs. Trigonelline 25 %	Trigonelline 100 % vs. Referenz	Trigonelline 25 % vs. Referenz
A375	0,03923	0,50737272	0,24880873	0,05655187
Preyer	1,799e-05	1,155922e-05	1,366981e-03	2,374885e-02
IGR-1	0,0005053	0,0031672708	0,0006832445	0,9693076318
Sk-Mel 28	0,1124	entfällt	entfällt	entfällt
MeWo	0,001871	0,015397255	0,001703306	0,711923151

Verdünnungsreihen von Trigonelline, Luteolin und Cucurbitacin B

Tabelle 18: A375, Verdünnungsreihe Trigonelline, s. Abb. 21. Test auf Gruppenunterschiede mit Kruskal-Wallis-Test ($p=7.773e-06$). Als Post-hoc Test wurde der Dunn's Test verwendet. In der Tabelle finden sich die p-Werte der Gruppenvergleiche bzw. des Vergleichs mit dem Medium.

A375	Medium	Trig.100 %	Trig. 50 %	Trig. 25 %	Trig.12,5 %	Trig.6,25 %
Trig. 200 %	0,0001719 437	1,00000000 00	1,00000000 00	1,00000000 00	1,00000000 00	1,00000000 00
Trig. 100 %	0,0001805 409		1,00000000 00	1,00000000 00	1,00000000 00	1,00000000 00
Trig. 50 %	0,0667927 870			1,00000000 00	1,00000000 00	1,00000000 00
Trig. 25 %	0,1170056 628				1,00000000 00	1,00000000 00
Trig. 12,5 %	0,0013706 813					1,00000000 00

Trig.	0,0449992					
6,25 %	243					

Tabelle 19: A375, Verdünnungsreihe Luteolin, s. Abb. 21. Mann-Whitney-U-Test sowie Gruppenvergleiche mittels Dunn's Test.

A375	Medium	Lut. 100 %	Lut. 50 %	Lut. 25 %	Lut. 12,5 %	Lut.6,25 %
Luteolin 200 %	0,0009324 009	9,709106e- 01	7,271148e- 01	2,190094e- 02	3,395532e- 05	7,265800e- 04
Luteolin 100 %	0,0009324 009		6,509548e- 01	2,225163e- 02	3,767251e- 05	7,827320e- 04
Luteolin 50 %	0,0009324 009			5,207638e- 01	1,356602e- 02	1,051929e- 01
Luteolin 25 %	0,0009324 009				5,382147e- 01	1,000000e+ 00
Luteolin 12,5 %	0,0009324 009					8,069308e- 01
Luteolin 6,25 %	0,0009324 009					

Tabelle 20: A375, Verdünnungsreihe Cucurbitacin B, s. Abb. 21. Mann-Whitney-U-Test sowie Gruppenvergleiche mittels Dunn's Test.

A375	Medium	CucB. 100 %	CucB. 50 %	CucB. 25 %	CucB. 12,5 %	CucB. 6,25 %
CucB. 200 %	0,0009324 009	6,738782e- 01	8,451486e- 01	6,024196e- 01	1,212455e- 01	2,297917e- 03
CucB. 100 %	0,0009324 009		9,715094e- 01	3,846321e- 02	2,964774e- 03	9,646913e- 06
CucB. 50 %	0,0009324 009			3,816595e- 02	2,813427e- 03	8,593497e- 06
CucB. 25 %	0,0009324 009				8,640448e- 01	2,457017e- 01
CucB. 12,5 %	0,0009324 009					9,317328e- 01
CucB. 6,25 %	0,0009324 009					

Tabelle 21: Preyer, Verdünnungsreihe Trigonelline, s. Abb. 22. Test auf Gruppenunterschiede mit Kruskal-Wallis-Test ($p=7.773e-06$). Als Post-hoc Test wurde der Dunn's Test verwendet. In der Tabelle finden sich die p-Werte der Gruppenvergleiche bzw. des Vergleichs mit dem Medium.

Preyer	Medium	Trig.100 %	Trig. 50 %	Trig. 25 %	Trig.12,5 %	Trig.6,25 %
Trig. 200 %	2,155882e-05	1,000000e+00	1,000000e+00	1,000000e+00	1,000000e+00	1,000000e+00
Trig. 100 %	5,132672e-03		1,000000e+00	1,000000e+00	1,000000e+00	1,000000e+00
Trig. 50 %	1,169278e-03			1,000000e+00	1,000000e+00	9,809396e-01
Trig. 25 %	6,032448e-02				1,000000e+00	1,000000e+00
Trig. 12,5 %	1,989575e-04					1,000000e+00
Trig. 6,25 %	1,090427e-03					

Tabelle 22: Preyer. Verdünnungsreihe Luteolin, s. Abb. 22. Mann-Whitney-U-Test sowie Gruppenvergleiche mittels Dunn's Test.

Preyer	Medium	Lut.100 %	Lut. 50 %	Lut. 25 %	Lut.12,5 %	Lut.6,25 %
Lut. 200 %	0,0009324009	1,000000e+00	1,558969e-01	6,674435e-03	6,781746e-05	1,652487e-07
Lut. 100 %	0,0009324009		7,592937e-01	2,004388e-01	7,281202e-03	6,297335e-05
Lut. 50 %	0,0009324009			5,061958e-01	1,781678e-01	6,067668e-03
Lut. 25 %	0,0009324009				1,000000e+00	1,336259e-01
Lut. 12,5 %	0,8784770785					2,530979e-01
Lut. 6,25 %	0,0012432012					

Tabelle 23: Preyer, Verdünnungsreihe Cucurbitacin B, s. Abb. 22. Mann-Whitney-U-Test sowie Gruppenvergleiche mittels Dunn's Test.

Preyer	Medium	CucB. 100 %	CucB. 50 %	CucB. 25 %	CucB. 12,5 %	CucB. 6,25 %
CucB. 200 %	0,0009324 009	1,000000e+ 00	2,298740e- 01	9,288510e- 01	2,001086e- 01	7,854968e- 03
CucB. 100 %	0,0009324 009		2,918160e- 01	1,000000e+ 00	1,305455e- 01	3,753640e- 03
CucB. 50 %	0,0009324 009			2,452748e- 01	1,698205e- 04	5,138610e- 07
CucB. 25 %	0,0009324 009				1,780254e- 01	6,166841e- 03
CucB. 12,5 %	0,0009324 009					1,000000e+ 00
CucB. 6,25 %	0,0009324 009					

Beeinflussung der Signalkaskaden von mTOR und Rac1

Tabelle 24: Rapamycin. Statistische Daten zu Abbildung 23. Die Auswertung erfolgte mit einem Mann-Whitney-U-Test. Die Fehlerkorrektur erfolgte nach der Holm-Methode.

Zell- linie	p-Wert(Mann-Whitney-U-Test)		
	Rapamycin 100 % vs. Rapamycin 25 %	Rapamycin 100 % vs. Referenz (DMSO 100 %)	Rapamycin 25 % vs. Referenz (DMSO 25 %)
A375	1,0000000000	0,0012432012	0,0004662005
Preyer	0,3282051282	0,0004662005	0,0093240093
IGR-1	0,0206682207	0,0004662005	0,0004662005
Sk-Mel 28	0,7209013209	0,0004662005	0,0004662005
MeWo	0,3822843823	0,0208236208	0,0004662005
HeMa- LP	0,68571429	0,01212121	0,42828283

Tabelle 25: Statistische Daten zu Abbildung 24. Es wurde mittels Kruskal-Wallis Test auf Gruppenunterschiede getestet, bei Signifikanz folgte ein Post-hoc Test (Dunn's-Test). Bei IGR-1 erfolgte die Testung mittels ANOVA. Die Fehlerkorrektur erfolgte über die Holm-Methode.

		p-Wert (Dunn's Test)		
Zell- linie	p-Wert (Kruskal- Wallis)	NSC23. 100 % vs. NSC23. 25 %	NSC23. 100 % vs. Referenz	NSC23. 25 % vs. Referenz
A375	1,393e-05	3,300626e-02	8,712799e-06	5,343140e-02
Preyer	4,585e-05	2,599306e-05	1,756498e-02	4,237045e-03
IGR-1	2,55e-07 (ANOVA)	0,0000340	0,0000002	0,5238557
Sk-Mel 28	2,059e-06	8,805239e-02	2,542343e-06	6,264202e-03
MeWo	2,064e-06	8,808151e-02	2,548216e-06	6,269701e-03
HeMa- LP	0,0003598	0,0047227859	0,0005354633	0,4795001222

11.2. Geräteliste

Gelelektrophoreseapparaturen

ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

XCell4 SureLock™ Midi-Cell,

Cat. No.: WR0100

NuPAGE Novex 4-12% Bis-Tris

Midi Protein Gels, 20-Well,

Cat. No.: WG1402BOX

Vakuum-Sauger

Longfian Scitech Co.,LTD., China

Suction Pump SXT-5A

Blotapparaturen

ThermoFisher Scientific, Waltham, USA

iBlot Gel Transfer Device,

Cat.No.: IB1001EU

iBlotTransfer Stack, PVDF, regular
size, Cat.No.:IB401001

Blotscanner

Li-Cor, Inc., Lincoln, Nebraska USA

C-DiGit Blot Scanner, P/N 3600-00

Brutschränke

Nuaire

TS Autoflow
CO₂-Water-Jacketed Incubator

Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland

CO₂-Incubator CB150
Cat. No. 9040-0038

Hypoxiekammer

Billups-Rothenberg, Inc.; USA

Modular Incubator Chamber
(MIC-101)
Single Flow Meter (SFM3001)

Mikroskope und Zubehör

Helmut Hund GmbH, Wetzlar, Deutschland

Wilovert A

Leica Mikrosysteme, Wetzlar, Deutschland

DMIL 090-135.00

Zeiss, Göttingen, Deutschland

Axioskop 2 mot plus
Axiovert 40 CFL
Zeiss HBO 50 microscope
Illuminator
Zeiss MBQ 52 AC Power Supply

Digitalkameras

Diagnostic Instruments, Inc.,
Spot Imaging, Sterling Heights, USA

Diagnostic Instruments Inc.,
Model #: 34.0
1.4MP Monochrome w/o IR,
Serial #: 255179
SPOT Imaging Insight Camera,
SPOT Insight 2.0 Mp Monochrome
Cat.No.: IN1800

Neubauerzählkammer

Karl Hecht „Assistent“ GmbH,
Altenau, Schweiz

Neubauer Zählkammer

Zellzählung

Ugreen Corporation, Taiwan

Tally Counter HT-2

Photometer

Molecular Devices, Sunnyvale, USA

SpectraMax GeminiXS,
SoftMax Pro 5

Pipetten

Brand GmbH & Co KG,
Wertheim, Deutschland

Transferpette-12; 2,5-25µl
Transferpette-8; 30-300µl
Accu-Jet pro

Eppendorf GmbH,
Wesseling-Berzdorf, Deutschland

Eppendorf Reserch
0,1-2,5 µl; 0,5-10 µl; 2-20 µl;
10-100 µl; 20-200 µl; 100-1000 µl

GlobalTown Microtech, Inc.,
Sarasota, USA

AccuPette; 10-100 µl;
20-200 µl; 100-1000 µ

Sterilwerkbänke

The Baker Company, Sanford, Maine

SterilGARD Class II Type A/B3

Antair BSK

BSK/4, Seriennr.: 6708

Tali Image-based Cytometer

ThermoFisher Scientific Inc.,
Waltham, USA

Invitrogen Tali,
Image Based Cytometer

Zentrifuge

Eppendorf GmbH,
Wesseling-Berzdorf, Deutschland

Centrifuge 5702

ThermoFisher Scientific Inc.,
Waltham, USA

Heraeus, Multifuge 3 S-R

Warmwasserbad

Dinkelberg-Labortechnik,
Neu-Ulm, Deutschland

minitherm 1; Baujahr 1993
Modell MTH 231220

Dispergierwerkzeug

Camlab Limited, Cambridge, UK

Omni TH

11.3. Software

Microsoft Corporation, Redmond, USA	Microsoft Office 2007
Molecular Devices, Sunnyvale, USA	SoftMax Pro Software
Diagnostic Instruments, Inc., SPOT Imaging, Sterling Heights, USA	SPOT Advanced Software 5.1
Visitron systems GmbH, Puchheim, Deutschland	VisiView
Li-Cor Cor, Lincoln, USA	Image Studio (Version 5.0) Image Studio Lite (Version 5.2.)
Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz	Citavi 5, Version 5.2.0.8

Freeware

Image J
IrvanView (Version 4.42)
R-Studio (Version 3.4.1.)

11.4. Allgemeine Materialien

Dako Deutschland GmbH, Hamburg	Dako Pen, Product No. S200230-2
Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland	CELLSTAR Serological Pipette, sterile 10ml CELLSTAR Tubes, 15ml; 50ml
Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland	SIGMA Immersion oil Cat. No. 56822-250ML Mowiol 4-88; Cat.No.: 81381
Simon Keller AG, Burgdorf, Schweiz	Ecolab Incidin Foam Art.-Nr. 022200 Art.Nr. 022235
Simport, Beloeil, Canada	Cryovial T311-2

ThermoFisher Scientific Inc.,
Waltham, USA

Menzel-Gläser, Objektträger
Superfrost Plus
Art.No. J1800AMNZ

Nunc, zellkulturbehandelte
EasYFlask
25 cm²; Cat.No: 156367
75 cm², Cat.No.: 156499

invitrogen Tali
Cellular Analysis Slide

Thomas Scientific, Swedesboro, USA

Falcon 15 ml Conical Centrifuge
Tubes, Cat.No
Falcon Serological Pipette,
sterile 50ml, REF 357550
sterile 5ml, REF 357543

Falcon Tissue Culture Dish,
100 x 20mm, REF 353003

Falcon Multiwell,
6 Well, Thomas No.: 6902A01
24 Well, Thomas No.:6902A09

Parafilm M Sealing Film
Thomas No: 7315D11

Tpp Techno Plastic Products AG
Trasadingen, Schweiz

96 Well Zellkulturplatte
Cat.No.: 92696

VWR International GmbH,
Darmstadt, Deutschland

Deckgläser rund, ø13mm
Cat. No. 630-1597

Werner & Mertz GmbH, Mainz, Deutschland

Frosch Spiritus Glasreiniger

Ahn Biotechnologie GmbH,
Nordhause, Deutschland

Top-Line Filter-Tips, 1-100 µl,
steril, Cat. No. 2-112-96-0

Gilson Inc., Middleton, USA

Diamond Tipack, DF200ST
20-200 µl, steril, Ref.: F171503

Sarstedt AG & Co KG,
Nümbrecht, Deutschland

Biosphere Filter-Tips, steril
100-1000 µl, Ref.: 70.762.211

Sigma Aldrich Chemie GmbH,
München, Deutschland

Gelantin from cold water fish skin
40-50 % in H₂O
CAS-Nr.: 9000-70-8

11.5. Chemikalien und Enzyme

Promega Corporation, Madison,
USA

CellTiter 96 AQueous One
Solution; Cell Proliferation Assay

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
München, Deutschland

SIGMA Tryptan Blue Solution
(0,4%), Cat. No. T8154-100ml

SIGMA Tween 20, viscous
liquid, cell culture tested
Cat. No. P2287-100ML

Mowiol® 10-98
Cat. No 10852-250G

SIGMA Dimethyl sulfoxide
(DMSO), for molecular biology,
>=99,9%, Cat. No. D8418-250ML

SIGMA Dihydroethidium
BioReagent, suitable for
fluorescence, >=95% (HPCE)
Cat. No. 37291-25MG

SIGMA Ponceau S solution
Cat. No. P7170-1L

Thermo Fisher Scientific Inc.
Waltham, USA

gibco Trypsin/EDTA Solution
0,05% phenol red,
Cat.Nr: 25300-062

gibco Defined Trypsin Inhibitor
(DTI), Cat.-No.: R007-100

Zytomed Systems GmbH,

HIER Citrate Buffer pH 6,0

Berlin, Deutschland

Cat.No.: ZUC028-100
ZUC028-500

Li-Cor Cor, Lincoln, USA

WesternSure Chemiluminescent
Reagents
P/N 926-10001; 926-10002

11.6. Antikörper und Immunchemikalien

Primäre Antikörper

abcam, Cambridge, USA

ab2185, rabbit (rb) pAb to HIF-1 α
ab199, rb pAb to HIF-2 α
ab140667, mouse (ms) mAb to
ABCB5
ab14078, chicken (chk) pAb to
VEGF
ab3125, ms mAb to p75 NGF
Receptor
ab31163, rb pAb to Nrf2
ab23375, rb pAb to ALDH1A1

Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

MAB4399, ms mAb to CD133

Santa Cruz Biotechnology, Inc.,
Dallas, USA

sc-8106, goat (gt) pAb to Melan A

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
München, Deutschland

ms mAb to JARID-1B
ms Anti- β -Actin, Cat.No. A5316

Sekundäre Antikörper

ThermoFisher Scientific Inc.,
Waltham, USA

A-21202; donkey (dnk) anti-ms
IgG (H+L) Alexa Fluor 488, pAb
A-21147, gt anti-ms IgG2b,
Alexa Fluor 555, pAb
A-21206, dnk anti-rb IgG (H+L),
Alexa Fluor 488, pAb
A-31572, dnk anti-rb IgG (H+L),
Alexa Fluor 555, pAb
A-21103, gt anti-chk IgY (H+L),

Alexa Fluor 633, pAb
A-21081, dnk anti-gt (H+L),
Alexa Fluor,350 pAb

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,
München, Deutschland

DAPI, Cat. No.: 9542

Tabelle 26: Verwendete Antikörper mit Herstellerangaben und verwendeter Verdünnung

	Primärer Antikörper				Sekundärer Antikörper			
	Cat.No.	Ziel- struktur	Wirt	Verdün- nung	Bestell- Nr.	Wirt	Verdün- nung	Wellen- länge
AK 21	sc-8106	Melan A	Ziege	1:200	A-21081	Esel	1:1000	350
	ab1406 67	ABCB5	Maus	1:200	A-21202	Esel	1:1000	488
	ab2185	HIF-1 α	Hase	1:1000	A-31572	Esel	1:1000	555
	ab1407 8	VEGF	Huhn	1:100	A-21103	Ziege	1:1000	633
AK 22	sc-8106	Melan A	Ziege	1:200	A-21081	Esel	1:1000	350
	ab3125	p75NGF	Maus	1:200	A-21202	Esel	1:1000	488
	ab3116 3	NRF2	Hase	1:200	A-31572	Esel	1:1000	555
AK 23	sc-8106	Melan A	Ziege	1:200	A-21081	Esel	1:1000	350
	MAB43 99	CD133	Maus	1:100	A-21202	Esel	1:1000	488
	ab199	HIF-2 α	Hase	1:100	A-31572	Esel	1:1000	555
AK 24	sc-8106	Melan A	Ziege	1:200	A-21081	Esel	1:1000	350
	ab2337 5	ALDH1A1	Hase	1:200	A-21206	Esel	1:1000	488
	ab1406 67	ABCB5	Maus	1:200	A-21147	Ziege	1:1000	555
AK 25	sigma					DAPI	1:4000	350
	sigma	JARID-1B	Maus	1:200	A-21202	Esel	1:1000	488
	ab3116 3	NRF2	Hase	1: 200	A-31572	Esel	1:1000	555

Li-Cor Cor, Lincoln, USA

WesternSure® Goat anti-Mouse

HRP secondary antibody

Cat.No. 926-80010

WesternSure Goat anti-Rabbit HRP

secondary antibody

Cat.No. 926-80011

11.7. Inhibitoren /Stimulanzen

Tabelle 27: Übersicht über die verwendeten Inhibitoren und Stimulationen mit Herstellerangaben und verwendetem Lösungsmittel

Name	Firma	Katalog-nummer	CAS No.:	MW	Lösungsmittel
Ammonium tetrathiomolybdate (ATTM)	Sigma	323446-1G	15060-55-6	260,28	DMSO
Apocynin	Sigma	73536-100MG	498-02-2	166,17	H2O
CAS 882268-69-1	Calbiochem	400087	882268-69-1	287,3	DMSO
CAS 934593-90-5	Calbiochem, Millipore	400083	934593-90-5	435,5	DMSO
CAY10585	Caymen Chemicals	10012682	934593-90-5	435,5	DMSO
Cobalt chloride (CoCl ₂)	Sigma	232696-5G-D	7646-79-9	129,84	H2O
Cucurbitacin B	Sigma	C8499-25MG	6199-67-3	558,7	DMSO
Dimethyloxallyl Glycine (DMOG)	Caymen Chemicals	71210	89464-63-1	175,1	DMSO
Diphenyleneiodonium chloride (DPI)	Sigma	D2926-10MG	4673-26-1	314,55	DMSO
FM19G11	Calbiochem	400089	329932-55-0	463,4	DMSO
KC7F2	Calbiochem	400088	927822-86-4	570,4	DMSO
Luteolin	Sigma	72511-10MG	491-70-3	286,24	DMSO

NSC23766	Tocris	2161	1177865-17-6	530,97	H2O
Rapamycin	Sigma	37094-10MG	53123-88-9	914,17	DMSO
Trigonelline hydrochloride	Sigma	T5509-1G	6138-41-6	173,6	H2O

11.8. Puffer, Medien, Lösungen

Braun, Melsungen, Deutschland

Aqua, Ecotainer

Santa Cruz Biotechnology, Inc.
Dallas, USA

4 % Paraformaldehyd in PBS
CAS 30525-89-4
Cat.No.: sc-281692

Lösungen für Immunhistochemie

Waschpuffer

PBS

Blockierlösung

PBS mit:

1 % BSA;

10 % FSC

0,25 % Fischgelantine

Permeabilisierung:

PBS

Zusätze:

0,1 % Tween 20

Lösungen und Medien für die Zellkulturen

Genaxxon bioscience GmbH,
Ulm, Deutschland

Amphotericin B Lösung
Cat.No.: M3109.0100

ThermoFisher Scientific Inc.,
Waltham, USA

gibco Antibiotic-Antimycotic
(100X), Cat.Nr.: 15240-062

gibco Penicillin/Streptomycin
(10,000 U/mL), Cat.Nr: 15140-122

Gibco Fetal Bovine Serum, EU-
approved, South America origin,
Cat.No.: 10270-106

gibco Human Melanocyte
Growth Supplement (HMGS),
Cat.No.: S-002-5

gibco HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)
piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure))
Cat.No.: 15630-080

gibco DMEN (Dulbecco's Modified
Eagle Medium), high glucose,
GlutaMAX supplement, pyruvate,
Cat.No.: 31966-021

gibcoMedium 254,
Cat.No.: M-254-500

gibcoKanamycin Sulfate
Cat.No.: 15160-047

Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland

PBS-Lösung ohne Ca^{2+} , ohne
 Mg^{2+} , unsteril, Cat.No.: 1825-5000
PBS- Lösung ohne Ca^{2+} , ohne
 Mg^{2+} , steril, Cat.No.: 1825

Einfriermedium

FBS + 15% DMSO

Lösungen für Proteinbestimmung

Lysepuffer

ThermoFisher Scientific Inc.,
Waltham, USA

Np40 Cell Lysis Buffer
Cat.No.: FNN0021
Halt Protease Inhibitor Cocktail
(100X)
Cat.No.: 87786

Bradford

ThermoFisher Scientific Inc.,
Waltham, USA

Pierce BCA Protein Assay Kit,
Cat.No.: 23227

Bio-Rad Laboratories GmbH,

Protein Assay Kit II

München, Deutschland

Cat.No.: 5000002

Sigma-Aldrich Chemie GmbH
München, Deutschland

Albumin from bovine serum $\geq 98\%$
Cat.No.: A7906-100G

Loading Control

ThermoFisher Scientific Inc.,
Waltham, USA

PageRuler Plus Prestained Protein Ladder,
10 to 250 kDa, Cat.No.: 26619

Running Buffer

ThermoFisher Scientific Inc.,
Waltham, USA

NuPAGE MES SDS Running Buffer (20X)
Cat.No.: NP0002

Sample Buffer

ThermoFisher Scientific Inc.,
Waltham, USA

Pierce Lane Marker Reducing Sample Buffer
Cat.No.: 39000

11.9. Zelllinien

Melanozyten

HeMa-LP

ThermoFisher Scientific Inc., Waltham, USA
HEMa-LP, Human Epidermal Melanocytes, adult,
light pigmented donor
Cat.No.: C0245C

Melanomzellen

A375

AG Dr. Dr. S. Quist

IGR-1

CLS Cell Lines Service GmbH,
Dr. Eckener –Str. 8, 69214 Eppelheim,
Cat.No: 300219

MC

AG Dr. Dr. S. Quist

MeWo

CLS Cell Lines Service GmbH,
Dr. Eckener –Str. 8, 69214 Eppelheim
Cat.No: 300285

Preyer

AG Prof. Dr. med. M. Leverkus,
Klinik und Poliklinik für Dermatologie,
Veneorologie und Allergologie,

Josef-Schneider-Str. 2, 97080 Würzburg

Sk Mel 28

CLS Cell Lines Service GmbH,
Dr. Eckener –Str. 8, 69214 Eppelheim
Cat.No: 300337

11.10. Medien zur Zellkultivierung

Melanozyten

Gibco Medium 254

Zusätze:

1 % HMGS

1 % Antibiotic-Antimycotic

1 % Kanamycin

1 % Amphotericin B

Melanomzellen

Gibco DMEM (1x) + GlutaMAX

[+] 4,5 g/l D-Glucose

[+] Pyruvat

Zusätze:

10 % FBS

1 % HEPES

1 % Antibiotic-Antimycotic

1 % Kanamycin

1 % Amphotericin B