

**Bedeutung einer $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition
für die Pathogenese des malignen Melanoms**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Tanja Alten, geb. Slodczyk

aus Leverkusen

2017

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Thomas Tüting
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Michael Hölzel

Tag der Mündlichen Prüfung: 12.12.2016

Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, Universitätsklinikum Bonn
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. ès. sci. Thomas Bieber

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	5
1.	Einleitung	8
1.1	Tumorpathogenese des malignen Melanoms	8
1.2	Bedeutung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	10
1.3	Der spezifische $G\alpha_q$ -Protein-Inhibitor „Gqic“	14
1.4	Endothelin, ein relevanter Ligand in der Melanogenese	15
1.5	Zielsetzung der Arbeit	17
2.	Material und Methoden	19
2.1	Materialien	19
2.1.1	Substanzen und Chemikalien	19
2.1.2	Lösungen und Puffersubstanzen	21
2.1.3	Enzyme	22
2.1.4	Durchflusszytometrische Färbungen	22
2.1.5	Kits und gebrauchsfertige Reagenzien	22
2.1.6	Verwendete Primer	23
2.1.7	Zelllinien	24
2.2	Zellbiologische Methoden	24
2.2.1	Zellkultur	24
2.2.2	Proliferations-Assay	25
2.2.3	Kristallviolett-Assay	26
2.2.4	XTT-Assay	26
2.2.5	Transwell-Migrations-Assay	27
2.3	Molekularbiologische Methoden	29
2.3.1	Ribonukleinsäure Isolation	29
2.3.2	Reverse Transkription	29
2.3.3	Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion	30
2.4	Immunologische Methoden	31
2.4.1	Durchflusszytometrie	31
2.5	Statistische Analyse	32
3.	Ergebnisse	33

3.1	Einfluss der $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition auf Gqic-sensitive humane und murine Melanomzellen	33
3.1.1	Genexpression der $G\alpha_q$ -Proteine ausgewählter Gqic-sensitiver Zellen	33
3.1.2	Analyse der Zellwachstumshemmung in Abhängigkeit verschiedener Gqic-Konzentrationen und verminderter Serumkonzentrationen	34
3.1.3	Kolorimetrische Analyse der Zellwachstumshemmung unter Einfluss verschiedener Gqic-Konzentrationen	37
3.1.4	Einfluss von Gqic auf Zellviabilität und Zellmetabolismus	39
3.2	Kausale Analyse der Zellwachstumshemmung	42
3.2.1	Anteil der apoptotischen Zellen unter Einwirkung von Gqic	42
3.2.2	Bestimmung der Zellzyklusphasen von Gqic-behandelten Zellen	45
3.3	Zellmorphologie und Migration im Transwell unter Einfluss von Gqic	48
3.3.1	Veränderte Zellpigmentierung und Zellmorphologie durch Gqic	48
3.3.2	Migrationsverhalten der Tumorzellen in Anwesenheit von Gqic	52
3.4	Untersuchung des Peptidhormons Endothelin als möglicher migrationsstimulierender Ligand anhand der MZ7-MEL Zellen	56
4.	Diskussion	59
4.1	Auswirkungen einer $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition auf die Zellfunktionen humaner und muriner Melanomzellen	59
4.2	Abhängigkeit der Zellfunktionen von $G\alpha_q$ -Signalwegen	63
4.3	Ausblick: $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition als Therapieoption	65
5.	Zusammenfassung	66
6.	Literaturverzeichnis	67
7.	Danksagung	72

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
APC	Allophycocyanin
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BQ788	selektiver Antagonist des Endothelinrezeptors B
BRAF	B-Raf Proto-Onkogen, Serin/Threonin-Proteinkinase
CDK4	Cyclin-abhängige Kinase
CXCL	Chemokin-Ligand (C-X-C Leitstruktur)
CXCR	Chemokin-Rezeptor der CXC-Chemokin Familie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/cDNA	Desoxyribonukleinsäure/komplementäre Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ET	Endothelin
ETRA/ETRB	Endothelin-Rezeptor Isoform A/B
FACS	Durchflusszytometrie
FCS	hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein

Abkürzung	Bedeutung
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GNA11/14/15/Q	Gen: Homo sapiens guanine nucleotide binding protein G-Protein der Untereinheit α 11/14/15/Q
Gna 11/14/Q	Gen: Mus musculus guanine nucleotide binding protein G-Protein der Untereinheit α 11/14/Q
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
Gqic	G α_q -protein inhibitory component
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGF	Hepatozyten Wachstumsfaktor
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
LPA	Lysophosphatidsäure
NaCl	Natriumchlorid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid

Abkürzung	Bedeutung
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UV	ultraviolette Strahlung
XTT	Tetrazolium-Salz 2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2 <i>H</i> -Tetrazolium-5-Carboxanilide

1. Einleitung

1.1 Tumorpathogenese des malignen Melanoms

Das Melanom entwickelt sich aus Melanozyten, den spezialisierten, vor allem in der Haut und den Augen anzutreffenden pigmentbildenden Zellen (Schopfer et al., 2007). Primäre Melanome entstehen meist de novo und zu einem geringeren Anteil auf der Grundlage eines vorbestehenden Nävus. Die gegenwärtige Klassifikation der unterschiedlichen Melanomsubtypen durch die Weltgesundheitsorganisation geht auf die histologisch-morphologischen Studien nach Clark et al. zurück. Unterschieden werden superfiziell spreitende Melanome, noduläre Melanome, Akrolentiginöse Melanome und Lentigo maligna Melanome (Bastian, 2014).

Wenngleich das maligne Melanom nur circa 2 % aller dermatologischen Krebsdiagnosen repräsentiert, geht die Mehrzahl der Todesfälle auf diese bösartige Entität zurück. Die in den vergangenen 30 Jahren gestiegene Inzidenz der Erkrankung hebt zusätzlich die Relevanz dieser Erkrankung hervor. Im Zeitraum 2006-2010 erhöhte sich beispielsweise die Inzidenz jährlich um 2,7 % in der weißen Bevölkerung (American Cancer Society, Cancer Facts & Figures, 2014). Eine positive Familienanamnese, multiple benigne oder atypische Nävi sowie eine Melanomerkkrankung in der Vergangenheit sind erstrangige Risikofaktoren. Des Weiteren erhöhen Immunsuppression, Sonnempfindlichkeit bzw. ein heller Hauttyp (Typ I und II) und ultraviolette (UV) Strahlenexposition das Risiko, an einem malignen Melanom zu erkranken. Die Relevanz der UV-Exposition wird ferner dadurch unterstrichen, dass sich bei den meisten Melanompatienten anamnestisch eine intermittierende Sonnenexposition oder sogar häufige Sonnenbrände eruieren lassen (Miller et al., 2006). Eine intensive, intermittierende UV-Exposition in der Kindheit erhöht die Entwicklung von Nävi in Assoziation mit einem gesteigerten Melanomrisiko (Gilchrest et al., 1999).

Insgesamt hat sich als prognostisch wichtiger Parameter die vertikale Eindringtiefe des Melanoms durchgesetzt. Alexander Breslow erkannte schon 1970, dass sich die Prognose unabhängig vom Alter, Geschlecht und der Lokalisation des Primarius mit zunehmender Eindringtiefe der Läsion verschlechtert. Ein im frühen Stadium entdecktes

Melanom kann in ca. 80 % der Fälle kurativ operativ entfernt werden. Im Gegensatz dazu versagen die derzeit verfügbaren Therapieoptionen bei fortgeschrittenen Melanomen im metastasierten Stadium häufig, weshalb die Prognose mit einer mittleren Überlebenszeit von sechs Monaten schlecht ausfällt. Ein häufig angewandtes adjuvantes Immuntherapeutikum ist Interferon- α , dessen Benefit jedoch noch nicht abschließend geklärt ist. Alternativ kann Interleukin-2 appliziert werden. Vor der Anwendung müssen die geringe Ansprechrate und die toxischen Nebenwirkungen abgewogen werden (Schopfer et al., 2007). Dacarbazin ist derzeit das Chemotherapeutikum der Wahl in der Behandlung fortgeschrittener Melanome. Die Ansprechrate dieser Therapie fällt allerdings mit 15 % gering aus. Ferner verlängert die Dacarbazinbehandlung die mediane Überlebenszeit nicht (Middleton et al., 2000; Jang und Atkins, 2014). Die eingeschränkten Therapieergebnisse und die Tendenz zum invasiven bzw. metastatischen Wachstum der Melanomerkrankung stellen eine Herausforderung in der Dermatologie dar.

Basierend auf neuen Forschungsansätzen finden alternative Behandlungsstrategien zunehmend Anwendung, die nach dem Prinzip der gezielten Therapie (targeted therapy) arbeiten. Maligne Tumore entstehen auf dem Boden dynamischer Genomveränderungen in einem mehrstufigen Prozess (Hanahan und Weinberg, 2000). Primäre Gain-of-function Mutationen wachstumsfördernder Gene, der sogenannten Onkogene, initiieren Neoplasien. Sobald sekundäre genetische Alterationen den tumorsuppressiven Schutzmechanismus durchbrechen, kann das maligne Wachstum nicht mehr verhindert werden. Meist inaktivieren loss-of-function Mutationen die wachstumshemmenden Gene, die sogenannten Tumorsuppressor-Gene. In der Folge stört dies essentielle Signalwege, welche Zellproliferation, -motilität, -differenzierung sowie Interaktionen der Krebszellen mit der stromalen Umgebung oder dem Immunsystem kontrollieren. Eine Reihe von Onkogenen können definierten Tumoren zugeordnet werden (Bastian, 2014). An einem Melanom erkrankte Patienten weisen beispielsweise zu 66 % eine BRAF Mutation auf, diese liegt zu 90 % in einer Punktmutation (V600E) begründet (Davies et al., 2002; Jang und Atkins, 2014). Mittels des 2011 zugelassenen Kinaseinhibitors Vemurafenib können Patienten mit dieser Genveränderung erfolgreich therapiert werden. Die Mehrzahl dieser Patienten, einschließlich derer in einem fortgeschrittenen metastatischen Stadium, sprechen auf die gezielte Chemotherapie an (Jang und Atkins,

2014). Eine weitere onkogene Schlüsselmutation ist in 85 % der Fälle mit dem Uveamelanom assoziiert. Diese Form zählt mit einer 10-Jahres-Überlebensrate von 50 % zu den tödlichsten Melanomformen und ist in den USA der häufigste intraokuläre Tumor. Der Genveränderung liegt eine Punktmutation der Gene GNAQ und GNA11 zugrunde, welche Guaninnucleotid-bindende-Proteine (G-Proteine) der α -Untereinheit $G\alpha_q$ kodieren und in Folge der Mutation konstitutiv den Rezeptor aktivieren (Bastian, 2014).

Zukünftig bietet eine medikamentöse Therapie, die patientenindividuell auf zugrundeliegende Pathomechanismen ausgerichtet ist, die Chance einer Verbesserung des Behandlungserfolgs.

1.2 Bedeutung der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) gehören zu den Sieben-Transmembran Rezeptoren. Diese Sieben-Transmembran Rezeptoren bilden die größte sowie vielseitigste und ubiquitär vorhandene Familie der Membranrezeptoren und stellen gleichzeitig die häufigste Zielstruktur pharmazeutischer Wirkstoffe dar (Pierce, 2002).

Die GPCR verzeichnen als größte Familie der Zelloberflächenmoleküle über 800 Mitglieder und die kodierenden Gene nehmen mehr als 2 % des gesamten humanen Genoms ein. Diese Rezeptorfamilie steuert vielseitige physiologische Schlüsselfunktionen einschließlich der Neurotransmission, Hormon- und Enzymfreisetzung, Immunantworten und die Blutdruckregulation via Muskelkontraktionen (Dorsam und Gutkind, 2007). Außerdem sind GPCR an der Steuerung der Embryogenese, des Gewebeumbaus und -ersatzes, der Angiogenese und des Zellwachstums beteiligt (Lee et al., 2008). Aufgrund der Einbindung der GPCR in zahlreiche Zellregulationsmechanismen ist eine Involvierung in weitverbreitete Erkrankungen naheliegend. So kommt es, dass 50-60 % der gegenwärtigen Medikamente an den GPCR-vermittelten Signalwegen ansetzen (Dorsam und Gutkind, 2007).

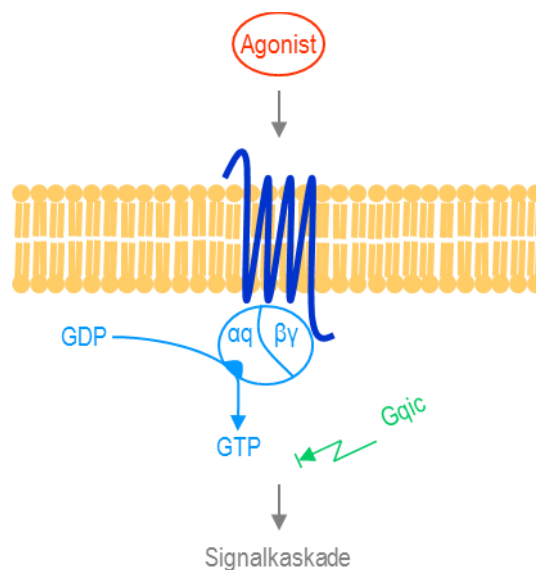


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors der Untereinheit $G\alpha_q$ und die Unterbindung der Signaltransduktion auf intrazellulärer Seite durch Gqic ($G\alpha_q$ -protein inhibitory component).

Die an der Signaltransduktion beteiligten heterotrimeren Guaninnucleotid-bindende-Proteine umfassen drei Untereinheiten α , β und γ (Abbildung 1). Diese unterliegen einer zyklischen In- bzw. Aktivierung. Im Ruhezustand sind die drei Untereinheiten assoziiert und Guanosindiphosphat (GDP) ist an die α -Subeinheit gebunden. Ein extrazelluläres Signal kann in Form eines spezifischen Liganden an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor binden und führt zu einem Austausch des Guanosindiphosphates durch Guanosintriphosphat (GTP). Daraufhin dissoziiert das heterotrimere G-Protein in die GTP-bindende α -Untereinheit und die $\beta\gamma$ -Untereinheit. Beide dissoziierten Untereinheiten können nun nachgeschaltete Signalwege stimulieren und das Signal in das Zellinnere fortleiten. Die α -Untereinheit beinhaltet eine GTPase-Aktivität und terminiert durch Hydrolyse des GTP zu GDP den Signalweg. Die Subeinheiten reassoziieren, so dass der Rezeptor erneut für eine Ligandenbindung bereit ist. Die funktionelle Vielseitigkeit der G-Protein-vermittelten Signalwege beruht auf den zahlreichen Subtypen der G-Proteine mit unterschiedlichen nachgeschalteten Signalwegen (Wettschreck und Offermanns, 2005). Von den bekannten Subtypen, 20 α -, sechs β - und elf γ -Untereinheiten, lassen sich aufgrund der Sequenzhomologie vier Familien klassifizieren. Typischerweise werden in Bezug auf die $G\alpha$ -Untereinheit $G\alpha_s$, $G\alpha_i/G\alpha_o$, $G\alpha_q/G\alpha_{11}$ und

$G\alpha_{12}/G\alpha_{13}$ unterschieden. Der klassische $G\alpha_q$ -Signalweg stimuliert nach Rezeptoraktivierung die Phospholipase $C\beta$, woraufhin Inositoltriphosphat und Diacylglycerol gebildet werden. Inositoltriphosphat triggert die intrazelluläre Calcium-Freisetzung und bedingt in der Folge einen Calcium Influx von extrazellulär. Diacylglycerol rekrutiert die Proteinkinase C an die Zellmembran und aktiviert diese, welche nachfolgend weitere Reaktionen vermittelt (Neves, 2002).

Für die Kommunikation einer jeden Zelle sind GPCR essentiell (Rosenbaum et al., 2009). Dies gilt ebenso für Tumorzellen und es kristallisierte sich heraus, dass GPCR die Tumorgenese verschiedenster Tumore einschließlich des malignen Melanoms beeinflusst (Lee et al., 2008). Wichtige Zellfunktionen wie das Zellwachstum, -überleben und die Differenzierung sowie Zellmigration unterliegen einer GPCR-abhängigen Steuerung. Eine veränderte Expression oder Dysregulation der Rezeptoren bzw. der Liganden befähigt maligne Zellen, verstärkt, invasiv und metastatisch zu wachsen. Bei 20 % aller Krebsarten liegen laut aktuellen Mutationsanalysen die GPCR in mutierter Form vor. Darüber hinaus überexprimieren eine Vielzahl von Tumoren die GPCR. Durch zirkulierende oder lokal hergestellte Liganden kann eine verstärkte Rezeptoraktivierung erfolgen (O`Hayre et al., 2014).

Diverse mitogene Liganden, wie beispielsweise die $G\alpha_q$ -bindenden Mitogene Lyso-phosphatidsäure (LPA) und Endothelin (ET), steigern über ihre spezifische Rezeptoraktivierung das Zellwachstum. In Tumorzellen kann durch folgende Mechanismen das proliferative Signal verstärkt vorliegen. Einerseits kann bei Tumorpatienten ein erhöhtes Plasmalevel an Liganden gemessen werden. So weisen Patienten einer metastatischen Tumorerkrankung einen erhöhten ET-Spiegel auf. Andererseits verstärkt eine Überexpression der Rezeptoren das intrazelluläre Signal. LPA bindet als potentestes Mitogen an den oftmals überexprimierten Rezeptoren und fördert somit das Wachstum der Tumorzellen. Über eine autokrine Rückkopplung stimuliert die LPA-Rezeptorbindung die LPA Freisetzung, woraufhin das Signal zusätzlich verstärkt wird (Dorsam und Gutkind, 2007). In der Folge weisen Tumorzellen häufig eine höhere Proliferationsrate als gesunde Zellen auf.

Die 1986 durch Young et al. gemachte Entdeckung des mas-Onkogens, welches einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor kodiert, verknüpfte zelluläre Transformation und GPCR

erstmalig. Forschungsergebnisse erhärten nun den Verdacht, dass mutierte GPCR onkogenes Potential bergen. Im Hinblick auf die $G\alpha_q$ -Proteine sind die Treibermutationen der Gene GNAQ/11 zu nennen. Diese Mutationen können bei der Mehrzahl der Uvea-melanome und bei ca. 6 % der kutanen Melanome gefunden werden. Neben dem onkogenen Potential besitzen GPCR auch tumorsuppressive Eigenschaften, welche in Folge von Mutationen inaktiviert werden können. Eine Genveränderung des Melanocortin-rezeptors 1, welcher für die Pigmentbildung wichtig ist, steigert beispielsweise das Risiko für die Entstehung eines Melanoms (O`Hayre et al., 2014).

Die größte Schwierigkeit während der Krebsbehandlung besteht in der Therapie der Metastasen, sprich den über Lymph- und Blutwege verteilten malignen Zellen. Mit der zunehmenden Insuffizienz befallener Organe sinkt die Lebensqualität der Patienten und bestimmt maßgeblich die Prognose und das Überleben der Patienten. In diesem Zusammenhang kann beobachtet werden, dass einige Tumore präferentiell in bestimmte Organe metastasieren. Das Metastasierungsmuster geht dabei nicht auf Lagebeziehungen zurück oder folgt der Gefäßsystematik, vielmehr spielen Chemokinrezeptoren eine Rolle. Dabei dirigieren die zu der Familie der GPCR gehörenden Chemokinrezeptoren die Tumorzellen. Der Chemokinrezeptor CXCR4 ist in diesem Zusammenhang von besonderer Bedeutung. Viele Tumorzellen exprimieren den CXCR4 und siedeln sich als Metastase in Organen ab, in welchen der entsprechende chemotaktische Ligand CXCL12/stromal cell-derived factor 1 (SDF-1) gebildet wird. Dies betrifft vor allem Lymphknoten, Lunge, Knochenmark und Leber (Dorsam und Gutkind, 2007; O`Hayre et al., 2014).

Es wird deutlich, dass GPCR-abhängige Signalwege die Tumorgenese in vielerlei Hinsicht beeinflussen und sogar fördern können. Mit der Option, in die Signalwege der GPCR einzugreifen, öffnen sich Möglichkeiten, die zellulären Zusammenhänge wissenschaftlich weiterführend aufzuschlüsseln und schließlich therapeutische Strategien abzuleiten.

1.3 Der spezifische $G\alpha_q$ -Protein-Inhibitor „Gqic“

Substanzen, die selektiv mit spezifischen G-Proteinen interagieren, sind für die Aufklärung der funktionellen Mechanismen GPCR-verschlüsselter Signalwege unverzichtbar. Ferner erscheint diese Substanzgruppe für zukünftige Targets in der Pharmakotherapie vielversprechend.

Im Jahr 2003 konnten Tsukamoto und Mitarbeiter erstmals das zyklische Depsipeptid YM-254890 aus *Chromobacterium* sp. QS3666 isolieren. Die Arbeitsgruppe identifizierte diese Substanz als potenten Plättchenaggregations-Inhibitor. Die Adenosindiphosphat vermittelte Plättchenaggregation während der Blutstillung, via der beiden purinergeren G-Protein-gekoppelten Rezeptoren $P2Y_1$ und $P2Y_{12}$, wurde durch YM-254890 experimentell effektiv gehemmt. Darauf folgende Experimentreihen klärten den Signalweg dahingehend auf, dass YM-254890 selektiv den $G\alpha_q$ -gekoppelten Signalweg über $P2Y_1$ inhibiert, wohingegen der $P2Y_{12}$ gesteuerte $G\alpha_i$ -gekoppelte Signalweg von YM-254890 nicht beeinflusst wird (Taniguchi, 2003). Das zyklische Depsipeptid YM-254890 stellt somit einen selektiven $G\alpha_q$ -Protein-Inhibitor dar. Durch Blockade der GDP-Freisetzung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors wird der GDP/GTP-Austausch der Untereinheit $G\alpha_q$ verhindert, sodass spezifisch der $G\alpha_q$ -Protein gekoppelte Signalweg unterbunden wird (Takasaki et al., 2004; Nishimura et al., 2010). Das seit Jahrzehnten bekannte Depsipeptid FR900359 (Fujioka, 1988), isoliert aus der Pflanze *Ardisia crenata*, ist ein YM-254890 Strukturanalogon. Die Substanz FR900359, hier $G\alpha_q$ -protein inhibitory component (Gqic) genannt, stellt ebenso einen selektiven $G\alpha_{q/11}$ -Inhibitor dar. In den Arbeitsgruppen unter den Leitungen von Frau Prof. König und Frau Prof. Kostenis des Pharmazeutischen Instituts der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn wird aktuell die Substanz Gqic aus der höheren Pflanze *Ardisia crenata* isoliert sowie charakterisiert (Abbildung 2). Experimentelle Befunde der Arbeitsgruppen belegen eine ähnliche Wirksamkeit wie YM-254890. Außerdem legt die chemische Struktur eine Biosynthese durch auf der Pflanze symbiontisch lebende Bakterien nahe. Im Rahmen eines kooperativen Forschungsvorhabens wird dem Labor für Experimentelle Dermatologie die Substanz Gqic freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

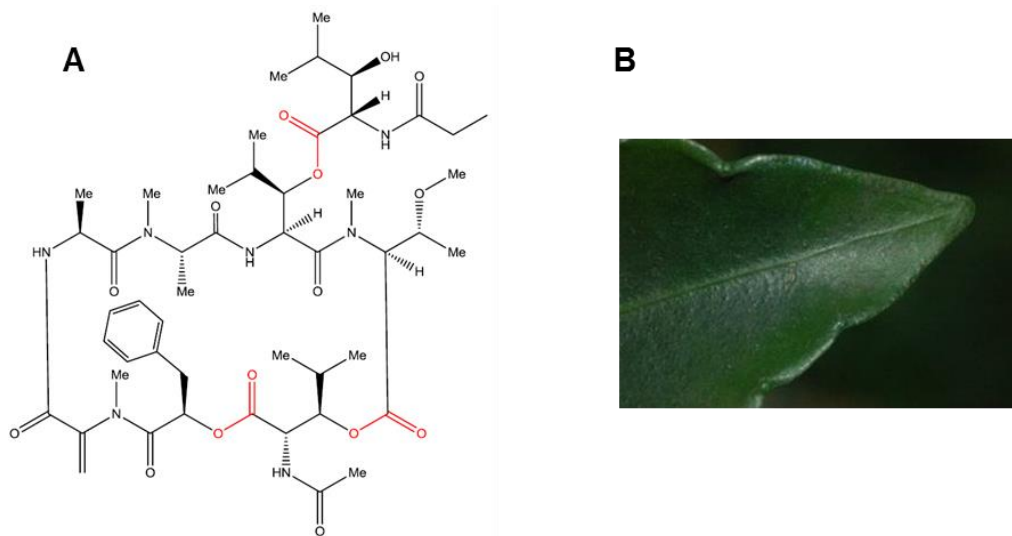


Abbildung 2: A) Peptidstruktur von $G\alpha_q$ -protein inhibitory component (Gqic) (Esterbindungen rot). B) Abbildung eines *Ardisia* Blattes. Beides aus der Arbeitsgruppe von Frau Prof. König zur Verfügung gestelltes Material.

1.4 Endothelin, ein relevanter Ligand in der Melanogenese

Im Jahr 1988 gelang der Arbeitsgruppe unter der Leitung von Yanagisawa die Isolierung sowie Analyse des neu entdeckten vasokonstriktorisches Peptids Endothelin als Sekretionsprodukt von kultivierten aortalen Endothelzellen des Schweins. Das aus 21 Aminosäuren bestehende Peptid ET beinhaltet zwei intramolekulare Disulfidbrücken und existiert in drei Isoformen, ET-1, ET-2 und ET-3 (Inoue, 1989). Die Zuordnung dieser Liganden zu spezifischen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, Endothelinrezeptor-A und -B (ETRA und ETRB), gelang zwei Jahre später (Arai et al., 1990, Sakurai et al., 1990). Mit gleicher Affinität binden die drei Isoformen an den Rezeptor Typ B, wohingegen ET-3 mit niedrigerer Affinität als ET-1 und -2 an den Rezeptor Typ A bindet (Abbildung 3). Das generierte Signal wird über eine Reihe von GPCR mit verschiedenen Untereinheiten weitergeleitet, sodass unter anderem die Phospholipase C β aktiviert, die intrazelluläre Kalziumkonzentration erhöht und auf Transkriptionsebene die Genexpression beeinflusst werden. Die G-Protein Untereinheit $G\alpha_q$ ist als Signalübermittler bei beiden Rezeptortypen A und B vertreten (Kedzierski und Yanagisawa, 2001).

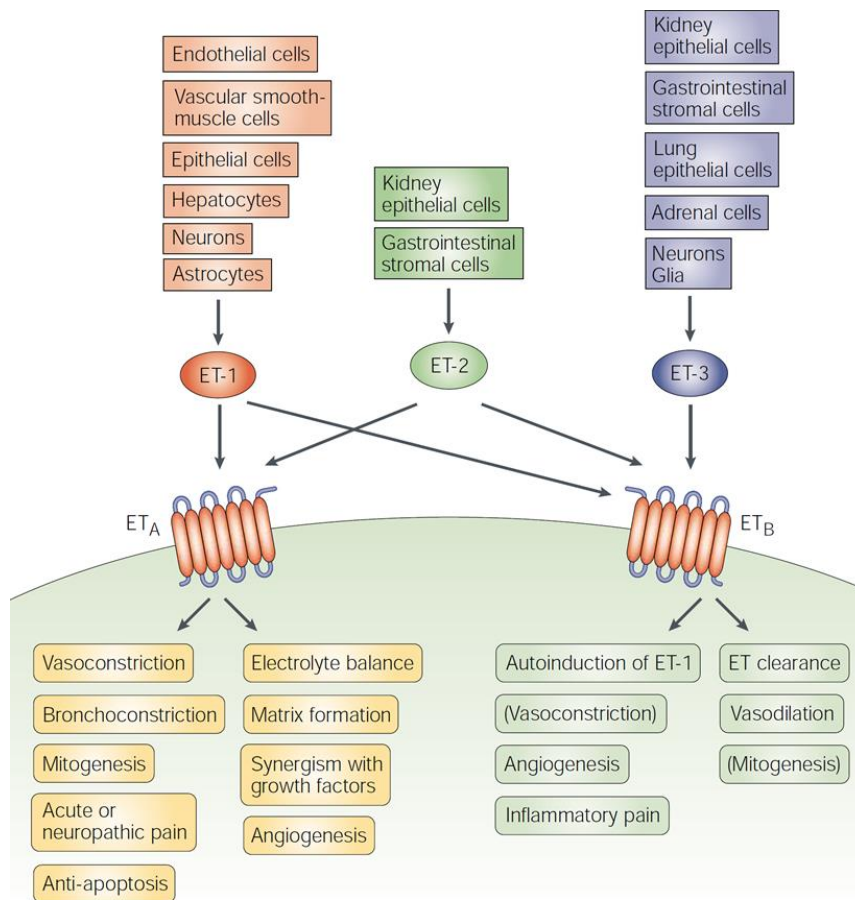


Abbildung 3: Übersicht der zelltypabhängigen Produktion der Endothelin-Isoformen, Zuordnung der Isoformen gemäß der Rezeptoraffinität und Rezeptor-spezifisch vermittelten Effekte, Nelson et al., 2003.

ET ist via ETRA/B in die Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse involviert. Beispielsweise ist ET als Vasokonstriktor in die Aufrechterhaltung des Blutdruckes oder in die embryologische Zellentwicklung involviert. Hierneben spielt ET allerdings auch bei Erkrankungen kardiovaskulärer oder renaler Genese sowie bei der pulmonalen Hypertension eine relevante Rolle. Sogar eine immunogene Komponente wird der ET-Wirkung zugesprochen (Kandalaft et al., 2009).

Eine ET- bzw. Rezeptor-Überexpression oder eine Dysregulation des negativen Feedbackmechanismus führt zu abnormer Zellproliferation, Apoptoseresistenz, Angiogenese und invasiver sowie metastatischer Verteilung von Tumorzellen (Rosano et al., 2013). Entsprechend zeigen zahlreiche Tumorarten eine Überexpression von ET-1. Patienten,

die an einem hepatozellulären Karzinom oder Prostatakarzinom erkrankt sind, weisen erhöhte ET-Plasmaspiegel auf (Kandalajt et al., 2009).

In Bezug auf die Melanozytenentwicklung und Melanogenese ist der ETRB besonders hervorzuheben. Über eine Aktivierung des ETRB wird die Proliferation, Expansion und Migration der Melanozyten stimuliert. Gleichzeitig hemmt dieser Signalweg jedoch die Differenzierung der Melanozyten. Verläuft die Melanozytenentwicklung aufgrund einer Dysfunktion des ET-Systems fehlerhaft, so kann dies zu Melanozyten-abhängigen Erkrankungen wie Morbus Hirschsprung (Aganglionose des Darms) oder Pigmentierungsanomalien führen (Lahav et al., 1999; Lahav, 2005). In malignen Läsionen der Haut wird der ETRB stark überexprimiert, sodass Demunter et al. 2001 auf der Grundlage von Expressionsanalysen den ETRB als Tumorprogressionsmarker des malignen Melanoms identifizierten. Es besteht eine positive Korrelation zwischen invasivem Wachstumsverhalten des Melanoms und der ETRB Expression (Demunter et al., 2001). Aufgrund dieser Zusammenhänge repräsentiert der selektive Antagonist des ETRB, BQ788, eine chemotherapeutische Option in der Tumorbehandlung des malignen Melanoms. Experimentell inhibiert BQ788 das Wachstum der Melanomzelllinien. Häufig geht dies mit einer Zellpigmentierung und Annahme eines dendritischen Phänotyps einher, wodurch Charakteristika von differenzierten, reifen Melanozyten erfüllt werden. Die Applikation von BQ788 reduziert sogar *in vivo* das Tumorstadium bis hin zu einem kompletten Wachstumsarrest (Lahav et al., 1999). Der oral applizierbare duale Rezeptorantagonist Bosentan zeigte nichtsdestotrotz in klinischer Anwendung in der Kombination mit Dacarbazin keine Verlängerung der tumorprogressfreien Zeit (Kefford et al., 2010).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Im pathogenetischen Geschehen des malignen Melanoms besetzen $G\alpha_q$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren im Hinblick auf das Zellwachstum und die Migration eine wichtige Position.

Die experimentelle Anwendung der Substanz Gqic stellt eine potentielle Methode dar, mit dessen Hilfe die zellulären Signalwege besser verstanden und möglicherweise Strategien für therapeutische Zielstrukturen abgeleitet werden können. Methodisch wird

hierzu der selektive $G\alpha_q$ -Protein-Inhibitor Gqic *in vitro* an humanen und murinen Melanomzelllinien getestet. Die Untersuchung der Anwendbarkeit, Verträglichkeit und Wirkungsweise der Substanz Gqic ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Diese basiert auf folgenden Fragestellungen:

- 1) Welcher Effekt stellt sich durch die Gqic-vermittelte $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition auf zell-physiologischer Ebene in humanen und murinen Melanomzellen dar?
- 2) Wie wirkt sich die $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition Endothelin-abhängiger Signalwege (patho-)physiologisch auf Melanomzellen aus?

2. Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Substanzen und Chemikalien

Substanz/Chemikalie	Firma
Agarose	Carl Roth, Deutschland
Aphidicolin, aus <i>Nigrospora sphaerica</i>	Sigma-Aldrich, USA
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, USA
BQ-788	Sigma-Aldrich, USA
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, USA
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Carl Roth, Deutschland
ET-1	Sigma-Aldrich, USA
Ethanol 70 % (V/V)	Otto Fischar, Deutschland
FCS (hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum)	Biochrom, Deutschland
GeneRuler 100 bp Plus	Thermo Fisher Scientific, USA
Gqic	Institut für Pharmazeutische Biologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)- -ethansulfonsäure)	Life Technologies, Gibco/Invitrogen, USA
Isopropanol	Carl Roth, Deutschland

Substanz/Chemikalie	Firma
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, USA
Midori-Green	Nippon Genetics Europe, Deutschland
Natrium-Pyruvat	Life Technologies, Gibco/Invitrogen, USA
Nicht-essentielle Aminosäuren	Life Technologies, Gibco/Invitrogen, USA
Oligo (dT) 18 Primer	Thermo Fisher Scientific, USA
PBS (DBPS) (Dulbecco`s Phosphatgepufferte Salzlösung) [-] Calcium-Chlorid, [-] Magnesium-Chlorid	Life Technologies, Gibco, USA
Penicillin-Streptomycin	Life Technologies, Gibco/Invitrogen, USA
PFA (Paraformaldehyd)	Sigma-Aldrich, USA
RPMI 1640 Medium (Rosewell Park Memorial Institute)	Life Technologies, Gibco/Invitrogen, USA
SDF1 (Stromal cell-derived factor 1) synonym: CXCL12	Peppo Tech, USA
TRIS (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth, Deutschland
Trypanblau-Lösung 0,4 %	Sigma-Aldrich, USA
Trypsin (0,05 % Trypsin EDTA)	Life Technologies, Gibco, USA

2.1.2 Lösungen und Puffersubstanzen

Lösung/Puffer	Inhalt
Bindungspuffer 10-fach	0,1 M Hepes 1,4 M Natriumchlorid 25 mM Kalziumchlorid pH: 7,4 in Aqua dest. lösen
Einfrier-Medium	RPMI 1640 Medium 10 % FCS (20 % FCS) 10 % DMSO
PFA 4 %	8 g reines PFA in 200 mL Wasser mit 200 µL Natriumhydroxid unter Hitzufuhr lösen
RPMI 1640 Medium (komplettes Kulturmedium)	RPMI 1640 Medium ([+] L-Glutamin) 0,1 mM Hepes 0,0003 % β-Mercaptoethanol 10 % FCS (20 % FCS) 1 % Penicillin-Streptomycin 1 % Natrium-Pyruvat 1 % nicht-essentielle Aminosäuren
TBE (TRIS-Borat-EDTA)	89 mM TRIS-Base 89 mM Borsäure 2 mM EDTA-Na ₂ in Aqua dest. lösen
Trypanblau-Lösung	Trypanblau-Lösung 0,4 %, 1/10 in PBS verdünnen

2.1.3 Enzyme

Enzyme	Firma
GoTaq DNA Polymerase inklusive 5-fach Puffer	Promega, USA
Ribonuklease A, aus Rinderpankreas	Sigma Aldrich, USA
SuperScript III Reverse Transkriptase inklusive 5-fach First-Strand Puffer und 0,1 M DTT (Dithiothreitol)	Life Technologies, Invitrogen, USA

2.1.4 Durchflusszytometrische Färbungen

Färbung	Fluorochrom	Verdünnung	Firma
Annexin V	APC	25 µL/1 mL einfachem Bindungspuffer	BD Biosciences, USA (100 Tests)
PI		25 µL/1 mL einfachem Bindungspuffer	Sigma Aldrich, USA (2 mg/mL PBS)

Tabelle 1: Verdünnungen der eingesetzten durchflusszytometrischen Färbungen.

2.1.5 Kits und gebrauchsfertige Reagenzien

Bezeichnung des Kits	Firma
Zell Proliferations-Kit II (XTT)	Roche, Deutschland
Ribonukleinsäure (RNA)-Isolation RNA II	Macherey-Nagel, Deutschland

2.1.6 Verwendete Primer

von Life Technologies, Invitrogen, USA

Zielgen	Primersequenz 5' → 3'
EDNRA	forward TCGGGTTCTATTTCTGTATGCC reverse TGTTTTTGCCACTTCTCGACG
EDNRB	forward GCAAACCGCAGAGATAATGACG reverse GGACACAACCGTGTGATGTATT
GAPDH	forward CCACATCGCTCAGACACCAT reverse GGCAACAATATCCACTTTACCAGAGT
GNA11	forward TCATCGAGTACCCTTTGACG reverse CATGATGGATGTCACGTTCTCA
GNA14	forward GCATCGCCACACCATCATTC reverse ACCAACATCCACCATCCGAAA
GNA15	forward CCAGGACCCCTATAAAGTGACC reverse GCTGAATCGAGCAGGTGGAAT
GNAQ	forward TGGGTCAGGATACTCTGATGAAG reverse TGTGCATGAGCCTTATTGTGC
Gna11	forward ACGAGGTGAAGGAGTCGAAGC reverse CCATCCTGAAGATGATGTTCTCC
Gna14	forward TCACTGCACTCTCTAGAGACC reverse GACATCTTGCTTTGGTCCTGTG
Gnaq	forward AGATCGAGCGGCAGCTGCGC reverse GTTGTGTAGGCAGATAGGAAGG
Mykoplasmen	forward CACCATCTGTCACTCTGTTAACC reverse GGAGCAAACAGGATTAGATAC
Ubiquitin	forward AGGCAAGACCATCACCTTGGACG reverse CCATCACACCCAAGAACAAGCACA

Tabelle 2: Primersequenz der verwendeten Primer.

2.1.7 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Literaturverweis
Ma-Mel-15	Lymphknotenmetastase einer 39 Jahre alten Patientin	Ugurel et al., PLoS One 2007
Ma-Mel-54a	Lymphknotenmetastase einer 41-jährigen Patientin	Ugurel et al., PLoS One 2007
Ma-Mel-65	Lymphknotenmetastase einer 24 Jahre alten Patientin	Ugurel et al., PLoS One 2007
Ma-Mel-102a	Lymphknotenmetastase eines 74 Jahre alten Patienten	Ugurel et al., PLoS One 2007
MZ7-Mel	Milzmetastase einer 26-jährigen Patientin	Lennerz et al., PNAS 2005
SK-MEL-28	Primärtumor eines 51-jährigen Patienten	Carey et al., PNAS 1976
HCmel3	Primärtumor einer HGF-CDK4(R24C) Maus	Landsberg et al., Nature 2012
HCmel12	7,12-Dimethylbezanthrazen induziertes Melanom einer HGF-CDK4(R24C) Maus	Bald et al., Nature 2014

Tabelle 3: Melanomzelllinien mit Angabe des Zellursprunges.

Die verwendeten Zelllinien sind im Hinblick auf fluoreszenzmikroskopische Beobachtungen, insbesondere im Rahmen des Transwell-Migrations-Assays, mit grün fluoreszierendem Protein (GFP) transfektiert und infolgedessen markiert.

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellkultur

Humane Melanomzelllinien werden in 10 % FCS-haltigem, murine Melanomzelllinien in 20 % FCS-haltigem kompletten RPMI-Medium bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zwecks

Passagierung der Zellen, wird das alte Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen, bevor die Zellen flächendeckend für 1-2 Minuten mit Trypsin inkubiert werden (37 °C, 5 % CO₂). Daraufhin runden sich die Zellen ab, verlieren den Kontakt zu ihrem Untergrund und können so in Lösung genommen, ergo passagiert oder für ein Experiment eingesetzt werden.

Zellkulturkontrollen erfolgen mikroskopisch mit AXIO Vert. A1 von Zeiss, Deutschland unter Verwendung der dazugehörigen Mikroskopsoftware Zen 2011.

Mikroskopisch werden Zellen unter Zuhilfenahme der Neubauer-Zählkammer quantifiziert. Hierbei besteht die Möglichkeit, avitale Zellen, dessen perforierte Zellmembran Trypanblaufarbstoff aufnehmen, von vitalen Zellen zu unterscheiden.

ermittelte Zellzahl x Volumen der Zellsuspension x Verdünnungsfaktor x Kammerfaktor (10⁴)
= Zellen / Volumen der Zellsuspension

(Verdünnungsfaktor = Verdünnung der Probe in Trypanblau-Lösung)

Die Zellen werden bei -80 °C in Einfriermedium kryokonserviert. Regelmäßige Mykoplasmentestungen mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) sichern die Kontaminationsfreiheit der Zellen.

2.2.2 Proliferations-Assay

Das Wachstumsverhalten der Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen kann quantitativ evaluiert werden.

Zu diesem Zweck werden die Zellen über einen zeitlichen Rahmen von 72 h in einem Endvolumen von 2 mL in Sechs-Well-Platten kultiviert. Gemäß der Proliferationsgeschwindigkeit der Zelllinien werden 1x10⁵ MZ7-MEL Zellen/Well/mL und entsprechend 1,5x10⁵ HCmel12 Zellen/Well/mL kultiviert. Mit Einsatz des adhärenenten Zellwachstums, in der Regel 6 h später, wird Gqic in 1 mL Medium hinzugefügt. Somit ist das Endvolumen von 2 mL erreicht. Dies erfolgt für jede Zelllinie sowohl in 10 %- als auch in 2 %-igem FCS-haltigem Kulturmedium. Neben der unbehandelten Kontrolle wird Gqic zu den Endkonzentrationen 0,01; 0,1; 1; 10 nM angewandt.

Im Anschluss daran werden die Zellen via Trypsinbehandlung (500 μ L/Well) in Lösung genommen und unter Verwendung der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl quantifiziert.

2.2.3 Kristallviolett-Assay

Eine Auskunft über den Anteil vitaler, adhären wachsender Zellen, ergo über das Zellwachstum, gibt das Kristallviolett-Assay.

In einer 96-Well-Platte werden 1×10^4 Zellen/100 μ L/Well der MZ7-MEL bzw. HCmel12 Zellen eingesetzt. Sobald sich die Zellen mikroskopisch adhären darstellen, werden Gqic in 100 μ L Medium für die Endkonzentrationen 0,01; 0,1; 1; 10 nM addiert und eine unbehandelte Kontrolle angesetzt. Die das Zellwachstum arretierende Substanz Aphidicolin 1 μ g/mL wird außerdem als interne Kontrolle herangezogen. Die Kultivierung der Zellen erfolgt in einem Endvolumen von 200 μ L über 72 h. Entsprechendes wird für beide Zelllinien in 10 % und 2 % FCS beinhaltendem Medium ausgeführt.

Nach Entfernen des Mediums werden die Zellen mit 100 μ L PBS gewaschen. Hierdurch werden gleichzeitig die avitalen, nicht-adhären Zellen entfernt. Die anschließende Zellfixierung mittels 4 %-iger PFA-Lösung (100 μ L) über einen Zeitraum von 10-15 min bei Raumtemperatur wird durch einen Waschschrift mit PBS beendet. Kristallviolett färbt die vitalen Zellen unspezifisch (100 μ L/Well 0,05 %-ige Kristallviolett-Lösung). Nach 30 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur werden die Kristallviolett-Lösung abpipettiert, im Giftabfall entsorgt und die nun violetten Zellen unter fließendem Wasser gereinigt. Mit Hilfe des ODYSSEY Sa Infrarot-Imaging-System, Li-Cor, USA bei 700 nm und Image Studio Software kann die Absorption stellvertretend für die Farbtintensität gemessen und infolgedessen das Zellwachstum sowie Viabilität objektiviert werden.

2.2.4 XTT-Assay

Das Zell Proliferations-Kit II (XTT) ermöglicht eine Quantifizierung der Zellproliferation wie auch der Viabilität. Vitale, metabolisch aktive Zellen wandeln das gelbe Tetrazolium-Salz XTT in oranges Formazan um. Dies ist spektralphotometrisch messbar.

Der Versuch wird für beide Zelllinien in Kulturmedium mit einem FCS Gehalt von 10 % und 2 % angesetzt. Pro Vertiefung einer 96-Well-Platte werden 1×10^4 Zellen/100 μL der MZ7-MEL und HCmel12 Zellen in Kultur genommen. Nach 6 h werden 100 μL Medium oder 100 μL Medium mit Gqic dazugegeben, sodass sich die Endkonzentrationen Gqic 0,01; 0,1; 1; 10 nM in einem Endvolumen von 200 μL ergeben. Auch hier dient die Zellbehandlung mit Aphidicolin 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ als interne Kontrolle.

Die XTT Labeling Mixtur wird aus 5 mL XTT Labeling Reagent und 0,1 mL Electron Coupling Reagent hergestellt. Nach 52 h Inkubation werden pro Vertiefung 100 μL Volumen entnommen und 50 μL der XTT Labeling Mixtur hineinpipetiert. Die XTT-Salzkonzentration entspricht in dem Volumen von 150 μL 0,3 mg/mL. Nach 4 h Zellmetabolismus wird die Absorption mittels Synergy HT Multi-Detektions-Reader (BioTek, USA) bei 490 nm (690 nm Referenzlänge) erstmals gemessen. Die zweite Messung nach 20-stündiger Salzumwandlung korrespondiert mit einer Kulturzeit von 72 h. Die Datenauswertung erfolgt mit der Gen5 Datenanalyse-Software (BioTek, USA).

2.2.5 Transwell-Migrations-Assay

Das Transwell-Migrations-Assay ermöglicht es, das Migrationsverhalten von Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen der Umgebung zu untersuchen. Die obere Membran des Inserts ist für die Zellen permeabel (Abbildung 4). Da in diesem System kein Gradient von Substanzen im Medium vorliegt, sondern die Zellen direkt von z.B. Gqic oder SDF-1 umgeben sind, kann das Migrationsvermögen per se beurteilt werden.

Als Vorbereitung für das Migrations-Assay werden 1×10^5 MZ7-MEL Zellen/Well/mL und $1,5 \times 10^5$ HCmel12 Zellen/Well/mL in Sechs-Well-Platten, 6 h später plus 1 mL Medium bzw. 1 mL Medium mit enthaltenem Gqic hinzu einer Endkonzentrationen 0,01; 0,1; 1; 10 nM in einem Endvolumen von 2 mL pro Well für insgesamt 72 h in Kultur gehalten. Als Kulturmedium dient komplettes Medium mit einem FCS-Gehalt von 10 %.

Im Anschluss werden die Zellen trypsinisiert (500 $\mu\text{L}/\text{Well}$), mit 1 mL Medium in Lösung genommen und die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wird zentrifugiert (1000 rpm 5 Minuten, Multifuge 3L-R, Heraeus, Deutschland) und die Zellen in den entsprechenden

Volumina in 1 %-igem FCS-haltigem Medium resuspendiert, sodass 5×10^4 Zellen/250 μL in die obere Kammer des Transwell-Inserts eingesetzt werden können. Die Inserts mit enthaltener Zellsuspension werden in einer 24-Well-Platte mit 500 μL 1 %-igem FCS-Medium/Well installiert. Das Medium in dem Well ist ohne oder mit Gqic in den Konzentrationen 0,01; 0,1; 1; 10 nM versetzt. Außerdem sind Wells mit SDF-1 konditioniert. Dieses migrationsstimulierende Chemokin dient als interne Experimentkontrolle. Für einen Zeitraum von 24 h migrieren die Zellen im Inkubator (37 °C, 5 % CO_2).

Nach Entfernung des Mediums aus den Inserts und Wells schließt sich ein Waschschrift mit PBS an. Mit Hilfe eines Wattestäbchens werden die Zellen, die nicht migriert sind, vorsichtig von der Sieboberfläche entfernt. Die migrierten Zellen werden mit 4 %-igem PFA (500 μL /Well einer 24-Well-Platte) für 10-15 Minuten fixiert und die Transwell-Inserts dann in PBS überführt. Die Auswertung der Migration erfolgt anhand der fixierten Zellen fluoreszenzmikroskopisch mit DMIRB Leica, Deutschland und Diskus Software von Carl H. Hilgers, Deutschland.

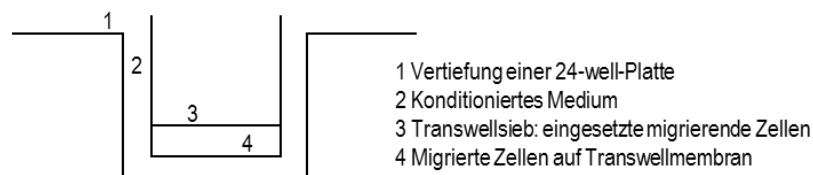


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Transwell-Inserts.

Analoge Experimente werden in Anwesenheit des GPCR Liganden ET-1 durchgeführt. In Vorbereitung des Assays wird jedoch zusätzlich eine separate Kultur ausschließlich mit ET-1 100 nM stimuliert und zu den mit dem $\text{G}\alpha_q$ -Inhibitor behandelten Zellen \pm ET-1 100 nM ergänzt (Endvolumen 2 mL). Weiterhin unterscheidet sich in diesem Versuch, dass in der Versuchsanordnung die Vertiefungen der 24-Well-Platte, welche mit Gqic konditioniert sind, zudem ET-1 100 nM beinhalten.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Ribonukleinsäure Isolation

Die Isolation der Ribonukleinsäure (RNA) aus den Zellpellets der Zellen MZ7-MEL und HCmel12 erfolgt gemäß des Herstellerprotokolls Nucleo-Spin RNA II. Unter Verwendung von 600 μL RA1 Lysis-Puffer und 6 μL β -Mercaptoethanol werden die Zellen aufgebrochen und per Nucleospin-Filtersystem (Zentrifugationen 11,000 xg, 1 min mit Centrifuge 5415R, Eppendorf, Deutschland) RNA und Desoxyribonukleinsäure (DNA) gewonnen. Diese werden in 70 %-igem Ethanol gefällt und nach Zentrifugation im Filter gebunden. Nachfolgend wird das Nukleinsäuregemisch entmineralisiert (Membrane Desalting Buffer) und die DNA verdaut (rDNase). Durch Waschschriffe mit den Puffern des Kits RA2 sowie RA3 inklusive Zentrifugationen wird schließlich reine RNA gewonnen, welche sich in RNase freiem Wasser aufbewahren lässt. Mittels Spektralphotometer wird unter Zuhilfenahme eines Nanodrops (BioTek, USA) die RNA-Konzentration (Synergy HT Multi-Detektions-Reader, Gen5 Datenanalyse-Software) gemessen.

2.3.2 Reverse Transkription

Mittels Reverser Transkriptase ist es möglich, RNA in cDNA zu transkribieren.

Die zu transkribierende RNA (3 μg) wird mit Oligo (dT) 18 Primern (1 μL , 500 ng/ μL) sowie Desoxyribonukleosid-Triphosphaten (dNTP) (10 mM 1 μL) versetzt. RNase freies Wasser wird bis zu einem Volumen von 14 μL des Reaktionsgemisches addiert. Außerdem werden pro Ansatz 4 μL 5-fach Puffer, 1 μL DTT (0,1 M) und 1 μL SuperScript III nach initialen Cycler Schritten gemäß des Herstellerprotokolls (SuperScript III First-Strand Synthesis System) ergänzt. In einem Thermocycler (Mastercycler, Eppendorf, Deutschland) wird die RNA umgesetzt und zuletzt durch Zugabe von RNase freiem Wasser zu einem Endvolumen von 200 μl konzentriert (Lagerung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$).

2.3.3 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion

Die semiquantitative PCR ermöglicht die Amplifizierung des DNA-Materials infolge sich zyklisch wiederholender Temperaturphasen. Initial wird das zu vervielfältigende DNA-Material thermisch in Einzelstränge denaturiert. Zugefügte Primer und freie dNTPs lagern sich komplementär zu den DNA-Einzelsträngen an, welche bei geringerer Temperatur durch eine hitzestabile DNA-Polymerase zu komplementären DNA-Strängen synthetisiert werden.

Pro PCR-Ansatz sind 5 μL DNA-Matrize, je 0,4 μL einer 10 μM Primer-Lösung des forward bzw. reverse Primers; 0,4 μL 10 mM dNTPs; 0,1 μL 0,5 U/ μL GoTaq; 4 μL des 5-fach Puffers und 9,7 μL Wasser im Reaktionsgemisch (insgesamt 20 μL) enthalten. Im Thermocycler wird in 35 Zyklen das DNA-Template amplifiziert. Tabelle 4 verdeutlicht das Protokoll für die Amplifikation. Als Referenzgen (Housekeeping-gene) dient für die humane DNA-Probe GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Hierneben wird als murines Referenzgen Ubiquitin verwandt.

Phase	Temperatur/[°C]	Zeit/[s]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	120	1
Denaturierung	95	30	
Annealing	60	30	35
Extension	72	40	
Finale Extension	72	300	1

Tabelle 4: Protokoll der Polymerase-Kettenreaktion.

Die Lagerung der PCR-Produkte ist bei 4 °C möglich.

Eine anschließende Gelelektrophorese (Elektrophoresekammer Peqlab Biotechnologie, Deutschland) trennt die DNA-Fragmente ihrer Größe entsprechend elektrophoretisch auf und ermöglicht den Vergleich der Produktmengen. Dabei stellt das Gel als dreidimensionales Netzwerk ein Hindernis dar, sodass die kleineren der negativ geladenen DNA-Fragmente eine größere Wanderungsstrecke in Richtung der Kathode pro Zeit zu-

rücklegen. Dies liefert qualitative wie auch quantitative Informationen über die Genaktivität.

In einem 2 %-igem Agarosegel, hergestellt aus unter Hitzezufuhr gelöster Agarose in TBE-Puffer und Midori-Green Färbung (1,5 µL/100 mL Agarose-Lösung), trennen sich die PCR-Produkte bei einer angelegten Spannung von 130 V in Banden auf. Unter UV-Beleuchtung (PhotoDoc-Ilt, Imaging System, UVP, USA) kann die Signalstärke der Banden, ergo die Genaktivität, beurteilt und das Ergebnis fotodokumentiert (Canon, Japan) werden. Eine 100 bp Ladder dient als Größenreferenz.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Durchflusszytometrie

Nach dem Prinzip der Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated cell sorting, FACS) können Zellen gleichzeitig nach ihrer Größe, Granularität und Fluoreszenz analysiert werden. In einem Flüssigkeitsstrom passieren die Zellen einzeln einen Laserstrahl und das gestreute, gebeugte und gebrochene Licht wird elektronisch detektiert.

In Vorbereitung für die Zelltodanalyse werden die Zellen je in 10 %- und 2 %-igem FCS-Medium 72 h ohne und mit Gqic in den Endkonzentrationen 0,01; 0,1; 1; 10 nM in einem Endvolumen von 2 mL/Well kultiviert. Dazu werden 1×10^5 MZ7-MEL Zellen/Well/mL und $1,5 \times 10^5$ HCmel12 Zellen/Well/mL in Sechs-Well-Platten ausgesetzt. Die Gqic-Behandlung erfolgt ca. 6 h später in 1 mL entsprechendem Medium.

Dann werden die Zellen via Trypsinbehandlung (500 µL/Well) in Lösung genommen und inklusive des alten Mediums 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit PBS gewaschen sowie anschließend in FACS-Röhrchen überführt. Nach erneuter Zentrifugation erfolgt die Färbung der Zellen mit 50 µL Annexin V für 10-15 min abgedunkelt bei Raumtemperatur. Der Färbevorgang wird gestoppt, indem die Zellen mit 750 µL einfachem Bindungspuffer gewaschen und danach zentrifugiert werden. Zuletzt wird der Überstand verworfen und das Zellpellet in 200 µL einfachem Bindungspuffer resuspendiert.

Für die Zellzyklusanalyse werden in 10 % FCS beinhaltendem Medium 1×10^5 MZ7-MEL Zellen/Well/mL und $1,5 \times 10^5$ Hcme12 Zellen/Well/mL in Sechs-Well-Platten kultiviert. Sechs Stunden später wird 1 mL Medium bzw. Gqic in 1 mL Medium zu einer Endkonzentration von 10 nM addiert. Die Inkubation der Zellen in einem Endvolumen von 2 mL dauert 72 h.

Daraufhin werden die Zellen trypsinisiert (500 μ L/Well) und mit Medium in Lösung genommen. Durch fünfminütige Zentrifugation (1000 rpm) wird der Überstand von dem Zellpellet abgetrennt und verworfen. Die Zellen werden mit PBS gewaschen und in FACS-Röhrchen überführt. Erneut folgt ein Zentrifugationsschritt, bevor die Zellen durch tropfenweise Zugabe von kaltem 70 %-igem Ethanol unter ständiger Durchmischung für 30 Minuten bei 4 °C fixiert werden. Als nächstes werden die Zellen 5 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert und mit PBS gewaschen. Durch die Zugabe von 50 μ L 100 μ g/mL RNase wird die RNA in 15-20 Minuten bei 37 °C verdaut und der Vorgang durch einen weiteren Waschschrift mit PBS beendet. Im nächsten Schritt findet die Färbung der DNA mit 50 μ L Propidiumiodid (PI) statt (Inkubation 10-15 Minuten unter Abdunkelung bei Raumtemperatur). Schließlich werden die Zellen mit 750 μ L einfachem Bindungspuffer gewaschen. Die Zellen sind in 200 μ L einfachem Bindungspuffer resuspendiert bereit für die Datenmessung.

Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgen mit BD FACSCanto (BD Biosciences, USA) und die Daten werden mittels FlowJo Software (Tree Star, USA) analysiert. Für die Experimente wird stets eine ungefärbte Kontrolle herangezogen.

2.5 Statistische Analyse

Signifikanzberechnungen werden gemäß des Student t-Test und unter Anwendung der SPSS 12 Software durchgeführt (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss der $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition auf Gqic-sensitive humane und murine Melanomzellen

3.1.1 Genexpression der $G\alpha_q$ -Proteine ausgewählter Gqic-sensitiver Zellen

In Tumorzellen sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren häufig überexprimiert und die auto- oder parakrine Aktivierung dieser erfolgt über autonom bzw. von stromalen Zellen der Umgebung hergestellte Agonisten. Gleichermäßen geht aus der Literatur hervor, dass GPCR unter anderem über die Subeinheit $G\alpha_q$ nicht nur in physiologischer Weise an der Steuerung des Zellwachstums beteiligt sind, sondern auch unter pathologischen Bedingungen eine Rolle spielen (Dorsam und Gutkind, 2007).

Zellwachstumsinhibition durch Gqic		
	Ma-Mel-15	+
	Ma-Mel-54a	-
humane	Ma-Mel-65	-
Zelllinien	Ma-Mel-102a	-
	MZ7-MEL	+
	SK-MEL-28	-
murine	HCmel3	-
Zelllinien	HCmel12	+

Tabelle 5: Zellwachstum unter Einfluss von Gqic. Gqic induziert (+) bzw. induziert keine (-) Zellwachstumsinhibition.

Im ersten Schritt gilt es herauszufinden, ob, welche und unter welchen Umständen humane und murine Zellen in ihrem Zellwachstum tatsächlich abhängig von $G\alpha_q$ -Proteinen sind. Dafür werden die Zellen über 72 h in Anwesenheit von Gqic 10 nM kultiviert. Unter normalen Kulturbedingungen reagieren drei von acht Zelllinien spontan sen-

sitiv auf die $G\alpha_q$ -Inhibition. Das Zellwachstum ist durch die Kultivierung mit Gqic im Vergleich zu den unbehandelten Zellen stark reduziert. Von diesen Gqic-sensitiven Zelllinien werden eine humane, MZ7-MEL, und eine murine, HCmel12, Zelllinie in weitergehende Experimente eingeschlossen (siehe Tabelle 5).

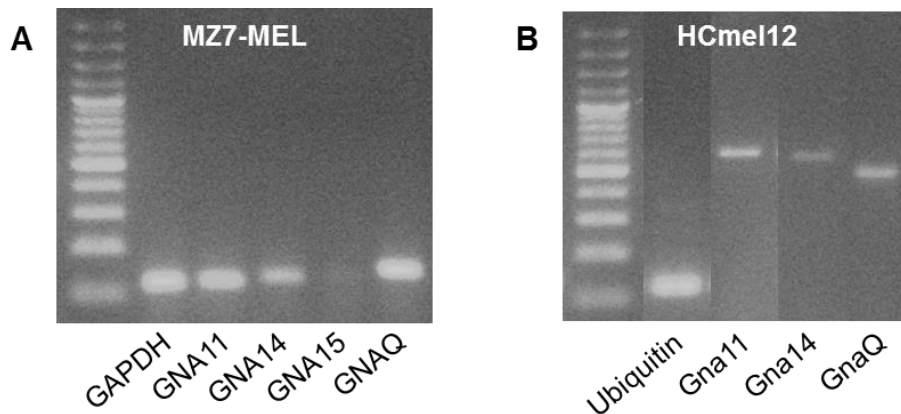


Abbildung 5: Genexpressionsanalyse der G-Protein-kodierenden Gene mittels semi-quantitativer RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketteneraktion). A) MZ7-MEL. B) HCmel12.

Um die Zellwachstumsreduktion unter Einfluss von Gqic kausal auf die Hemmung von $G\alpha_q$ -Proteinen zurückführen zu können, muss die Genexpression dieser Proteine auf den ausgewählten Zelllinien nachgewiesen werden. Die durchgeführte semi-quantitative RT-PCR bestätigt die Genexpression der $G\alpha_q$ -Protein kodierenden Gene. Das Ergebnis wird in Abbildung 5 dargestellt. Die humanen Melanomzellen MZ7-MEL exprimieren die Gene GNA11, GNA14, GNAQ. Für die murinen HCmel12-Zellen wird die Genexpression von Gna11, Gna14, GnaQ experimentell belegt.

3.1.2 Analyse der Zellwachstumshemmung in Abhängigkeit verschiedener Gqic-Konzentrationen und verminderter Serumkonzentrationen

Um das Maß der Zellwachstumshemmung durch Gqic zu quantifizieren sowie eine etwaige konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation zu untersuchen, werden

die Zellen in Sechs-Well-Platten über einen Zeitraum von 72 h in Ab- oder Anwesenheit von Gqic unterschiedlicher Konzentrationen kultiviert und anschließend die Zellzahl ermittelt. Weiterhin wird der Einfluss einer veränderten Medienzusammensetzung, hier vor allem einer reduzierten Serumkonzentration, auf das Zellwachstum untersucht.

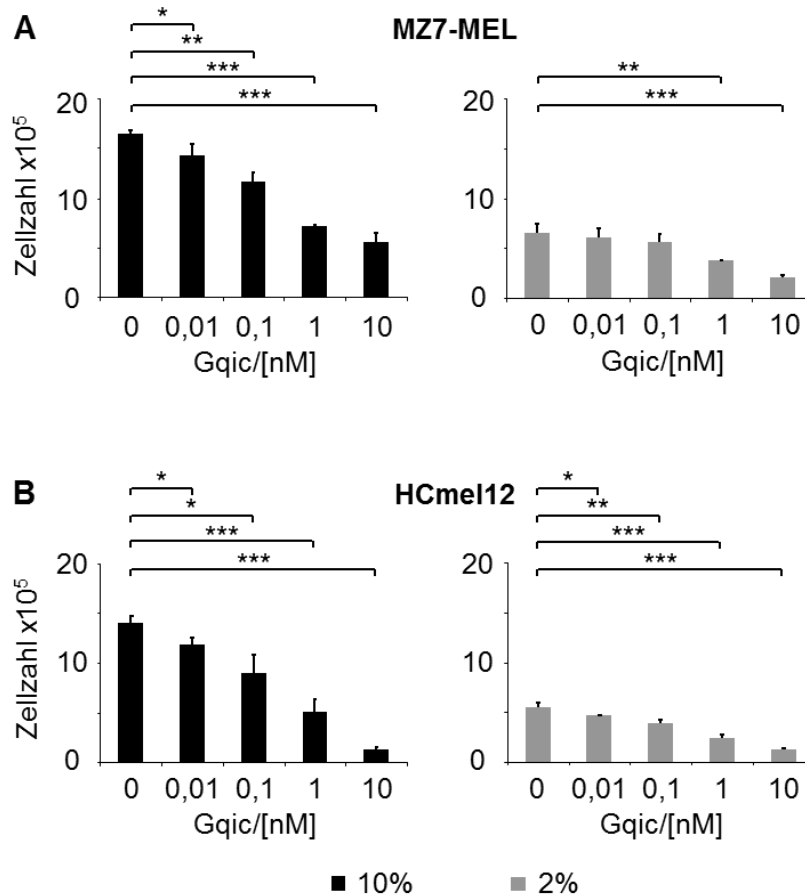


Abbildung 6: Zellwachstum, angegeben als Zellzahl in hunderttausend, nach 72-stündiger Kultivierung \pm Gqic/[nM]. Linke Seite entspricht den Zellzahlen in 10 %, rechte Seite entspricht den Zellzahlen in 2 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum enthaltenem Medium. Abgebildet ist der Mittelwert \pm Standardabweichung eines repräsentativen Ergebnisses aus drei biologischen Replikaten. A) MZ7-MEL. B) HCmel12. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Es lässt sich eine signifikante konzentrationsabhängige Reduktion der Zellzahl durch Gqic beobachten. Abbildung 6 illustriert das Ergebnis eines repräsentativen Versuchs

aus drei biologischen Replikaten. Weitere unabhängig ausgeführte Experimente erbringen vergleichbare Ergebnisse. Für MZ7-MEL zeigt sich im Mittel eine Reduktion der Zellzahl durch die Behandlung mit Gqic 10 nM gegenüber der unbehandelten Kontrolle um $66,16 \% \pm 5,18 \%$ bei der Kultivierung in 10 % FCS haltigem Medium. Hierneben ist eine um $69,08 \% \pm 0,59 \%$ geringere Zellzahl im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle bei der Kultivierung in 2 % FCS haltigem Medium zu verzeichnen. Für HCmel12 lässt sich durch die Behandlung mit Gqic 10 nM bei der Kultivierung in Medium mit einem FCS-Gehalt von 10 % eine um $90,34 \% \pm 1,61 \%$, bei der Kultivierung in Medium mit 2 % FCS-Gehalt eine um $78,36 \% \pm 5,10 \%$ herabgesetzte Zellzahl dokumentieren.

Zellen, die bei geringerer Serumkonzentration im Medium kultiviert werden, proliferieren schwächer als Zellen, die in normalem Medium mit einem FCS-Gehalt von 10 % in Kultur gehalten werden. Nach 72 h Kulturzeit ist die Zellzahl allein durch die verringerte Serumkonzentration (FCS Gehalt 2 %) in der MZ7-MEL Zellkultur um $60,06 \% \pm 5,92 \%$ und in der HCmel12 Zellkultur um $61,09 \% \pm 1,16 \%$ kleiner als die jeweilige Zellzahl der Kontrolle in normalem Medium.

Darüber hinaus objektiviert dieser Versuch das absolute Zellwachstum. Die Zellen einer MZ7-MEL Kultur ausgehend von 1×10^5 Zellen vermehren sich nach 72 h Stunden Kulturzeit in 10 % FCS haltigem Medium zu einer aus $16,40 \times 10^5 \pm 0,30 \times 10^5$ Zellen bestehenden Kultur. In Medium mit einem FCS-Gehalt von 2 % vergrößert sich die Kultur um den Faktor $6,55 \pm 0,85$. Dies entspricht einer Verdopplungszeit von $17,84 \text{ h} \pm 0,12 \text{ h}$ in einer Kultur mit 10 % FCS und $26,55 \text{ h} \pm 1,88 \text{ h}$ in einer Kultur mit 2 % FCS. Die Generationszeit der HCmel12 Zellen beträgt $22,36 \text{ h} \pm 0,56 \text{ h}$. So vermehren sich $1,5 \times 10^5$ Zellen in 72 h zu $13,98 \times 10^5 \pm 0,78 \times 10^5$ Zellen (10 % FCS). Durch verminderte Serumkonzentration verlängert sich die Verdopplungszeit auf $38,75 \text{ h} \pm 2,65 \text{ h}$, da sich nach Einsatz der gleichen Zellzahl die Zahl 72 h später lediglich auf $5,44 \times 10^5 \pm 0,46 \times 10^5$ vergrößert.

Auf Grundlage dieser Versuchsreihe kann gezeigt werden, dass die Substanz Gqic das Zellwachstum in den getesteten Melanomzelllinien effektiv hemmt.

3.1.3 Kolorimetrische Analyse der Zellwachstumsinhibition unter Einfluss verschiedener Gqic-Konzentrationen

Eine weitere Methode, um das Zellwachstum unter verschiedenen Serum- und Gqic-Konzentrationen zu messen, ist die Färbung der vitalen, adhären wachsenden Zellen mit Kristallviolett. Die Farbintensität nimmt mit steigender Zellzahl zu.

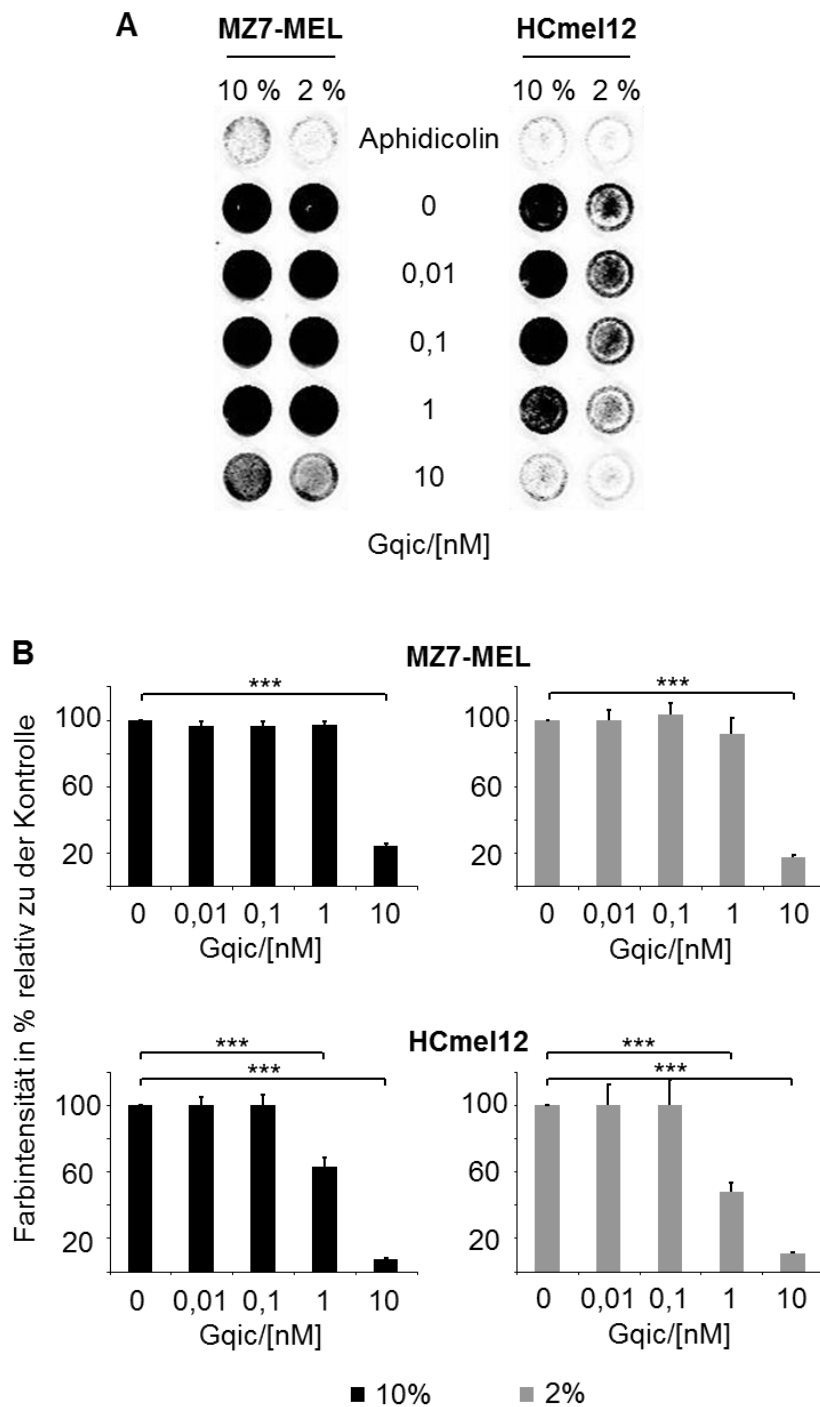


Abbildung 7: Kristallviolett-Färbung nach Kultur \pm Gqic/[nM] in 10 % (links) und 2 % (rechts) hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum haltigem Medium über 72 h. A) Abbildung eines gescannten repräsentativen Experiments. Die linke Seite veranschaulicht das Ergebnis der MZ7-MEL, die rechte Seite das der HCmel-12 Zellen. B) Grafik der Farbintensitäten in % relativ zu der Kontrolle stellvertretend für die Anzahl der Zellen des Zellrasens (Zellwachstum). Mittelwert \pm Standardabweichung eines repräsentativen Versuches mit drei biologischen Replikaten. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Abbildung 7 stellt das Ergebnis je eines repräsentativen Versuchs der Zelllinien MZ7-MEL und HCmel12 dar. Zwei weitere Experimente erzielten vergleichbare Ergebnisse. Die gemessene Farbintensität der MZ7-MEL-Zellkultur unter Gqic-Behandlung 10 nM in Kultur mit einem FCS-Gehalt von 10 % ist um $75,64 \% \pm 1,36 \%$ und in Kultur mit 2 % FCS-Gehalt um $82,70 \% \pm 1,62 \%$ geringer als die Farbintensität der unbehandelten Kontrolle. In Kultur mit 10 % FCS-Gehalt zeigen die HCmel12 Zellen bei der Behandlung mit Gqic 1 nM eine Reduktion der Farbintensität um $36,84 \% \pm 5,49 \%$ und bei Gqic 10 nM um $92,68 \% \pm 0,68 \%$. Bei verringerter Serumkonzentration, 2 % FCS-Gehalt, ist die Farbintensität bei 1 nM Gqic-behandelten HCmel12 Zellen um $52,32 \% \pm 5,19 \%$ und bei 10 nM um $89,46 \% \pm 0,91 \%$ herabgesetzt. Somit kann in diesem Versuch ein Zellwachstumsunterschied gegenüber den jeweiligen Kontrollen für MZ7-MEL lediglich in der Kulturprobe, die mit Gqic 10 nM behandelt wird, für HCmel12 in den Proben, die mit Gqic 1 nM und 10 nM behandelt werden, ausgemacht werden.

Die mit dem Zellzyklus-Inhibitor Aphidicolin behandelten Zellen zeigen gegenüber der unbehandelten Kontrolle kein Zellwachstum.

Auch hier beeinflusst die Serumkonzentration das Zellwachstum. Ohne Einfluss von Gqic ist bei verminderter Serumkonzentration (2 % FCS) die Farbintensität, ergo das Zellwachstum, im Vergleich mit der Kultur unter Normalbedingungender MZ7-MEL Zellen um $23,18 \% \pm 4,04 \%$ und der HCmel12 Zellen um $68,63 \% \pm 2,97 \%$ erniedrigt.

3.1.4 Einfluss von Gqic auf Zellviabilität und Zellmetabolismus

Zur weiteren Charakterisierung der Zellproliferation und vordergründig zur Beurteilung der metabolischen Zellaktivität unter Gqic-Behandlung dient das XTT-Zellproliferations-Assay. Das Tetrazolium-Salz XTT wird in oranges Formazan durch die Zellen metabolisiert und die zunehmend orange Farbe kann spektralphotometrisch quantifiziert werden. Dies liefert Informationen über die Zellviabilität, Proliferation und den Metabolismus.

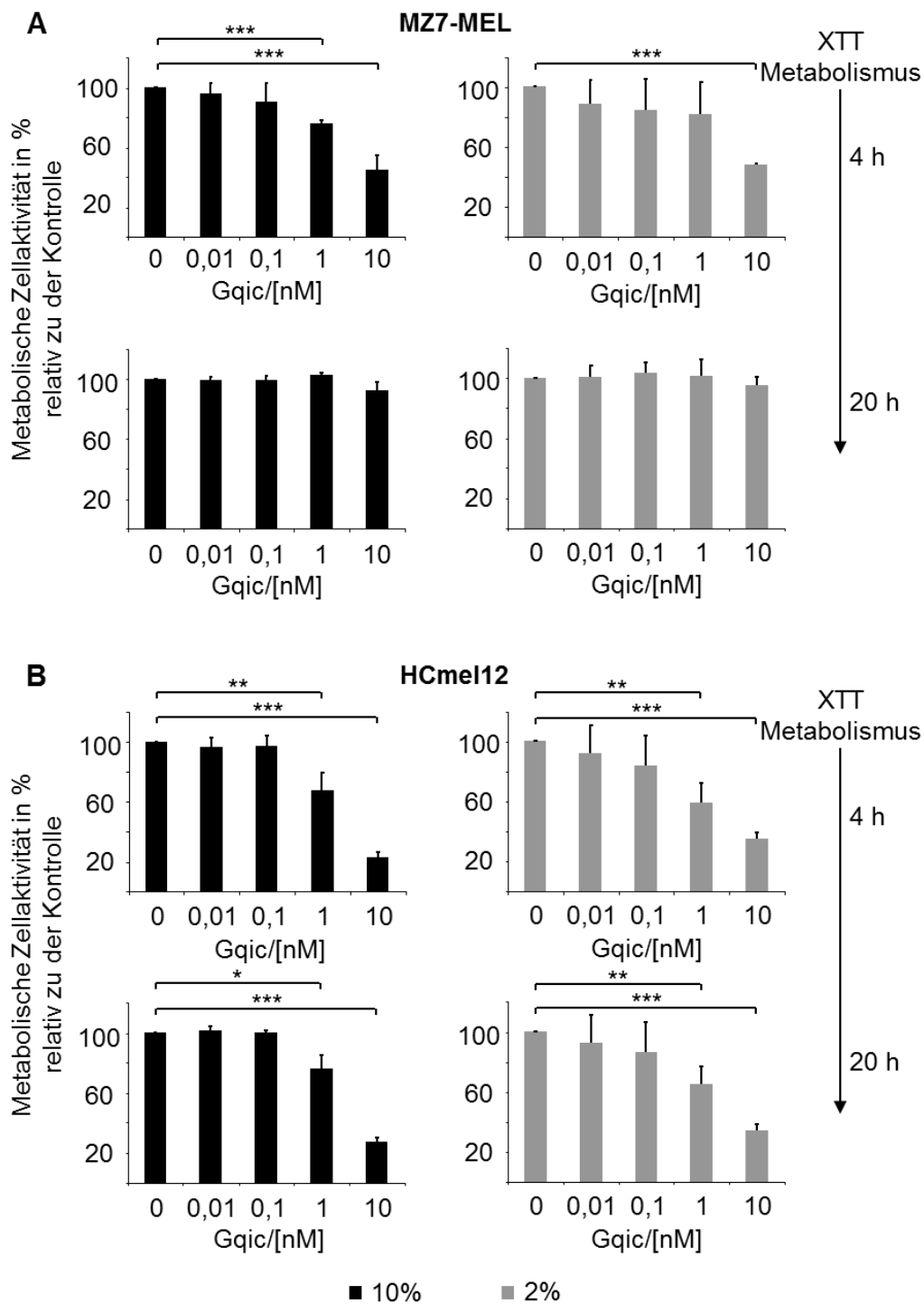


Abbildung 8: Metabolische Zellaktivität in % relativ zu der unbehandelten Kontrolle. Der Zeitpunkt 20 h nach XTT-Salzzugabe korrespondiert mit der Kulturzeit von 72 h. Kultivierung in 10 % (links) und 2 % (rechts) hitzeinaktivierten fetalen Kälberserum haltigem Medium \pm Gqic/[nM]. Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen \pm Standardabweichung. A) MZ7-MEL. B) HCmel12. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

Die Ergebnisse aus drei Versuchen zeigen, dass bei MZ7-MEL (Abbildung 8 A) sowohl in der 10 % als auch in der 2 % FCS-haltigen Kultur der zu einem Zeitpunkt vier Stunden nach XTT-Salzzugabe (Kulturzeit 56 h) zu messende metabolische Unterschied zwischen un- und Gqic-behandelten Zellen sich 16 h später (entsprechend einer Kulturzeit von 72 h) aufhebt. Durch $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition (Gqic 10 nM) zeigen die behandelten im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nach vier Stunden Salzmetabolismus in einer Kultur mit 10 % FCS-Gehalt eine um $54,97 \% \pm 10,12 \%$ und in einer Kultur mit 2 % FCS-Gehalt eine um $51,77 \% \pm 0,78 \%$ geringere metabolische Zellaktivität. Zu einer Kulturzeit nach 72 h (20 h post Salzzugabe) ist die metabolische Aktivität der Zellen nahezu unabhängig von Gqic. Verglichen mit den unbehandelten Zellen ist die metabolische Zellaktivität durch Gqic 10 nM einer Kultur unter Normalbedingungen (10 % FCS) um $7,33 \% \pm 4,93 \%$ und bei reduzierter Serumkonzentration (2 % FCS) um $4,57 \% \pm 5,33 \%$ erniedrigt.

Hingegen geht aus den Untersuchungen der HCmel12 Zellen (Abbildung 8 B) in drei Versuchsansätzen hervor, dass die metabolische Zellaktivität abhängig von der Gqic-Konzentration herabgesetzt wird. Nach vierstündiger Salzumsetzung weisen die mit Gqic 1 nM behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine um $32,35 \% \pm 11,28 \%$ reduzierte Zellaktivität in einer Kultur mit 10 % FCS-Gehalt auf. Bei reduzierter Serumkonzentration (2 % FCS) verringert sich die Zellaktivität durch den $G\alpha_q$ -Inhibitor um $40,74 \% \pm 12,90 \%$. Durch höhere Gqic-Konzentrationen (10 nM) wird die metabolische Zellaktivität in Kultur unter Normalbedingungen (10 % FCS) um $77,08 \% \pm 3,55 \%$ und bei verminderter Serumkonzentration (2 % FCS) um $65,21 \% \pm 4,27 \%$ verringert. Entsprechende Abstufungen der metabolischen Zellaktivität durch Gqic lassen sich 20 h nach XTT-Salzzugabe (Kulturzeit 72 h) messen. Unter normalen Kulturbedingungen (10 % FCS) reduziert Gqic in der Konzentration 1 nM die metabolische Zellaktivität um $23,91 \% \pm 9,00 \%$ und in einer Konzentration von 10 nM um $73,03 \% \pm 2,64 \%$. In einer Kultur mit einem Serumgehalt von 2 % FCS wird der Zellmetabolismus durch Gqic um $34,51 \% \pm 11,36 \%$ (Gqic 1 nM) bzw. um $65,53 \% \pm 3,65 \%$ (Gqic 10 nM) erniedrigt. Die unterschiedlichen Ergebnisse, mit Blick auf den Zellmetabolismus bzw. Viabilität und Proliferation durch Gqic, legen den Schluss nahe, dass die murine Zelllinie sensibler auf eine $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition reagiert als die humane Zelllinie.

3.2 Kausale Analyse der Zellwachstumshemmung

3.2.1 Anteil der apoptotischen Zellen unter Einwirkung von Gqic

Es gilt, den kausalen Mechanismus der Zellwachstumshemmung via $G\alpha_q$ -Inhibition zu erarbeiten sowie einen eventuell stark gesteigerten Zelltod zu erfassen. Zu diesem Zweck werden im Rahmen einer durchflusszytometrischen Messung, wie in 2.4.1 beschrieben, Zellen mittels Annexin V Färbung analysiert.

Der programmierte Zelltod ist durch spezifische morphologische Veränderungen charakterisiert. Apoptotische Zellen translozieren Phosphatidylserin von der inneren an die äußere Zellmembran. Annexin V bindet mit hoher Affinität an Phosphatidylserin und kann infolge des an der Zelloberfläche exponierten Phospholipids apoptotische Zellen markieren. Diese werden in der FACS-Analyse detektiert. Die nachfolgenden Abbildungen 9 und 10 illustrieren jeweils die erhobenen Daten eines repräsentativen Versuchs der MZ7-MEL und HCmel12 Zellen. Weitere unabhängige Experimente bestätigen diese Ergebnisse.

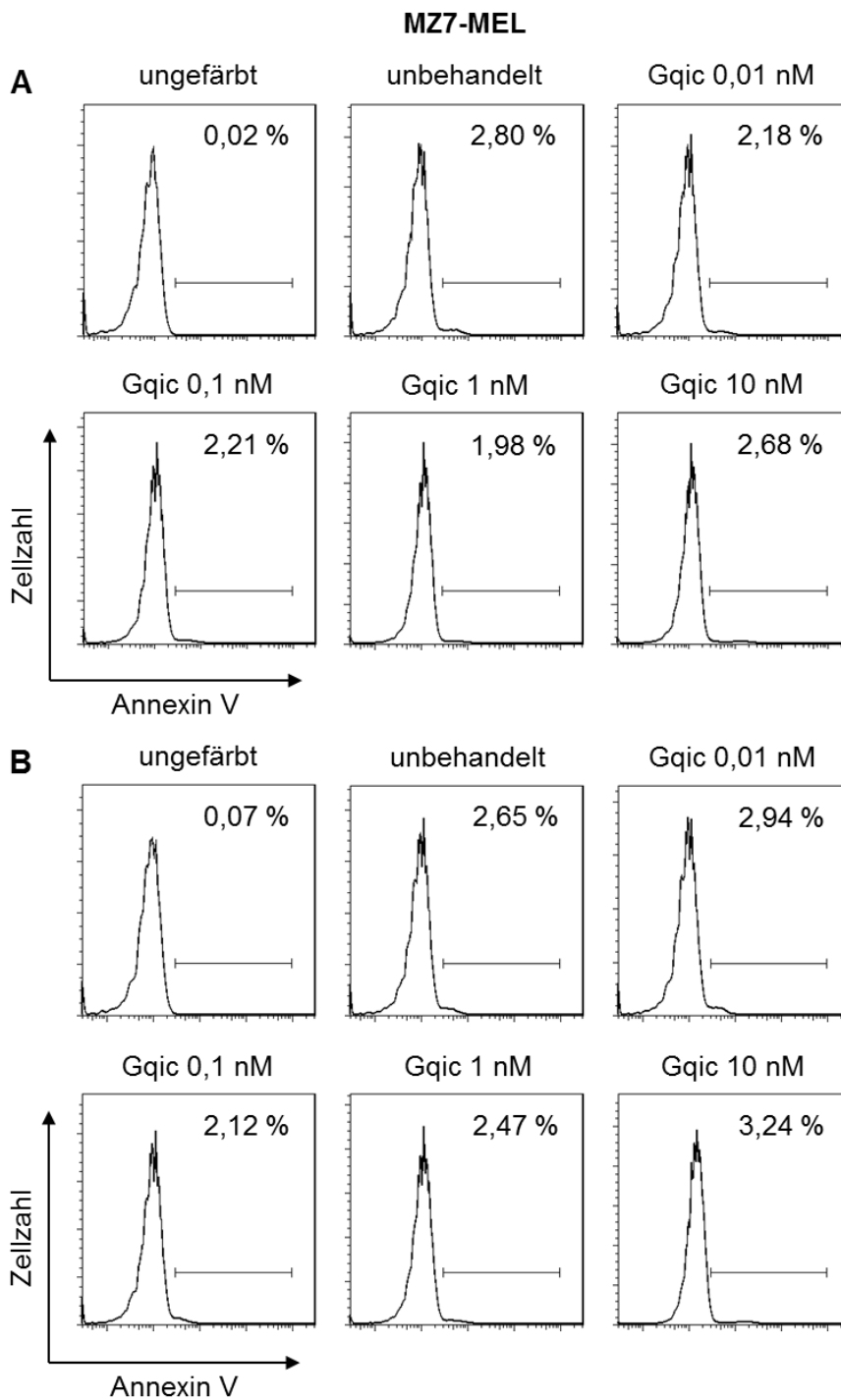


Abbildung 9: Abbildung einer repräsentativen durchflusszytometrischen Analyse apoptotischer Zellen mittels Annexin V Färbung nach \pm Gqic/[nM] Behandlung über 72 h. A) MZ7-MEL Zellkultur in 10 % hitzeinaktivierten fetalen Kälberserum (FCS) haltigem Medium. B) MZ7-MEL Zellenkultur in 2 % FCS beinhaltendem Medium.

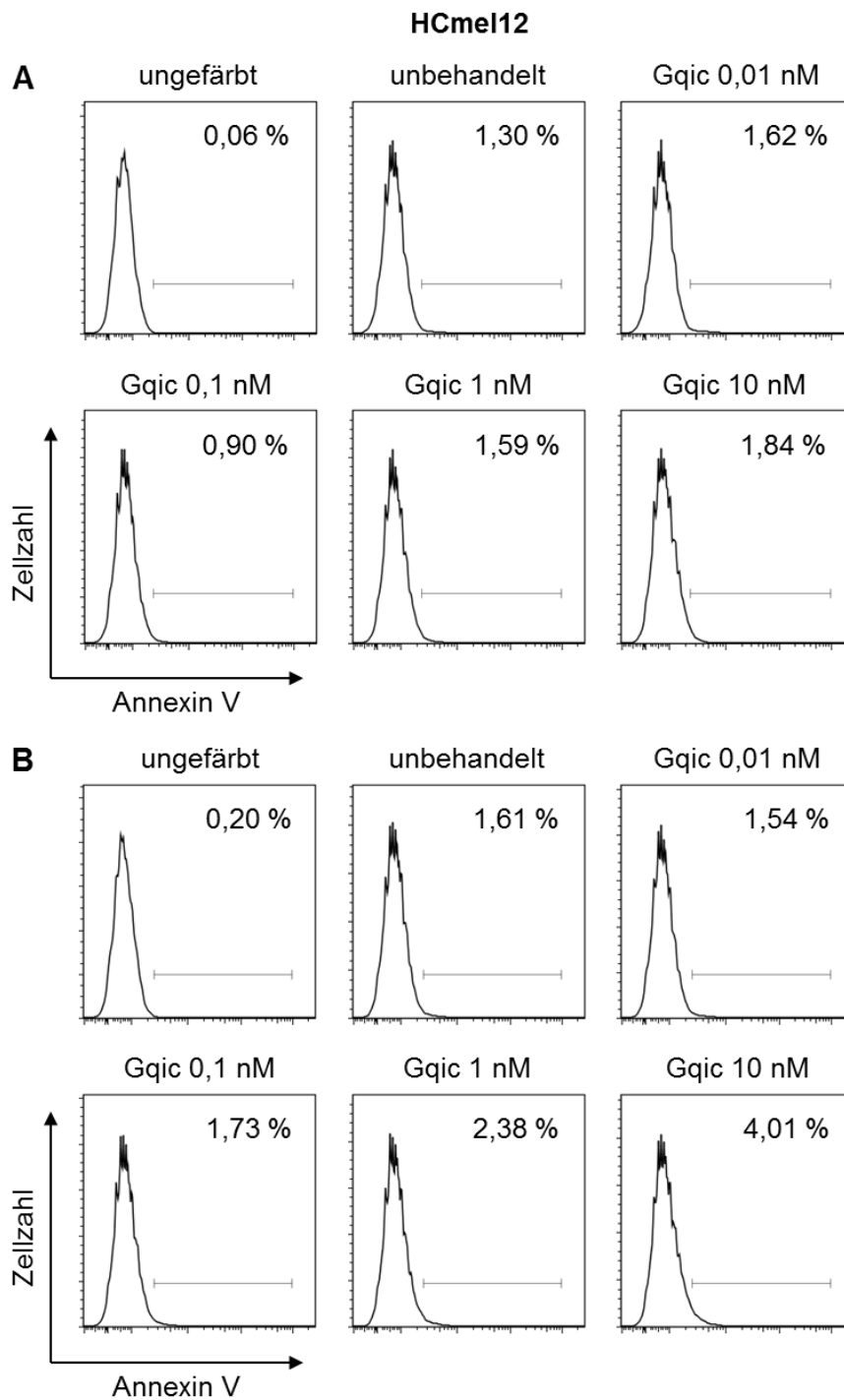


Abbildung 10: Abbildung einer repräsentativen durchflusszytometrischen Analyse apoptotischer Zellen mittels Annexin V Färbung nach \pm Gqic/[nM] Behandlung über 72 h. A) HCmel12 Zellkultur in 10 % hitzeinaktivierten fetalen Kälberserum (FCS) haltigem Medium kultiviert. B) HCmel12 Zellkultur in 2 % FCS beinhaltendem Medium.

Infolge dieser Experimente kann für die Zelllinie MZ7-MEL belegt werden, dass die $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition via Gqic keinen erhöhten Anteil apoptotischer Zellen zur Folge hat. Unbehandelte Zellen in 10 % FCS-haltiger Kultur sind zu 2,80 % Annexin V positiv und damit apoptotisch. Die mit Gqic 10 nM behandelten Zellen zeigen einen vergleichbaren Wert von 2,68 % Annexin V positiven Zellen. In 2 % FCS-haltiger Kultur ähneln sich ebenso die Werte der un- und behandelten MZ7-MEL Zellen. Unbehandelte Zellen sind zu 2,65 % und mit Gqic 10 nM behandelte Zellen zu 3,24 % Annexin V positiv (siehe Abbildung 9).

Die Tumorzellen HCmel12 weisen ähnliche prozentuale Verteilungen der Annexin V positiven Zellen auf (siehe Abbildung 10). So sind in 10 % FCS-haltigem Medium 1,30 % unbehandelte und 1,84 % mit Gqic 10 nM behandelte Zellen apoptotisch. In 2 % FCS-haltiger Kultur sind 1,61 % der unbehandelten Zellen Annexin V positiv. Durch eine Zellbehandlung mit Gqic 10 nM steigt der Wert auf 4,01 % Annexin V positive Zellen. Dieser Anstieg steht jedoch nicht in Relation zu dem Ausmaß der Zellwachstumshemmung.

Sowohl für die humane als auch für die murine Zelllinie kann festgehalten werden, dass die Zellen, welche mit Gqic behandelt werden, gegenüber den unbehandelten Zellen keinen erhöhten Anteil apoptotischer Zellen aufweisen. Infolgedessen kann das Gqic-induzierte stark reduzierte Zellwachstum nicht durch einen erhöhten Anteil apoptotischer Zellen erklärt werden.

3.2.2 Bestimmung der Zellzyklusphasen von Gqic-behandelten Zellen

Eine weitere Ursache der Zellwachstumshemmung durch $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition kann in Zellzyklusphasenvarianten begründet liegen. Mit dem Ziel, sich diesem potentiell kausalen Mechanismus zu nähern, wird der DNA-Gehalt der Zellen durchflusszytometrisch gemessen. Der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid interkaliert stöchiometrisch mit doppelsträngigen Nukleinsäuren bzw. markiert spezifisch DNA, sofern RNA durch RNase destruiert wird. Das gemessene PI-Fluoreszenzsignal korreliert daher mit dem DNA Gehalt der Zelle. Aufgrund dessen kann die Zelle einer der Zyklusphasen G1, S oder G2 zugeordnet werden und das durchflusszytometrisch gewonnene Histogramm erlaubt Rückschlüsse auf die Verteilung der Zellzyklusphasen in einer Kultur. Verglichen

werden jeweils die unbehandelten Zellen mit behandelten Zellen (Gqic 10 nM) von MZ7-MEL und HCmel12 in Kultur unter Normalbedingungen (10 % FCS-Gehalt). Wie in 2.4.1 beschrieben wird die FACS-Analyse durchgeführt und es lässt sich in drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten folgendes beobachten.

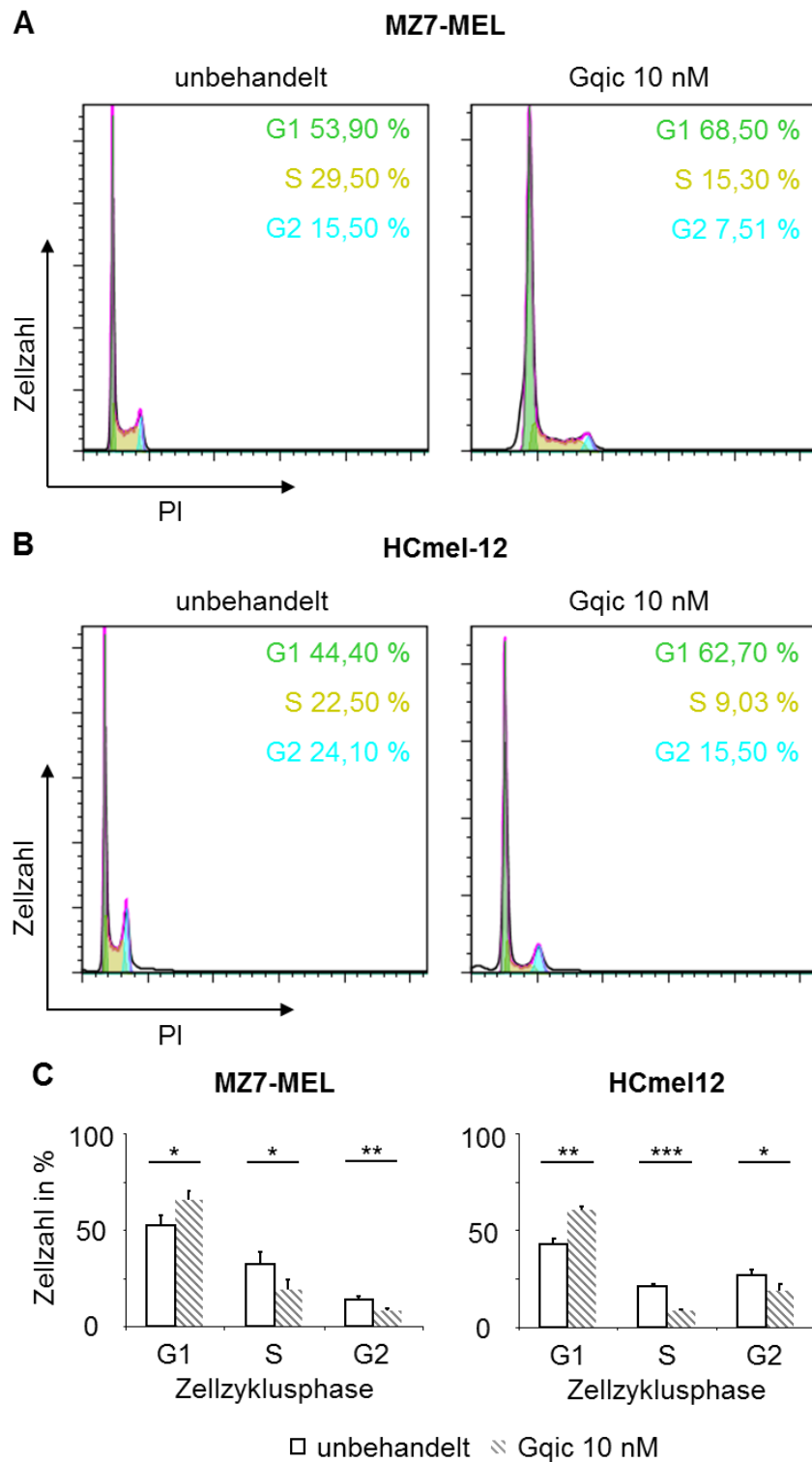


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Zellzyklusphasenanalyse mittels Propidium-iodid-DNA-Färbung. Kultur 72 h ± Gqic 10 nM in Medium mit 10 % hitzeinaktivierten fetalen Kälberserum. A) Repräsentatives Ergebnis MZ7-MEL. B) Repräsentatives Ergebnis HCmel12. C) Darstellung des Mittelwertes ± Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.

In der Abbildung 11 A und C sind die Messdaten der Untersuchung der humanen Zelllinie verdeutlicht. Durchschnittlich befinden sich $52,17\% \pm 5,22\%$ der unbehandelten MZ7-MEL Zellen in der G1 Phase mit einfachem Chromosomensatz. Die Zelle bereitet sich auf die darauffolgende S-Phase vor. $32,33\% \pm 6,16\%$ der Zellen weisen einen der S-Phase entsprechenden DNA-Gehalt auf und sind somit im Prozess der Replikation. Ist das Genom vollständig repliziert, befinden sich die Zellen in der G2-Phase. Dies trifft hier für $14,00\% \pm 1,50\%$ der unbehandelten Zellen zu. Eine $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition durch Gqic hebt den Wert der MZ7-MEL Zellen in der G1-Phase auf durchschnittliche $65,67\% \pm 4,82\%$ an. Der prozentuale Anteil der Zellen, die sich in der S- bzw. G1-Phase befinden, verringert sich auf die Werte $19,17\% \pm 5,22\%$ (S) und $8,03\% \pm 1,60\%$ (G2).

Analoge Beobachtungen, verdeutlicht in Abbildung 11 B und C, können für HCmel12 verzeichnet werden. Unbehandelt sind die Zellen zu $42,63\% \pm 3,15\%$ in der G1-, $21,07\% \pm 1,29\%$ in der S- und $26,77\% \pm 2,99\%$ in der G2-Phase. Durch den Einfluss von Gqic 10 nM befinden sich $60,33\% \pm 2,22\%$ der Zellen in der G1-Phase. Für den Anteil der in der S-Phase befindlichen Zellen verändert sich der Wert auf $8,53\% \pm 0,85\%$. Ferner befinden sich nur noch $18,40\% \pm 3,80\%$ der Zellen in der G2-Phase.

3.3 Zellmorphologie und Migration im Transwell unter Einfluss von Gqic

3.3.1 Veränderte Zellpigmentierung und Zellmorphologie durch Gqic

Nebenbefundlich kann in der Lichtmikroskopie und anhand von Zellpellets beobachtet werden, dass Gqic konzentrationsabhängig eine Zellpigmentierung und morphologische Veränderung induziert. Je höher die Konzentration des $G\alpha_q$ -Protein-Inhibitors, desto stärker ist die Zellpigmentierung. Die Pigmentierungstendenz ist unbeeinflusst von dem Serumgehalt.

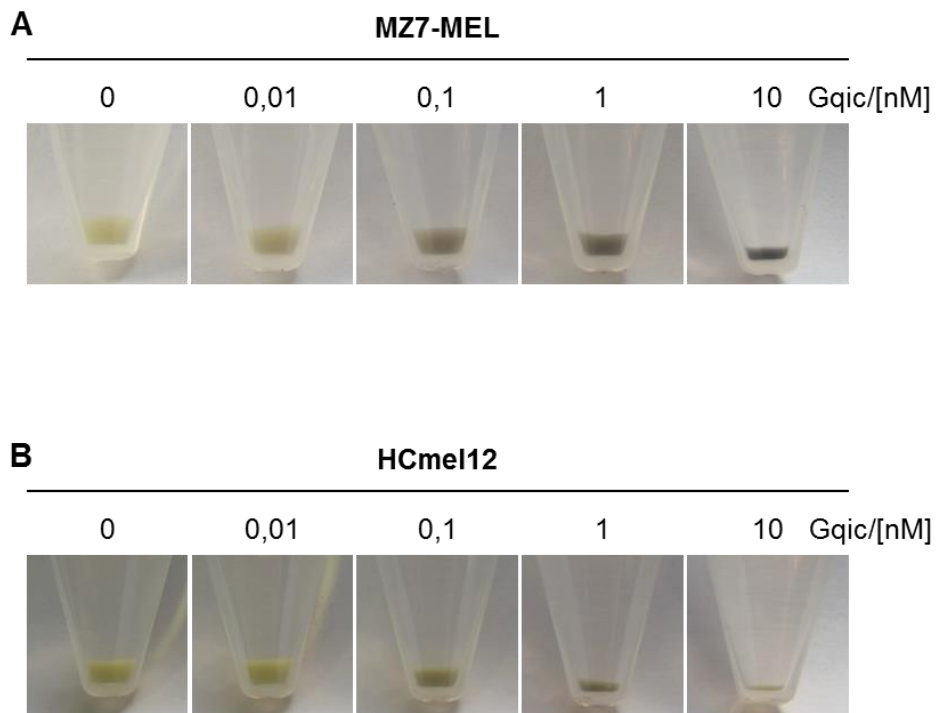


Abbildung 12: Exemplarische Fotodokumentation der konzentrationsabhängigen Zellpigmentierung nach 72 h Zellkultur in 10 % hitzeinaktivierten fetalen Kälberserum enthaltendem Medium \pm Gqic/[nM]. A) MZ7-MEL. B) HCmel12.

Für beide untersuchten Zelllinien (siehe Abbildung 12) lässt sich nachweisen, dass durch die Behandlung mit Gqic 0,1 nM eine leichte, mit Gqic 1 nM eine stärkere und mit Gqic 10 nM eine tiefschwarze Zellpigmentierung anhand der Zellpellets ausgemacht werden kann. Überdies bestätigen die unterschiedlichen Größen der Pellets die zuvor genannte Beobachtung der Zellwachstumsinhibition durch Gqic.

MZ7-MEL

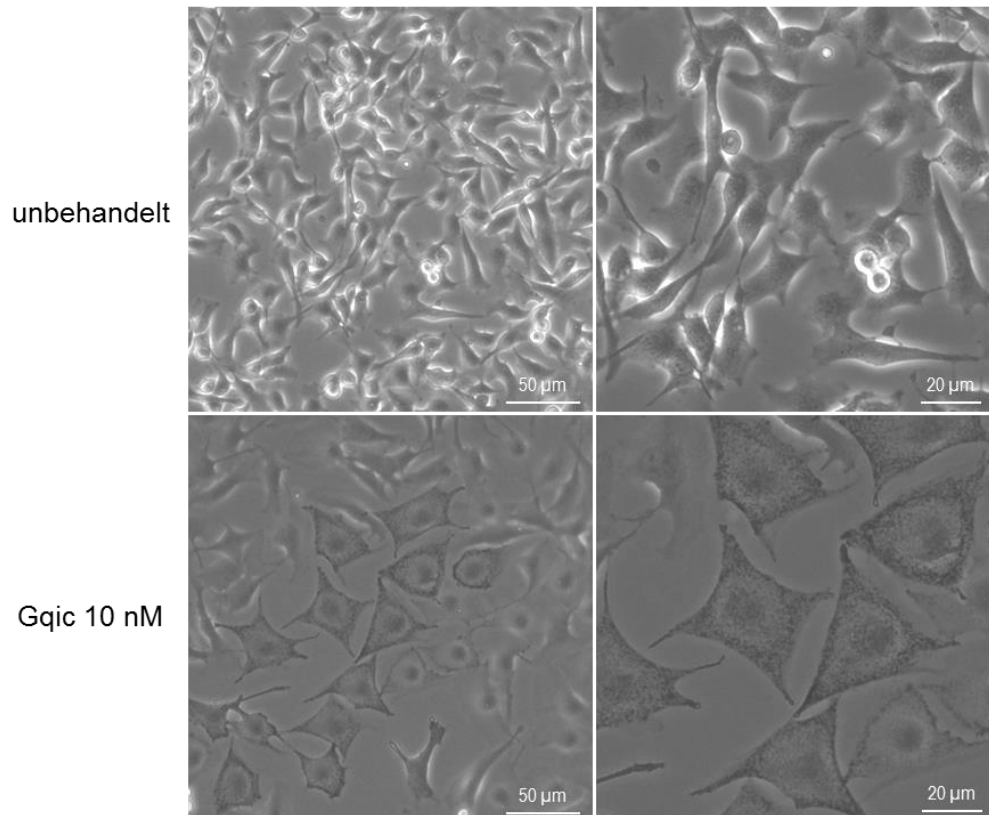


Abbildung 13: Mikroskopische Aufnahmen der un- sowie Gqic-behandelten (10 nM) MZ7-MEL Zellen nach 72-stündiger Kulturzeit in 10 % hitzeinaktivierten fetalen Kälberserum enthaltendem Medium. Linksseitig 10-fache (Maßstab 50 µm), rechtsseitig 20-fache (Maßstab 20 µm) Vergrößerung.

HCmel12

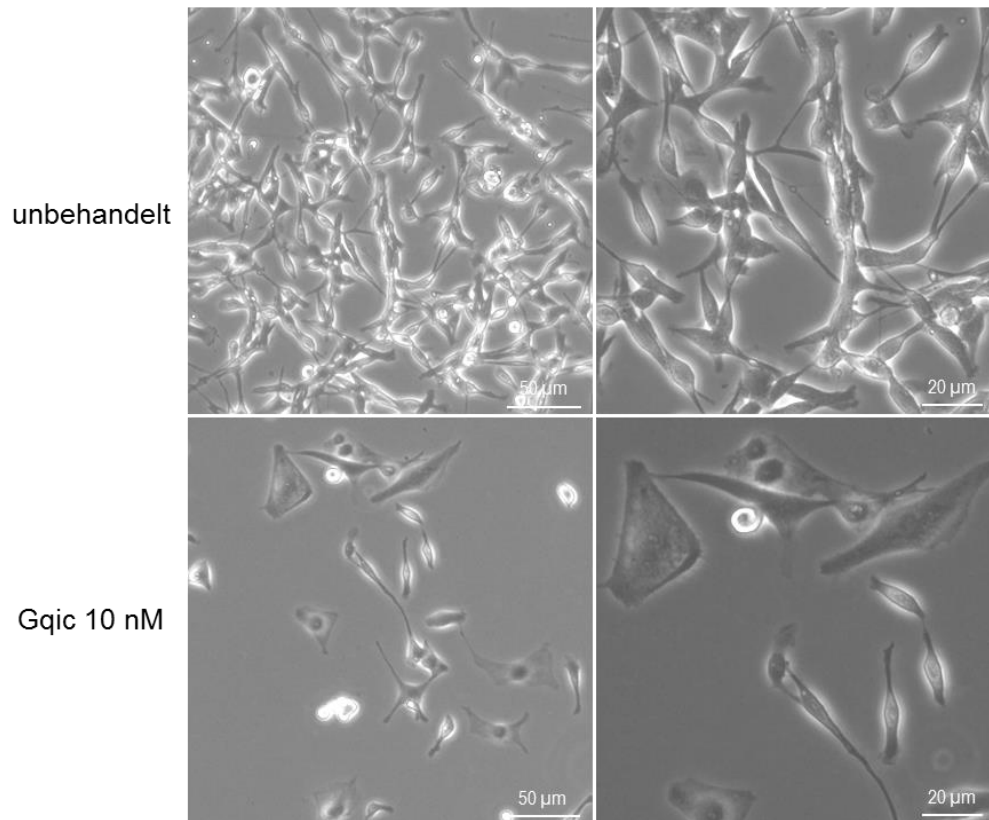


Abbildung 14: Mikroskopische Aufnahmen der un- sowie Gqic-behandelten (10 nM) HCmel12 Zellen nach 72-stündiger Kulturzeit in 10 % hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum enthaltendem Medium. Linksseitig 10-fache (Maßstab 50 µm), rechtsseitig 20-fache (Maßstab 20 µm) Vergrößerung.

Mikroskopisch imponieren die MZ7-MEL Zellen unter Einfluss von Gqic mit einem stark veränderten morphologischen Phänotyp. Die Zellen erscheinen im Vergleich zu unbehandelten Zellen deutlich vergrößert und abgeflacht. Zudem ist Pigment intrazellulär sichtbar. Ebenso ist die mikroskopische Zellmorphologie der HCmel12 Zellen umorganisiert. Neben den unbehandelten Zellen sind die behandelten HCmel12 Zellen verbreitert, sodass insgesamt die einzelne Zelle vergrößert ist. Darüber hinaus deutet eine feine Granulierung die Zellpigmentierung an. Zusätzlich gilt für beide Melanomzelllinien, dass die Zellgrenzen durch Gqic unscharf, zum Teil kaum auszumachen sind. In Abbildung 13 und 14 ist jeweils ein repräsentatives lichtmikroskopisches Bild der Zellmorphologien dargestellt.

3.3.2 Migrationsverhalten der Tumorzellen in Anwesenheit von Gqic

Vorarbeiten zeigen, dass G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in die Steuerung der Zellmigration involviert sind. Dies ist unter anderem für die Metastasierung maligner Zellen von entscheidender Bedeutung (Dorsam und Gutkind, 2007). In den folgenden Experimenten wird untersucht, ob Zellen, die in ihrer Proliferation sensitiv auf eine $G\alpha_q$ -Inhibition reagieren, auch im Migrationsverhalten durch Gqic beeinflusst werden. Mit Hilfe des Transwell-Migrations-Assays werden die Zellen anhand drei unabhängiger Experimente hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens unter verschiedenen Konstellationen charakterisiert. In Abbildung 15 ist ein repräsentatives Ergebnis der Migrationsanalyse der humanen Melanomzellen, in Abbildung 16 der murinen Melanomzellen dargestellt.

Das Migrationsverhalten von unbehandelten MZ7-MEL Zellen, die in 1 %-igem FCS-Medium migrieren, dient hier als Bezugswert der basalen, unbeeinflussten Migration. Werden diese unbehandelten Zellen in einem Transwell in Anwesenheit von Gqic installiert, so zeigt sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Migration. Beispielsweise migrieren in Anwesenheit von Gqic 10 nM, verglichen zu der unbehandelten Kontrolle, 100 % weniger Zellen.

Nach identischer Versuchsanordnung werden MZ7-MEL Zellen getestet, welche jedoch zuvor mit Gqic behandelt wurden. Demzufolge werden proliferationsgehemmte, pigmentierte, vergrößerte MZ7-MEL Zellen eingesetzt. Im Ergebnis lässt sich erkennen, dass allein die Gqic-Vorbehandlung das Migrationspotenzial in Abhängigkeit von der Konzentration des Inhibitors hemmt. Ist in der Transwell-Versuchsanordnung zudem Gqic anwesend, so wird zusätzlich die Migration reduziert. Zusammengenommen migrieren Zellen, die mit 0,1 nM Gqic vorbehandelt sind, in Anwesenheit von Gqic 0,1 nM 100 % weniger als die Kontrolle.

Gleichermaßen wird das Migrationsverhalten von unbehandelten HCmel12-Zellen und Gqic-vorbehandelten HCmel12-Zellen untersucht. Als Kontrolle dient ebenso das basale Migrationsvermögen von unbehandelten HCmel12-Zellen in Abwesenheit von Gqic in 1 %-igem FCS-Medium. Für die murinen Zellen ist gleichfalls eine von der Gqic-Konzentration abhängige Hemmung der Migration eindeutig erkennbar. Das Migrations-

potential unbehandelter HCmel12 Tumorzellen wird durch Gqic 1 nM im Transwell-Versuch um 100 % im Vergleich zu der Kontrolle herabgesetzt.

Werden mit Gqic vorbehandelte Zellen in das Migrationsexperiment eingesetzt, sprich proliferationsgehemmte, pigmentierte, vergrößerte HCmel12 Zellen, so ist gleichsam die hemmende Wirkung der Substanz Gqic eindeutig zu verzeichnen. Analog zu den humanen Zellen migrieren HCmel12 Zellen, die mit Gqic 0,1 nM vorbehandelt wurden, in Anwesenheit von Gqic 0,1 nM 100 % weniger als die Kontrolle.

Ohne Ausnahme lässt sich in jeder Versuchskonstellation das Migrationsverhalten der Zellen durch die Anwesenheit von SDF-1 100 ng/mL steigern. Sowohl unbehandelte Zellen als auch mit Gqic vorbehandelte Zellen migrieren durch diesen Stimulus stärker. Dies gilt gleichermaßen für die humane sowie murine Zelllinie.

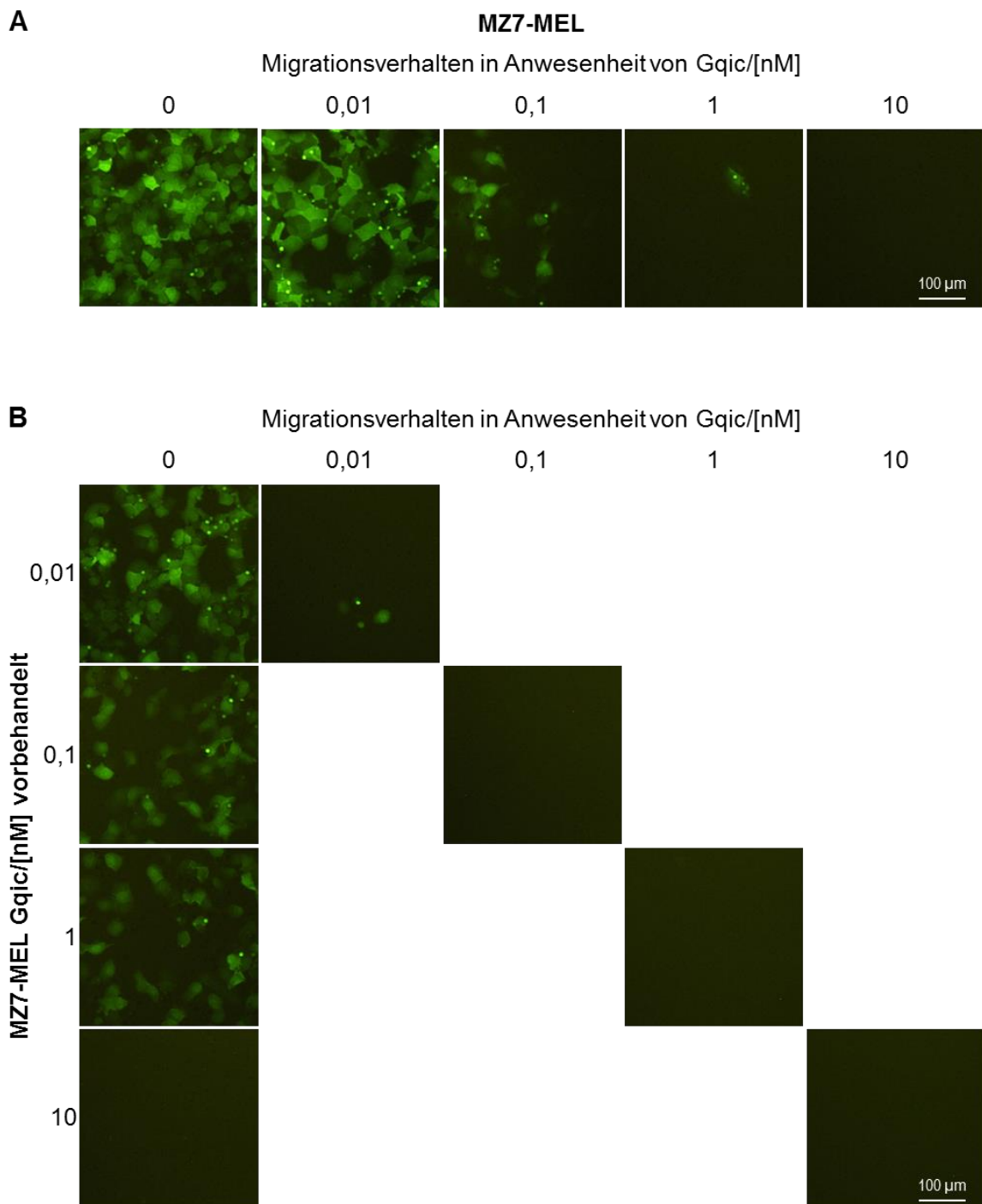


Abbildung 15: Dokumentation repräsentativer high-power-fields der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung des Transwell-Migrations-Assays. 10-fach Vergrößerung (Maßstab 100 μ m). A) Illustriert das Migrationsverhalten un behandelter MZ7-MEL Zellen in Anwesenheit von \pm Gqic/[nM]. B) Bildet das Migrationsverhalten Gqic-behandelter MZ7-MEL Zellen in Anwesenheit von \pm Gqic/[nM] ab.

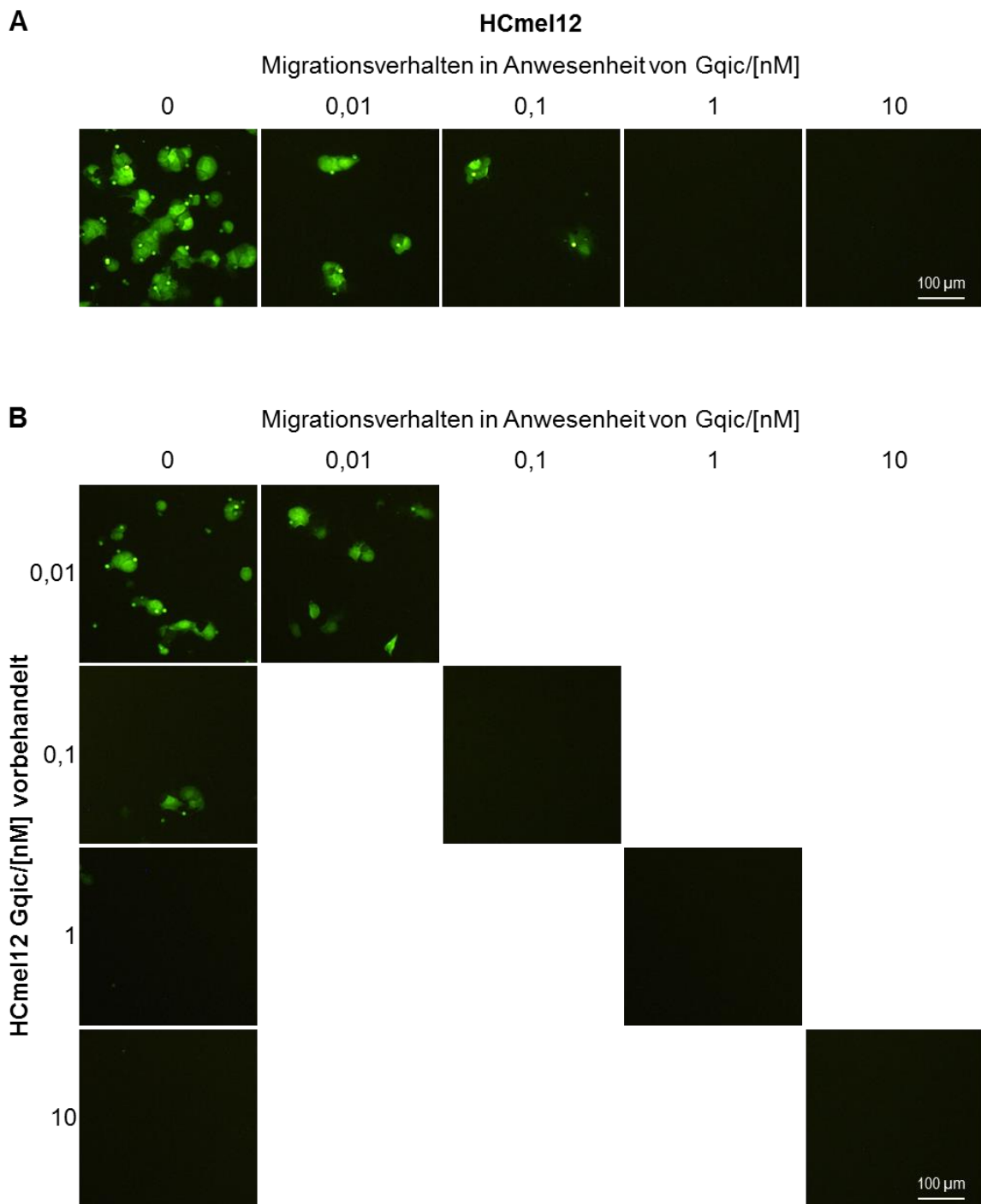


Abbildung 16: Dokumentation repräsentativer high-power-fields der fluoreszenzmikroskopischen Auswertung des Transwell-Migrations-Assays. 10-fach Vergrößerung (Maßstab 100 μ m). A) Illustriert das Migrationsverhalten unbehandelter HCmel12 Zellen in Anwesenheit von \pm Gqic/[nM]. B) Bildet das Migrationsverhalten Gqic-behandelter HCmel12 Zellen in Anwesenheit von \pm Gqic/[nM] ab.

3.4 Untersuchung des Peptidhormons Endothelin als möglicher migrationsstimulierender Ligand anhand der MZ7-MEL Zellen

Das Zusammenspiel diverser Signalwege auf zellulärer Ebene führt schließlich zu invasivem Wachstum und Metastasierung. Vorarbeiten identifizieren ET als einen in diese Steuerung involvierten Liganden (Bagnato und Rosano, 2008).

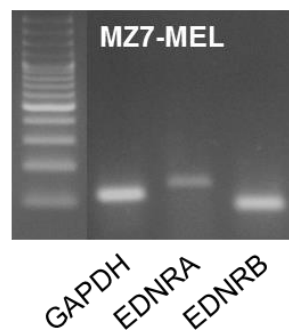


Abbildung 17: Genexpressionsanalyse der MZ7-MEL mittels semiquantitativer RT-PCR (Reverse Transkriptase-Polymerase-Ketteneraktion).

Um ET vor diesem Hintergrund als möglichen Liganden zu untersuchen, ist der Nachweis der entsprechenden Rezeptoren essentiell. Mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR lässt sich die Genexpression der Rezeptoren ETRA und ETRB für die humane Melanomzelllinie MZ7-MEL belegen.

Im Transwell-Migrations-Assay wird das Migrationsverhalten der MZ7-MEL Zellen unter Einfluss von ET-1 untersucht. Von den drei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten stellen Abbildung 18 und 19 jeweils ein repräsentatives Ergebnis dar und verdeutlichen den migrationsstimulierenden Effekt von ET-1. Zum einen migrieren die Melanomzellen in Anwesenheit von ET-1 stärker, zum anderen kann eine Vorstimulation der Zellen mit ET-1 ebenfalls das migratorische Potential steigern (Abbildung 18). Durch eine Vorbehandlung der Zellen mit Gqic vor der ET-1 Stimulation migrieren die Zellen schwächer. Durch die Anwesenheit von Gqic inklusive des Peptidhormons ET-1 in dem Well des Versuchsaufbaues ist die Zellmigration ebenso gehemmt (siehe Abbildung 19).

Anhand der Versuchsergebnisse lässt sich ableiten, dass der $G\alpha_q$ -Protein-Inhibitor den ET-1 induzierten Signalweg hemmen kann.

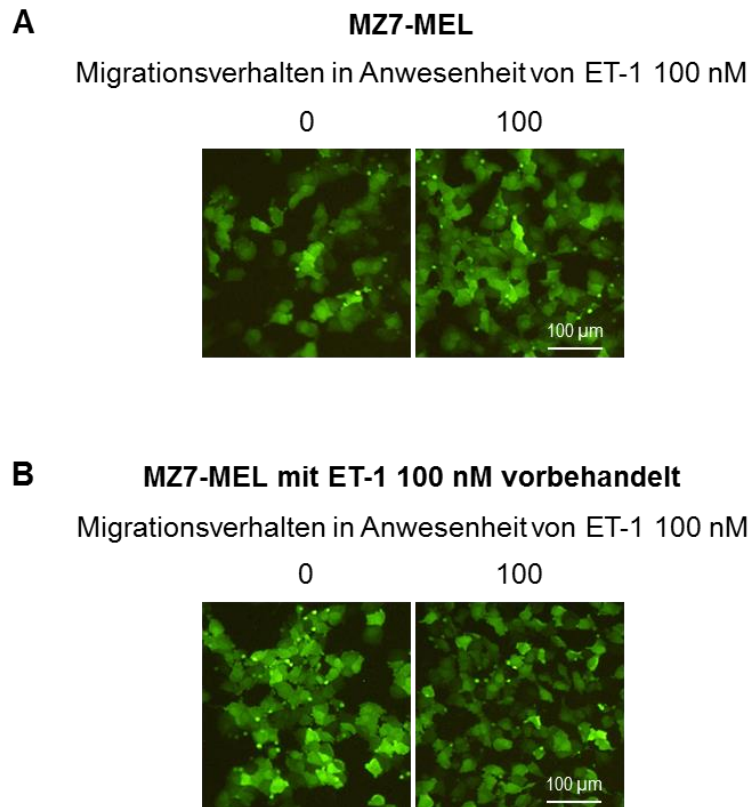
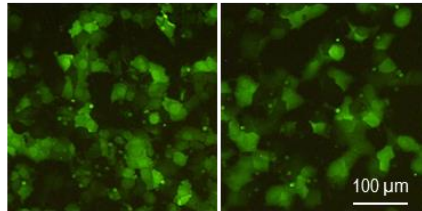


Abbildung 18: Dokumentation repräsentativer high-power-fields einer fluoreszenzmikroskopischen Auswertung des Transwell-Migrations-Assays. 10-fach Vergrößerung (Maßstab 100 μm). A) Illustriert das Migrationsverhalten unbehandelter MZ7-MEL Zellen in Anwesenheit von \pm Endothelin-1 (ET-1) 100 nM. B) Bildet das Migrationsverhalten ET-1 100 nM vorbehandelter MZ7-MEL Zellen in Anwesenheit von \pm ET-1 100 nM ab.

A MZ7-MEL Gqic 0,1 nM und ET-1 100 nM vorbehandelt

Migrationsverhalten in Anwesenheit von Gqic 0,1 nM und ET-1 100 nM

Gqic	0	0,1
ET-1	0	100

**B MZ7-MEL Gqic 1 nM und ET-1 100 nM vorbehandelt**

Migrationsverhalten in Anwesenheit von Gqic 1 nM und ET-1 100 nM

Gqic	0	1
ET-1	0	100

**C MZ7-MEL Gqic 10 nM und ET-1 100 nM vorbehandelt**

Migrationsverhalten in Anwesenheit von Gqic 10 nM und ET-1 100 nM

Gqic	0	10
ET-1	0	100



Abbildung 19: Dokumentation repräsentativer high-power-fields einer fluoreszenzmikroskopischen Auswertung des Transwell-Migrations-Assays. 10-fach Vergrößerung (Maßstab 100 µm). Migrationsverhalten Gqic- und Endothelin-1 (ET-1) 100 nM-vorbehandelter MZ7-MEL Zellen in Anwesenheit von ± Gqic und ± ET-1 100 nM. A) Gqic 0,1 nM. B) Gqic 1 nM. C) Gqic 10 nM.

4. Diskussion

Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel, ein besseres Verständnis der Pathogenese des malignen Melanoms zu erlangen. Mit dem spezifischen $G\alpha_q$ -Protein-Inhibitor Gqic als experimentelles Werkzeug ist es möglich, den Effekt einer Inhibition des $G\alpha_q$ -vermittelten Signalwegs auf die Zellfunktionen humaner und muriner Melanomzellen zu untersuchen. Dazu wird zum einem durch den Einsatz der Substanz Gqic die Bedeutung einer $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition in der Pathogenese des Melanoms analysiert. Zum anderen lässt sich experimentell die Rolle des GPCR Agonisten Endothelin in der Melanogenese untersuchen. Die experimentelle Umsetzung erfolgt *in vitro* an Melanomzellen des Menschen und der Maus.

4.1 Auswirkungen einer $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition auf die Zellfunktionen humaner und muriner Melanomzellen

Zentrale Beobachtung der $G\alpha_q$ -Protein-Inhibitions-Experimente ist eine Hemmung des Zellwachstums. Je höher die Konzentration des Inhibitors Gqic ist, desto stärker fällt die Reduktion des Zellwachstum sowohl der humanen MZ7-MEL Zellen als auch der murinen Hcmel12 Zellen aus (siehe Ergebnis 3.1.2 und Abb. 6). Zugleich erhöht sich jedoch nicht der Anteil apoptotischer Zellen (siehe Ergebnis 3.2.1 und Abb. 9 sowie 10). Folglich ist die reduzierte Zellzahl durch $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition nicht auf einen gesteigerten Zelltod zurückzuführen. Vielmehr besteht eine Assoziation zwischen dem Effekt der Zellwachstumshemmung und einem Zellzyklusphasenarrest. Durch eine $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition befinden sich bei den humanen und murinen Melanomzellen mehr Zellen in der G1-Phase. Entsprechend verringert sich der Anteil der in Phasen S und G2 befindlichen Zellen (siehe Ergebnis 3.2.2 und Abb. 11). Aus diesem Grund lässt sich ableiten, dass die Zellen vermindert DNA synthetisieren und sich schwächer replizieren. $G\alpha_q$ -Protein-gekoppelte Rezeptoren sind in der Literatur bereits als Teil des Netzwerkes der zellulären Steuerung des Zellwachstums beschrieben (O`Hayre et al., 2014). Entsprechend ist bei Ausschaltung des $G\alpha_q$ -Signals ein reduziertes Zellwachstum zu er-

warten. Dies lässt sich mittels Gqic experimentell belegen. Der Zellzyklusphasenarrest ist in dieser Art nicht vorbeschrieben.

Die kolorimetrische Analyse der Zellwachstumsinhibition unter Einfluss verschiedener Gqic-Konzentrationen bestätigt zwar die Hemmung des Zellwachstums per se, allerdings kann dies für MZ7-MEL lediglich bei einer Konzentration von Gqic 10 nM und für HCmel12 bei Gqic 1 und 10 nM belegt werden (siehe Ergebnis 3.1.3 und Abb. 7). Erklärungsansätze für die Diskrepanz des Ausmaßes der Wachstumsinhibition zwischen quantitativer Zellzahlbestimmung und kolorimetrischer Messung bieten folgende Überlegungen. Zunächst könnte die Sensitivität des Kristallviolett-Assays geringer sein. Eine zweite Überlegung liegt in dem veränderten morphologischen Phänotyp der Zellen durch Gqic begründet. Möglicherweise erreicht eine geringere Anzahl von Gqic-behandelten Zellen aufgrund des vergrößerten Zellumfanges ähnlich wie die unbehandelten Zellen einen dichten Zellrasen, sodass die kolorimetrisch gemessenen Farbintensitäten vergleichbar sind. Die Tatsache, dass die Zellvergrößerung bei den murinen Zellen weniger stark ausgeprägt ist als bei der humanen Zelllinie, unterstützt diese Überlegung, da im Kristallviolett-Assay die Wachstumsreduktion neben 10 auch bei 1 nM Gqic detektiert wird. Ein dritter Erklärungsansatz könnte auf einer initial zu hoch eingesetzten Zellzahl beruhen. In solch einer Kultur würde das Zellwachstum vor allem der unbehandelten Zellen einerseits durch den verfrühten Verbrauch der zur Verfügung stehenden Mediumbestandteile und andererseits durch Kontaktinhibition gehemmt werden. Denkbar wäre auch eine erhöhte Apoptoserate induziert durch die genannten Mechanismen Nährstoff- und Platzmangel.

Die Untersuchung des Zellmetabolismus unter Einfluss von Gqic zeigt nach einer Kulturzeit von 72 h keinen signifikanten Unterschied der Zellaktivität zwischen un- und mit Gqic behandelten Zellen der MZ7-MEL, allerdings eine signifikante Reduktion des Zellmetabolismus bei den mit 1 und 10 nM Gqic behandelten HCmel12 Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (siehe Ergebnis 3.1.4 und Abb. 8). Die höhere Sensitivität der HCmel12 Zellen gegenüber einer $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition lässt sich auch in den anderen Experimenten beobachten. So sind bei den murinen Zellen beispielsweise das Ausmaß der Zellwachstumsinhibition und die Auswirkungen auf den Zellzyklusphasenarrest stärker ausgeprägt.

Eine $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition mittels Gqic induziert eine Zellpigmentierung der humanen sowie murinen Melanomzellen, welche positiv mit steigender Konzentration des Inhibitors korreliert (siehe Ergebnis 3.3.1 und Abb. 12, 13 und 14). Weiter lässt sich durch mikroskopische Beobachtungen eine veränderte Zellmorphologie in Form von stark vergrößerten Zellen mit eingelagertem Pigment dokumentieren. Eine Pigmentierung gilt als charakteristisch für differenzierte Melanozyten (Hirobe, 2011). Angesichts der durch Gqic induzierten Zellpigmentierung und des herabgesetzten Zellwachstums kann in Übereinstimmung mit oben genannter Literatur abgeleitet werden, dass eine $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition Stimulus für eine Zelldifferenzierung ist.

GPCR-abhängige Signalwege sind Bestandteil der Steuerung der Zellmigration. Insbesondere spielen $G\alpha_q$ -Protein-gekoppelte Chemokinrezeptoren eine wichtige Rolle, welche zum einen das migratorische Potential der Zelle erhöhen und zum anderen an dem Mechanismus der Metastasierung beteiligt sind (O`Hayre et al., 2014, siehe Einleitung 1.2). Die Versuchskonstellation des Transwell-Migrations-Assays erlaubt eine Beurteilung des Migrationsverhaltens der Melanomzellen, welche die permeable Transwell-Membran durch Zellbewegungen und Migration überwinden. Vereinbar mit der genannten Literatur weisen die Versuchsergebnisse auf eine Migrationshemmung der MZ7-MEL und HCmel12 Zellen durch $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition hin (siehe Ergebnis 3.3.2 und Abb. 15 und 16 sowie Ergebnis 3.4 Abb. 18 und 19).

Eine wesentliche Schaltstelle der Zellkommunikation bilden die GPCR. Diese sind als transmembranäre Rezeptoren essentiell für den Empfang extrazellulärer Signale bzw. die Weiterleitung dieser nach intrazellulär (Rosenbaum et al., 2009). So könnte man ableiten, dass der Zelle durch eine $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition ein extrazelluläres Signal fehlt. Um sich dieser Überlegung zu nähern, folgten Experimentkonstellationen mit reduzierter Serumkonzentration. Die Modifikation des Experimentes intendiert, dass die reduzierte Serumkonzentration einen Mangel extrazellulärer Signale (GPCR Liganden) simuliert und in der Folge, falls Gqic über die Ausschaltung eines extrazellulären Signals wirkt, ähnliche Effekte (z.B. Wachstumsinhibition) zu erwarten wären. In der Tat verringert sich bei reduziertem Serumangebot ohne Anwendung des $G\alpha_q$ -Protein-Inhibitors das Zellwachstum der MZ7-MEL und HCmel12 Zellen um ca. 60 % (siehe Ergebnis 3.1.2 und Abb. 6). Dies stützt die Überlegung des fehlenden extrazellulären Liganden. Die zu-

sätzliche Applikation des $G\alpha_q$ -Protein-Inhibitors Gqic bei reduzierter Serumkonzentration erzielt dabei weiterhin eine Zellwachstumsreduktion. Dies entspricht ebenso der genannten Hypothese, da das Zellwachstum der HCmel12 Zellen durch $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition mit Gqic 10 nM unter normalen Kulturbedingungen (10 % FCS-Gehalt) um ca. 90 % und bei reduzierter Serumkonzentration (2 % FCS-Gehalt) nur noch um ca. 78 % herabgesetzt wird. Mit anderen Worten, Gqic 10 nM erreicht die maximale Hemmwirkung des Zellwachstums, welches durch einen extrazellulären Stimulus herbeigeführt wird. Zudem kann bei reduzierter Serumkonzentration darüber hinaus keine Hemmung erzielt werden, da bereits ein vermindertes Angebot extrazellulärer Liganden im Medium besteht. Dies lässt sich hingegen nicht auf die MZ7-MEL Zellen übertragen. Das Zellwachstum wird durch Gqic 10 nM sowohl bei Medienbedingungen 10 % als auch 2 % FCS-Gehalt um ca. 66 % bzw. 69 % gehemmt. Hier stellt sich deshalb die Frage, ob gegebenenfalls eine höhere Konzentration des Inhibitors (z.B. 100 nM Gqic) notwendig ist, um das Zellwachstum bzw. die Ligandenwirkung maximal zu hemmen. Nichtsdestotrotz stärken auch die Ergebnisse der Experimente der MZ7-MEL Zellen die Hypothese der Hemmung eines extrazellulären Signals. Nach Einsatz von 1×10^5 MZ7-MEL Zellen lässt sich in Kultur mit 10 % FCS-Gehalt nach 72 h Kultur in Anwesenheit von Gqic 10 nM eine Zellzahl von $5,5 \times 10^5$ ermitteln. In Kultur mit 2 % FCS-Gehalt hingegen reicht eine geringe Konzentration von 0,1 nM Gqic aus, um einen vergleichbaren Wert von $5,6 \times 10^5$ Zellen nach 72 h zu erzielen. Für einen vergleichbaren Hemmungseffekt wird bei reduzierter Serumkonzentration somit weniger Inhibitor benötigt.

ET ist in der Literatur als wichtiger Ligand der Melanozytenentwicklung und Melanogenese beschrieben (Lahav et al., 1999). In die Regulation der Zellproliferation und Migration, welches zu invasivem und metastatischem Wachstum führt, ist ET involviert (Bagnato und Rosano, 2008). Das Migrationsverhalten der MZ7-MEL lässt sich durch eine Kultivierung der Zellen mit ET oder durch die Anwesenheit von ET im Transwell minimal steigern. Diesen $G\alpha_q$ -vermittelten Effekt antagonisiert Gqic, sodass auch in dieser Versuchskonstellation eine $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition erfolgreich durchführbar ist (siehe Ergebnis 3.4 und Abb. 18 und 19). Da sich durch den Einsatz von ET die Konzentration der GPCR Liganden erhöht, überwiegt bei einer Konzentration von 0,1 nM Gqic bereits die stimulatorische Komponente der Liganden für die Zellmigration vorbehandelter Zellen. Ohne Anwendung von ET hemmt Gqic 0,1 nM im Transwell die

Migration der mit Gqic vorbehandelten Zellen (siehe Ergebnis 3.3.2 und Abb. 15). Dieser Zusammenhang kräftigt ebenso die Hypothese, dass eine durch Gqic vermittelte $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition extrazelluläre Signale hemmt. Fraglich bleibt, ob ET den entscheidenden Ligand für die Stimulation der Zellmigration darstellt, da insgesamt das Migrationsverhalten der MZ7-MEL Zellen durch ET schwach stimulierbar ist. Andererseits sollte zukünftig evaluiert werden, ob MZ7-MEL basal bereits ein hohes Migrationslevel erreichen und sich daher für den Stimulationsversuch mit ET-1 grundsätzlich nicht eignen. Aktuell erscheint neben ET die LPA als ein weiterer potentieller Ligand, welche beispielsweise mitogen wirkt (Dorsam und Gutkind, 2007). Es bietet sich deshalb an, LPA zukünftig in Experimente einzuschließen.

4.2 Abhängigkeit der Zellfunktionen von $G\alpha_q$ -Signalwegen

Zweifelsohne sind das Zellwachstum und die Zellmigration durch $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition mittels Gqic hemmbar. Ungeklärt bleibt jedoch die Frage, warum einige Zelllinien in dieser Hinsicht nicht spontan auf eine $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition reagieren (siehe Ergebnis 3.1.1 und Tabelle 5). Durchgeführte Experimente, beispielsweise mit SK-MEL-28, erzielten keine messbaren Ergebnisse durch Anwendung von Gqic. Daher ist ein diskussionswürdiger Punkt, ob diese Zellen per se nicht sensitiv auf eine $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition hinsichtlich einer Zellwachstumshemmung reagieren oder Gqic nur unter bestimmten Bedingungen einen Effekt erreicht.

Ursächlich könnte der Mutationsstatus die Sensitivität der Zellen gegenüber einer $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition begründen. Allerdings ist kein Mutationsmuster erkennbar, welches dem Ansprechen auf eine $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition entspricht. Betrachtet man beispielsweise den BRAF-Mutationsstatus, so sind die Gqic-sensitiven MZ7-MEL Zellen V600E punktmutiert genauso wie die Melanomzelllinie SK-MEL-28, welche hingegen nicht sensitiv auf Gqic reagiert (Charakterisierung der Zellen im Rahmen des SANGER cancer cell line project, 2014). Ebenso verhält es sich bei Zellen mit wildtyp Genotyp. Ma-Mel-15 (wildtyp) beispielsweise reagiert und Ma-Mel-65 (wildtyp) reagiert nicht auf eine $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition (Hodis et al., 2012).

Zelluläre Signalsteuerung beruht auf dem Zusammenspiel diverser Signalwege und speziell unter Berücksichtigung der GPCR auf Signalwegen mit nachgeschalteten second-messenger Wegen. Die Aktivierung der $G\alpha_q$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren führt unter anderem zur Stimulation von sogenannten MAPK-Signalwegen (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) und reguliert in der Folge auf Transkriptionsebene z.B. die Zellproliferation (Dorsam und Gutkind, 2007; O`Hayre et al., 2014). Im Hinblick auf das Zellwachstum werden in der Literatur die MAP-Kinase-Wege besonders hervorgehoben. Nicht nur wegen der Assoziation zwischen MAP-Kinase-Wegen und der BRAF Mutation, sondern auch wegen der Interaktion von $G\alpha_q$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren mit MAPK (GNAQ-Mutation) nehmen MAPK eine wichtige Stellung in der Pathogenese des Melanoms ein (Solus und Kraft, 2013). Möglich ist demzufolge, dass Gqic über Inhibition des MAPK eine Zellwachstumsreduktion bewirkt. Dieser Zusammenhang liefert eine zweite potentielle Ursache, weshalb einige Zellen nicht sensitiv gegenüber Gqic reagieren. Einerseits könnte ein alternativer wachstumsstimulierender Signalweg abgesehen von dem MAPK angeschaltet oder andererseits der MAPK durch alternative Wechselwirkungen des Netzwerkes der Zellsteuerung aktiviert werden.

Als dritte Überlegung könnte ein zellulärer Kompensationsmechanismus in Form einer Erhöhung der Rezeptordichte die Abgrenzung der sensitiven und nicht-sensitiven Zellen gegenüber Gqic begründen. Die Informationsweiterleitung der GPCR wird durch zahlreiche Mechanismen beeinflusst. Interagierende bzw. assoziierte Proteine modulieren das Signal der GPCR und können beispielsweise so die Signalstärke modifizieren. Außerdem unterliegen die GPCR einem dynamischen Prozess, welcher unter anderem die lysosomale Rezeptordegradierung, das -recycling sowie das „Rezeptor-Trafficking“ einbezieht. Letzteres umfasst z.B. die Lokalisierung der Rezeptoren in der Zellmembran (Ritter und Hall, 2009). Somit könnte die Zelle die inhibierten $G\alpha_q$ -Protein-gekoppelten Rezeptoren durch Erhöhung der Rezeptordichte kompensieren, indem in Endosomen gespeicherte Rezeptoren an die Zellmembran transloziert werden. Denkbar ist auch eine kompensatorisch gesteigerte Genexpression.

Zukünftige Experimente sollten dahingehend konzipiert werden, den intrazellulären Steuerungsmechanismus aufzuklären. Des Weiteren kann die Untersuchung einer

größeren Zahl von Zelllinien dazu verhelfen, die allgemeingültige Signifikanz der Ergebnisse zu validieren.

4.3 Ausblick: $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition als Therapieoption

Die herausgearbeiteten Effekte einer $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition im Hinblick auf die Funktionen von Melanomzellen, insbesondere die Hemmung des Zellwachstums und der Migration, sind von entscheidender Bedeutung. Dies nicht zuletzt deshalb, weil speziell die Metastasierung eine Herausforderung in der Therapie des malignen Melanoms darstellt (O`Hayre et al., 2014). Der $G\alpha_q$ -Protein-Inhibitor Gqic ermöglicht auf experimentellem Weg, zukünftig auch in der Anwendung eines Mausmodells, die Pathogenese des Melanoms besser zu verstehen und anhand dessen Therapieansätze abzuleiten.

In der Vergangenheit verliefen experimentelle Arbeiten mit dem selektiven ETRB Antagonist BQ788 erfolgreich (Lahav et al., 1999). Der klinische Einsatz des oral applizierbaren Rezeptorantagonisten Bosentan setzte sich in der Chemotherapie des malignen Melanoms jedoch nicht durch (Kefford et al., 2010 und siehe Einleitung 1.4). Trotzdem gewähren die Ergebnisse Keffords et al. Einblick in die Pathogenese des Melanoms und belegen die Verträglichkeit des systemischen Einsatzes eines Rezeptorantagonisten. Die klinische Anwendung sollte dahingehend untersucht werden, ob eventuell nur ein Teil der Patienten von diesem Therapieansatz profitiert. Möglicherweise liegt das Nichtansprechen der Therapie bei diesen Patienten in anderen ätiologischen Mechanismen (z.B. BRAF Mutation) begründet und eine alternative Therapie wäre effizienter und sinnvoll.

Auf Grundlage der vorgelegten Ergebnisse ist es zu früh, therapeutische Konsequenzen für den klinischen Einsatz zu ziehen. Nichtsdestotrotz erscheint der Ansatz einer selektiven Rezeptorhemmung im Sinne einer gezielten Therapie vielversprechend.

5. Zusammenfassung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) regulieren das Wachstum, die Differenzierung und Migration von Melanozyten. Sie spielen auch eine wichtige Rolle in der Pathogenese des malignen Melanoms. Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Untersuchung der Bedeutung der Untereinheit $G\alpha_q$ der G-Proteine für die Signaltransduktion in Melanomzellen.

Als experimentelles Werkzeug wurde der neue spezifische $G\alpha_q$ -Protein-Inhibitor „Gqic“ in *in vitro* Experimenten mit humanen und murinen Melanomzellen verwendet. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zeigen, dass Gqic signifikant das Zellwachstum hemmt. Ursächlich ist nicht ein gesteigerter Zelltod, sondern ein Zellzyklusphasenarrest. Weitere Experimente weisen eine Inhibition der Zellmigration durch Gqic nach. Die mikroskopischen Untersuchungen zeigen eine Gqic-induzierte Zellpigmentierung und Veränderung der Zellmorphologie. Im Zusammenhang mit der zuvor beschriebenen Zellwachstums- und Migrationshemmung lassen diese Beobachtungen auf eine Zelldifferenzierung schließen. Weiterführende Experimente mit dem GPCR Liganden Endothelin, welcher $G\alpha_q$ -abhängige Signalwege aktiviert, bestätigen die Wirkung des Inhibitors. Endothelin stimuliert die Zellmigration. Dieser Effekt ist durch Gqic hemmbar.

Aus den erarbeiteten Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass Gqic die Proliferation und Migration hemmt sowie die Differenzierung der untersuchten Zelllinien induziert. Die $G\alpha_q$ -Protein-Inhibition stellt somit einen aussichtsreichen Ansatzpunkt einer anti-tumorösen Therapie dar. Weiterführende Analysen der Substanz Gqic sollten zukünftig am Mausmodell *in vivo* erfolgen. Die gewonnenen Erkenntnisse eröffnen weitere Schritte auf dem Weg zur Translation in die klinische Anwendung.

6. Literaturverzeichnis

American Cancer Society, 2014: Cancer Facts & Figures 2014. <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf> (Zugriffsdatum: 05.11.2014)

Arai H, Hori S, Aramori I, Ohkubo H, Nakanishi S. Cloning and expression of a cDNA encoding an endothelin receptor. *Nature* 1990; 348: 730-732

Bagnato A, Rosano L. The endothelin axis in cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 2008; 40: 1443-1451

Bald T, Quast T, Landsberg J, Rogava M, Glodde N, Lopez-Ramos D, Kohlmeyer J, Riesenberger S, van den Boorn-Konijnenberg D, Hömig-Hölzel C, Reuten R, Schadow B, Weighardt H, Wenzel D, Helfrich I, Schadendorf D, Bloch W, Bianchi ME, Lugassy C, Barnhill RL, Koch M, Fleischmann BK, Förster I, Kastenmüller W, Kolanus W, Hölzel M, Gaffal E, Tüting T. Ultraviolet-radiation-induced inflammation promotes angiotropism and metastasis in melanoma. *Nature* 2014; 507: 109-113

Bastian BC. The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia. *Annu Rev Pathol* 2014; 9: 239-271

Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 1970; 172: 902-908

Carey TE, Takahashi T, Resnick LA, Oettgen HF, Old LJ. Cell surface antigens of human malignant melanoma: mixed hemadsorption assays for humoral immunity to cultured autologous melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 3278-3282

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002; 417: 949-954

Demunter A, De Wolf-Peeters C, Degreef H, Stas M, van den Oord JJ. Expression of the endothelin-B receptor in pigment cell lesions of the skin. Evidence for its role as tumor progression marker in malignant melanoma. *Virchows Arch* 2001; 438: 485-491

Dorsam RT, Gutkind JS. G-protein-coupled receptors and cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7: 79-94

Fujioka M, Koda S, Morimoto Y, Biemann K. Structure of FR900359, a cyclic depsipeptide from *Ardisia crenata* Sims. *J Org Chem* 1988; 53: 2820-2825

Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The pathogenesis of melanoma induced by ultraviolet radiation. *N Engl J Med* 1999; 340: 1341-1348

Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 2007; 445: 851-857

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70

Hirobe T. How are proliferation and differentiation of melanocytes regulated? *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; 24: 462-478

Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, Nickerson E, Auclair D, Li L, Place C, Dicara D, Ramos AH, Lawrence MS, Cibulskis K, Sivachenko A, Voet D, Saksena G, Stransky N, Onofrio RC, Winckler W, Ardlie K, Wagle N, Wargo J, Chong K, Morton DL, Stemke-Hale K, Chen G, Noble M, Meyerson M, Ladbury JE, Davies MA, Gershenwald JE, Wagner SN, Hoon DS, Schadendorf D, Lander ES, Gabriel SB, Getz G, Garraway LA, Chin L. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* 2012; 150: 251-263

Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T. The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 2863-2867

Jang S, Atkins MB. Treatment of BRAF-mutant melanoma: the role of vemurafenib and other therapies. *Clin Pharmacol Ther* 2014; 95: 24-31

Kandalaf LE, Facciabene A, Buckanovich RJ, Coukos G. Endothelin B receptor, a new target in cancer immune therapy. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 4521-4528

Kedzierski RM, Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2001; 41: 851-876

Kefford RF, Clingan PR, Brady B, Ballmer A, Morganti A, Hersey P. A randomized, double-blind, placebo-controlled study of high-dose bosentan in patients with stage IV metastatic melanoma receiving first-line dacarbazine chemotherapy. *Mol Cancer* 2010; 9: 69

Lahav R, Heffner G, Patterson PH. An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 11496-11500

Lahav R. Endothelin receptor B is required for the expansion of melanocyte precursors and malignant melanoma. *Int J Dev Biol* 2005; 49: 173-180

Landsberg J, Kohlmeyer J, Renn M, Bald T, Rogava M, Cron M, Fatho M, Lennerz V, Wölfel T, Hölzel M, Tüting T. Melanomas resist T-cell therapy through inflammation-induced reversible dedifferentiation. *Nature* 2012; 490: 412-416

Lee HJ, Wall B, Chen S. G-protein-coupled receptors and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008; 21: 415-428

Lennerz V, Fatho M, Gentilini C, Frye RA, Lifke A, Ferel D, Wölfel C, Huber C, Wölfel T. The response of autologous T cells to a human melanoma is dominated by mutated neoantigens. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 16013-16018

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

Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. *N Engl J Med* 2006; 355: 51-65

Nelson J, Bagnato A, Battistini B, Nisen P. Endothelin axis: emerging role in cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 110-116

Neves SR, Ram PT, Iyengar R. G protein pathways. *Science* 2002; 296: 1636-1639

Nishimura A, Kitano K, Takasaki J, Taniguchi M, Mizuno N, Tago K, Hakoshima T, Itoh H. Structural basis for the specific inhibition of heterotrimeric Gq protein by a small molecule. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 13666-13671

O'Hayre M, Degese MS, Gutkind JS. Novel insights into G protein and G protein-coupled receptor signaling in cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2014; 27: 126-135

Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002; 3: 639-650

Ritter SL, Hall RA. Fine-tuning of GPCR activity by receptor-interacting proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10: 819-830

Rosano L, Spinella F, Bagnato A. Endothelin 1 in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 637-651

Rosenbaum DM, Rasmussen SG, Kobilka BK. The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 2009; 459: 356-363

Sakurai T, Yanagisawa M, Takawa Y, Miyazaki H, Kimura S, Goto K, Masaki T. Cloning of a cDNA encoding a non-isopeptide-selective subtype of the endothelin receptor. *Nature* 1990; 348: 732-735

Solus JF, Kraft S. Ras, Raf, and MAP kinase in melanoma. *Adv Anat Pathol* 2013; 20: 217-226

Takasaki J, Saito T, Taniguchi M, Kawasaki T, Mortani Y, Hayashi K, Kobori M. A Novel Galphaq/11-selective inhibitor. *J Biol Chem* 2004; 279: 47438-47445

Taniguchi M, Nagai K, Arao N, Kawasaki T, Saito T, Moritani Y, Takasaki J, Hayashi K, Fujita S, Suzuki K, Tsukamoto S. YM-254890, a novel platelet aggregation inhibitor produced by *Chromobacterium* sp. QS3666. *J Antibiot (Tokyo)* 2003; 56: 358-363

Ugurel S, Thirumaran RK, Bloethner S, Gast A, Sucker A, Mueller-Berghaus J, Rittgen W, Hemminki K, Becker JC, Kumar R, Schadendorf D. B-RAF and N-RAS mutations are preserved during short time in vitro propagation and differentially impact prognosis. *PLoS One* 2007; 2: e236

Wellcome Trust Sanger Institute, 2014: COSMIC Catalogue of somatic mutations in cancer. http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cell_lines (Zugriffsdatum: 05.11.2014)

Wettschureck N, Offermanns S. Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol Rev* 2005; 85: 1159-1204

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332: 411-415

Young D, Waitches G, Birchmeier C, Fasano O, Wigler M. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell* 1986; 45: 711-719

7. Danksagung

Besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Thomas Tüting für die Überlassung des Dissertationsthemas und für die Möglichkeit, mich in der wissenschaftlichen Arbeit erproben zu dürfen, aussprechen. Vielen Dank außerdem für die zahlreichen Denkanstöße sowie hilfreichen Diskussionen, welche das Projekt vorangetrieben und zum Gelingen der Arbeit verholfen haben.

Ein Dankeswort richte ich an meine „Kollegen und Kolleginnen“ der Arbeitsgruppe Experimentelle Dermatologie für die Integration in das Team und die überaus angenehme Arbeitsatmosphäre. Mit meinen Fragen habe ich mich bei Euch gut aufgehoben gefühlt. Danke, dass Ihr stets bereit wart, mich bei meiner Arbeit zu unterstützen!

Für die enge Zusammenarbeit, die praktische Anleitung und wertvolle Hilfestellung bei der Erstellung der Arbeit bin ich Frau Dr. med. Evelyn Gaffal dankbar. Außerdem möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. rer. nat. Kostenis für die Projektkooperation und bei dem Koreferenten bedanken.

Nicht zuletzt und nicht minder danke ich meiner Familie, die mir das Studium der Medizin ermöglicht und mich in jeder Hinsicht unterstützt.