

Aus dem Institut für Anatomie II:
Experimentelle Morphologie
(Direktor: Prof. Dr. U. Schumacher)
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Beeinflussung der Zellproliferation von humanen
Melanomzelllinien durch Peroxisome Proliferator-activated
receptor- γ -Agonisten (Glitazone) *in vitro***

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Christian Freudlsperger

aus Albstadt-Ebingen

Hamburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin

Der Universität Hamburg am:

16.06.2005

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r:

Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in:

PD Dr. E. Laack

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in:

PD Dr. I. Hermans-Borgmeyer

I.	Arbeitshypothese und Fragestellung	7
II.	Einleitung.....	8
1.	Das Maligne Melanom	8
1.1.	Epidemiologie	8
1.2.	Prognose	8
1.3.	Therapie	9
2.	Der <i>peroxisome proliferator-activated Receptor-gamma</i> (PPAR γ).....	10
2.1.	Struktur des Rezeptors	10
2.2.	Die Glitazone	12
III.	Material.....	14
1.	Die Melanomzelllinien.....	14
2.	Die Glitazone	14
IV.	Methoden.....	15
1.	Zellproliferationsassays	15
1.1.	Zellkultur	15
1.2.	Detektion von Mykoplasmen-Kontamination in der Zellkultur	16
1.3.	Zellzählung	16
1.4.	Erstellen von Eichkurven	17
1.5.	Zellproliferationsassays mit Zusatz von Glitazonen	18
1.6.	Statistische Auswertungen	20
2.	Immunhistochemische Färbungen.....	21
3.	Proteinbiochemie	22
3.1.	Isolierung der Proteine aus den Melanomzelllinien.....	22

3.2. Konzentrationsbestimmungen von Proteinlösungen.....	23
3.3. SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese	24
3.4. Western-Blot Analyse	25
3.4.1. Elektrophoretischer Transfer.....	25
3.4.2. Immunhistochemischer Nachweis der Proteine	25
3.4.3. Antikörpernachweis durch Chemilumineszens	26
3.4.4. Quantifizierung des Proteinnachweises	26
V. Ergebnisse.....	27
1. Ergebnisse der Zellproliferationsassays	27
1.1. Die Glitazone	27
1.1.1. Rosiglitazone	27
1.1.2. Ciglitazone	30
1.1.3. Pioglitazone	33
1.1.4. Troglitazone.....	36
1.1.5. Vergleich der Wirkung der Glitazone untereinander	39
1.2. Die Zelllinien	40
1.2.1. MV3	40
1.2.2. Mel6.....	42
1.2.3. Lox.....	44
1.2.4. MeWo	46
1.2.5. FemX-1	48
1.2.6. G361	50
2. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen	53
3. Ergebnisse der Proteinextraktion.....	55
3.1. Ergebnisse der Bradford Standardkurve.....	55
3.2. Western-Blot Analyse der zytoplasmatischen Proteine	57
3.3. Western-Blot Analyse der nukleären Proteine	56
3.4. Ergebnisse der Quantifizierung der zytoplasmatischen Proteine.....	58

VI. Diskussion	60
VII. Zusammenfassung	67
VIII. Literaturverzeichnis.....	68
XI. Erklärung	79

Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	A nalysis of V ariance
°C	Grad C elsius
DMF	D imethylformamid
DMSO	D imethylsulfoxid
DR	D irect repeat
EDTA	E thylendiamintetraacetat
ELISA	E nzyme-linked immunosorbent a ssay
FCS	Fetales Kälberserum (f etal c alf s erum)
g	Erdbeschleunigung
KCl	K alium c hlorid
kDa	k ilo D alton
min	M inute(n)
ml	m illiliter
mM	m illimolar
NaCl	N atrium c hlorid
NaVO ₄	N atrium v anadat
nm/nM	N anometer/ N anomolar
OD	O ptische D ichte
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (p hosphat) b uffered s aline)
PFA	P araformaldehyd
PPAR _γ	P eroxisome p roliferator- a ctivated receptor- γ
PPRE	P eroxisome p roliferator response e lement
RXR	R etinoid X - R ezeptor
SDS	S odiumdodecylsulfat
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (t ris b uffered s aline)
µg/µl	m ikrogramm/ m ikroliter
U	Enzymeinheit (u nit)
V	V olt

I. Arbeitshypothese und Fragestellung

Für Patienten mit malignem Melanom ist die Prognose nach eingetretener Metastasierung trotz Chemotherapie infaust, so dass ein grosses Interesse für neue Therapieansätze besteht, zumal die Inzidenz dieses Malignoms in den letzten Jahren sehr stark ansteigt. Für die Glitazone als spezifische Agonisten des *Peroxisome-Proliferator-activated receptor- γ* (PPAR γ) wurde bereits eine antiproliferative Wirkung bei verschiedenen Tumorentitäten nachgewiesen. Bemerkenswert bei ihrer Anwendung waren die im Vergleich zu anderen Chemotherapien geringen Nebenwirkungen. Daher war das Ziel der vorliegenden Arbeit, folgende Fragen zu klären:

- Haben die vier Glitazone Rosiglitazone, Ciglitazone Pioglitazone und Troglitazone eine wachstumshemmende Wirkung auf humane maligne Melanomzelllinien *in vitro*?
- Wenn ja, welches der vier untersuchten Glitazone hat den stärksten wachstumshemmenden Effekt?
- Korreliert die Empfindlichkeit der einzelnen Melanomzelllinien gegenüber den Glitazonen mit der jeweiligen Expression des PPAR γ ?

II. Einleitung

1. Das Maligne Melanom

1.1. Epidemiologie

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor, der seinen Ausgang von den pigmentproduzierenden Melanozyten nimmt. Zu seiner bedeutenden Rolle in der dermatologischen Onkologie gelangt dieser Tumor nicht nur durch seine Häufigkeit, sondern vor allem aufgrund seines aggressiven Wachstumsverhaltens und seiner ausgeprägten Therapieresistenz bei eingetretener Metastasierung. Jährlich werden weltweit circa 132.600 neue Melanome diagnostiziert, wobei die Inzidenz starken geographischen Schwankungen unterliegt. Die weltweit höchste Inzidenz findet sich in Australien und in den Südstaaten der Vereinigten Staaten mit bis zu 40 Neuerkrankungen je 100.000 Einwohner (Whiteman et al., 1997). In Deutschland erkranken zwischen 10 und 15 je 100.000 Einwohner und Jahr an einem kutanen malignen Melanom der Haut, wobei Frauen häufiger erkranken als Männer (Becker et al., 1998).

1.2. Prognose

Von besonderer Bedeutung für die Prognose eines malignen Melanoms ist der Zeitpunkt der Diagnosestellung. Denn früh erkannt ist das maligne Melanom heilbar, aber in metastasiertem Zustand ist es therapeutisch kaum beeinflussbar. Hinsichtlich der Stadieneinteilung und der Prognose der Erkrankung ist die Invasionstiefe des malignen Melanoms der wichtigste Parameter und wird im Rahmen des histologischen Stagings nach Breslow in Millimetern angegeben. Mit steigender Tumordicke nimmt die Überlebensdauer schnell ab (Siehe Tabelle 1.1.). Weitere Prognosefaktoren sind das Invasionslevel nach Clark, der histologische Typ (ungünstig primär noduläre Melanome, das Geschlecht: signifikant schlechtere Prognose für Männer) und die Tumorlokalisierung (ungünstigere Prognose für oberen Stamm, Oberarm, Hals und behaarten Kopf).

Stadium	T	N	M	10-J-Überlebensrate
Ia	pT1 (<0,75 mm)	N0	M0	97%
Ib	pT2 (0,76-1,5 mm)	N0	M0	90%
IIa	pT3 (1,51 –4,0 mm)	N0	M0	67%
IIb	PT4 (>4,0 mm)	N0	M0	43%
IIIa	pTa, pTb	N0	M0	28%
IIIb	Jedes pT	N1, N2	M0	19%
IV	Jedes pT	Jedes N	M1	3%

T: Tumordicke, N: Lymphknotenbefall, N1 < 3 cm in regionären LK, N2 > 3 cm in regionären LK, M: Fernmetastasen, pTa: Satelliten-Metastasen innerhalb von 2 cm vom Primärtumor, pTb: In-transit- Metastasen vor der regionären Lymphknotenstation.

Tabelle 1.1.: Klinische Stadieneinteilung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (Orfanos et al., 1994)

Bei bereits eingetretener Metastasierung ist die Prognose infaust. Das maligne Melanom metastasiert sowohl primär lymphogen als auch primär hämatogen. Die mediane Überlebenszeit bei Fernmetastasierung ohne Behandlung beträgt in der Regel 4 bis 6 Monate (Orfanos et al., 1994). Bevorzugte Organsysteme der Metastasierung sind mit abnehmender Häufigkeit neben der Haut die Lunge, Lymphknoten, Leber, Hirn, Knochen und Nebennieren.

1.3. Therapie

Das maligne Melanom ist im fortgeschrittenen Krankheitsstadium durch seine ausgeprägte Therapieresistenz gekennzeichnet. Die Therapie in frühen Stadien, das heisst bei fehlenden Lymphknoten- oder Fernmetastasen, besteht in der alleinigen Exzision des Primärtumors. Als Therapieoption beim metastasierten malignen Melanom steht die Chemo- beziehungsweise Strahlentherapie zur Verfügung. Bei lediglich 20-30% der Patienten kommt es unter verschiedenen Mono- beziehungsweise Polychemotherapien zu einer partiellen oder sogar vollständigen Tumorremission. Bei einer Kombination von Chemotherapie (Cisplatin, Vinblastin, Dacarbazine) und „Immunmodulierenden“ Verfahren, mit Interferon- α oder

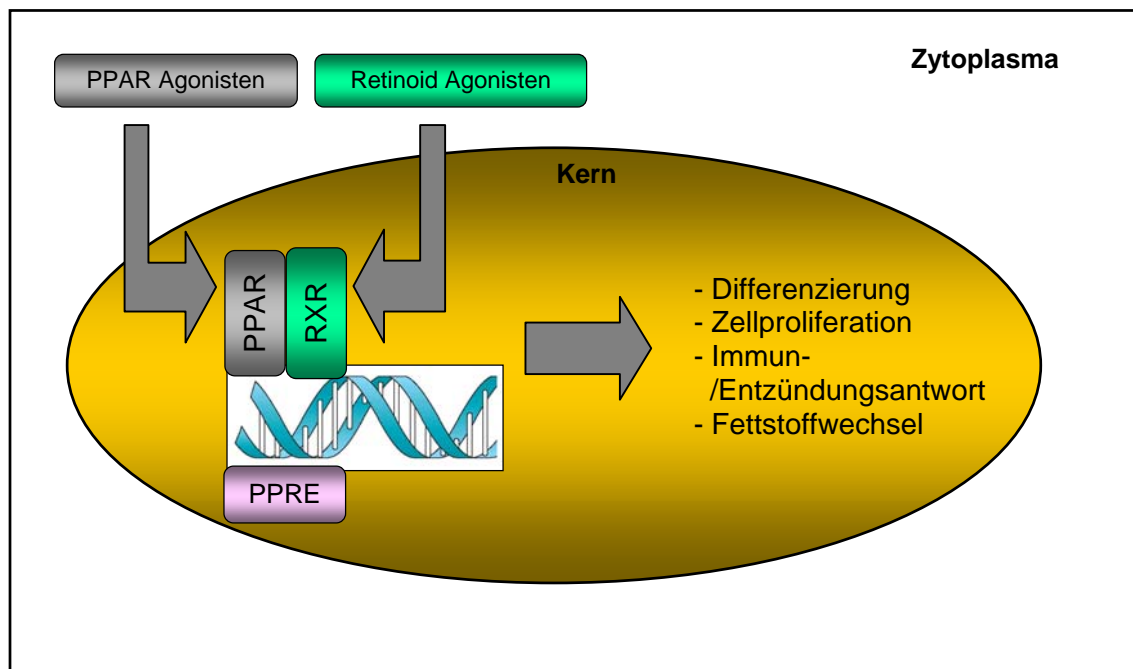
Interleukin-2, zeigt sich ein vorübergehendes Ansprechen bis zu 60%, die aber nur eine Erhöhung der Überlebenszeit um circa 10% bewirken (Antoine et al., 1997; Legha et al., 1997). Insgesamt betrachtet sind aber die Ergebnisse der Mono-, Poly- oder der Immunchemotherapie unbefriedigend. Es werden nur wenige Remissionen erreicht und meistens hat die intensive Therapie eher einen palliativen Charakter. Da sich bisher kein Therapieansatz als Standardtherapie durchsetzen konnte, ist es allerdings schwierig solche Therapiestudien zu vergleichen (Crosby et al., 2000). Dies und vor allem die steigende Inzidenz des malignen Melanoms machen die Dringlichkeit der Suche nach weiteren Therapieoptionen deutlich. Ein solcher neuer Ansatzpunkt besteht möglicherweise in der Beeinflussung eines nukleären Rezeptors, dem *peroxisome proliferator-activated receptor- γ* (PPAR γ), dessen Liganden einen nachweislich hemmenden Einfluss auf das Wachstum verschiedener Tumoren besitzen, wie im weiteren ausführlicher beschrieben wird.

2. Der *peroxisome proliferator-activated Receptor-gamma* (PPAR γ)

2.1. Struktur des Rezeptors

Die PPAR gehören zur Familie der Liganden-aktivierten nukleären Rezeptoren, die für die Regulation von verschiedenen zellulären Mechanismen, welche vom Glucose- und Lipidmetabolismus bis zur Zelldifferenzierung und Apoptose reichen verantwortlich sind (Issemann und Green, 1990). Andere Mitglieder der nukleären Rezeptorfamilie sind die Steroid- und Thyroidhormonrezeptoren, die Retinoidrezeptoren und die Vitamin-D-Rezeptoren (Evans, 1988). Zur Zeit gibt es drei bekannte Formen von PPAR: α , β (auch bekannt als Nuc1) und γ . PPAR α wird hauptsächlich in Leber, Niere, Herz und Muskel exprimiert, wo man ihm eine Rolle im Metabolismus von Fettsäuren zuspricht (Su et al., 1998). Er ist daher das Ziel von Medikamenten der Fibrat-Klasse wie Benzafibrat oder Clofibrat. PPAR β ist ubiquitär vorhanden und wird oft in grösseren Mengen exprimiert wie die anderen PPARs. Obwohl man über die spezifische Funktion dieser Form des Rezeptors nur wenig weiss, spielt er wahrscheinlich eine nicht unwesentlich Rolle in der Plazentation

(Forman et al., 1996). Die wahrscheinlich am meisten erforschte Form ist PPAR γ , der in einer grossen Vielfalt von Zellen exprimiert wird, zu denen Adipozyten, Makrophagen und Enterozyten des Kolons zählen. PPAR γ existiert in mehreren Isoformen (PPAR γ -1 bis PPAR γ -7), die durch alternatives *splicing* am 5' Ende des Genes entstehen. Zum Beispiel enthält PPAR γ -1 im Vergleich zu PPAR γ -2 am N-terminalen Ende zusätzlich 28 Aminosäuren (Fajas et al., 1997). PPAR γ -1 wird zusätzlich auch in glatter Gefässmuskulatur (Staels et al., 1998) und von Makrophagen (Nagy et al., 1998; Ricote et al., 1998) exprimiert. Genau wie andere Mitglieder der nukleären Rezeptorfamilie reguliert auch PPAR γ die Gen-Expression indem er Heterodimere mit dem Retinoid X-Rezeptor (RXR) bildet, nachdem er durch einen Liganden aktiviert wurde (Siehe Abb. 2.1.). Das PPAR/RXR Heterodimer bindet an eine bestimmte Nukleotidsequenz, das *peroxisome proliferator response elements* (PPRE), das sich in der Promotor-Region von Zielgenen befinden (Murphy et al., 2000). Die gesamte PPRE Sequenz enthält ein so genanntes DR1 Muster (DR für *direct repeat*, 1 für eine Base, welche die beiden AGGTCA-Sequenzen trennt). Dieses DR1 Muster ist spezifisch für das PPAR/RXR-Heterodimer und unterscheidet sich so deutlich von Mustern anderer nukleärer Rezeptoren wie zum Beispiel DR3 (Östrogenrezeptor oder Vitamin-D-Rezeptor) oder DR4 (Thyroidhormonrezeptor) (Kassam et al., 1998).



PPAR: Peroxisome proliferator-activated receptor
 RXR: Retinoid X-Rezeptor (RXR)
 PPRE: Peroxisome Proliferator Response Element

Abbildung 2.1.: Der *peroxisome proliferator-activated receptor* (modifiziert nach Künli et Saurat, 2003)

2.2. Die Glitazone

Der endogene Ligand für PPAR γ ist noch nicht identifiziert worden, obwohl Arachnoidonsäure-Metaboliten wie 15-deoxy-12,14-Prostaglandin I₂ (15d-PG-I₂) oder langkettige ungesättigte Fettsäuren wie Linolensäure (ω -6, C 18:2) eventuell in Frage kommen (Krey et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass die Glitazone, wie Troglitazone, Pioglitazone, Ciglitazone und Rosiglitazone als synthetische Liganden PPAR γ aktivieren können und so ihre Wirkung entfalten (Spiegelmann, 1998). Sie werden bereits klinisch als orale Antidiabetika beim nicht insulinabhängigem Typ-II-Diabetes eingesetzt (Lehmann et al., 1995). Die Glitazone senken dabei den peripheren Glucosespiegel nicht über eine erhöhte Insulinsekretion aus dem Pankreas sondern erhöhen die Ansprechbarkeit der peripheren Insulinrezeptoren und wirken somit als Insulin *Sensitizer*. Rosiglitazone und Pioglitazone sind bereits

für die Behandlung des Typ-II-Diabetes unter dem Handelsnamen Actos® und Avandia® zugelassen.

Eine weitere Indikation für die klinische Anwendung der Glitazone besteht in ihrer Wirkung als nicht steroidale anti-inflammatorische Medikamente (Lehmann et al., 1997). Neuere Forschungen haben zusätzlich gezeigt, dass PPAR γ -Liganden die zelluläre Differenzierung induzieren und das Wachstum von Karzinomen verschiedener Gewebe wie Brust (Elstner et al., 1998) , Prostata (Kubota et al., 1998), Lunge (Tsubouchi et al., 2000), Kolon (Sarraf et al., 1998), Magen (Sato et al., 2000), Blase (Guan et al., 1999) und Pankreas (Motomura et al., 2000) mindern können. Andererseits wurden in humanen Kolonkarzinomen Mutationen im PPAR γ -Gen gefunden, was die Vermutung zulässt, dass das PPAR γ -Gen die Funktion eines Tumor Supressor Gens besitzt (Sarraf et al., 1999) und der Funktionsverlust dieses Gens für die Progression des Tumors verantwortlich ist. Aus dieser Janusköpfigen Funktion der PPAR γ bei Tumoren wird das Interesse einer pharmakologischen Beeinflussung deutlich.

III. Material

1. Die Melanomzelllinien

Es wurden sechs verschiedene humane kutane Melanomzelllinien verwendet. Die Zelllinien Mel6, etabliert aus einem Primärtumor (Rauth et al., 1998) und MV3 aus einer Lymphknotenmetastase (Edward 2001), sowie die Zelllinie MeWo aus einer Lymphknotenmetastase (Carey et al., 1976), wurden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Moll (Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Venerologie, Kopf- und Hautzentrum des Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf) zur Verfügung gestellt. Die Zelllinie G361 wurde aus einem Primärtumor etabliert und von der American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA, ATCC No. CRL-1424) bezogen. Die Zelllinie Lox, etabliert aus einer Lymphknotenmetastase (Fostad et al., 1988a) und die Zelllinie FemX-1, ebenfalls aus einer Lymphknotenmetastase (Fostad et al., 1988b) wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. O. Fostad (Abteilung für Tumorbioogie, Universitätskrankenhaus Oslo, Norwegen) zur Verfügung gestellt.

2. Die Glitazone

Als PPAR γ Agonisten wurden Ciglitazone (CALBIOCHEM, Schwalbach, Deutschland), Pioglitazone (TAKEDA Chemical Industries, Osaka, Japan), Rosiglitazone (GlaxoSmithKline, Hamburg, Deutschland) und Troglitazone (freundlicherweise von Frau Prof. M. Schachner, ZMNH, Hamburg, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Alle vier Glitazone wurden in 100% Ethanol gelöst und mit 10% Ethanol weiter verdünnt.

IV. Methoden

1. Zellproliferationsassays

1.1. Zellkultur

Die Arbeiten mit den Zelllinien erfolgten ausschliesslich unter einer *Hera Safe* Sicherheitsbank (Heraeus Instruments, Deutschland) unter sterilen Bedingungen. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in 50 ml Zellkulturflaschen (Nunclon®, Nunc, Roskilde, Dänemark) unter Standardbedingungen (37°C, 100% Luftfeuchtigkeit, 5% CO₂/95% Luft) in einem *Hera Cell* Brutschrank (Heraeus Instruments, Deutschland). Als Nährmedium diente RPMI Medium (Gibco® RPMI Medium 1640, Invitrogen, Carlsbad, USA), welches zusätzlich mit 10% hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (FCS, Gibco®), 2 mM L-Glutamin (Gibco®), 100 U/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin (Gibco®) versetzt wurde. Dieses Medium wird im Weiteren als Kulturmedium bezeichnet. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte je nach Wachstum der Zelllinien zwei- bis dreimal pro Woche. Dazu wurde das alte Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit 15 ml PBS (Gibco® Dulbecco's Phosphat-Buffered Saline, Invitrogen, Carlsbad, USA) gespült und anschliessend mit je 5 ml Trypsin-EDTA (Gibco® Trypsin-EDTA, Invitrogen, Carlsbad, USA) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, wodurch sich die Zellen vom Flaschenboden lösten. Nach dem Ablösen der Zellen vom Flaschenboden (nach circa 5 minütiger Inkubation), erfolgte die Zugabe von 5 ml Kulturmedium, um das Trypsin-EDTA zu inaktivieren und damit die Ablösungsreaktion zu beenden und eine Schädigung der Zellen durch das Trypsin-EDTA zu verhindern. Abschliessend wurden die abgelösten Zellen auf neue Zellkulturflaschen verteilt, die bereits mit 50 ml Kulturmedium aufgefüllt waren, oder die Zellen wurden für die Zellproliferationsexperimente eingesetzt. Da für die Standardisierung und Reproduktion der Experimente eine hohe Zellzahl erforderlich war, wurden vor Beginn aller Experimente alle sechs Zelllinien über mehrere Wochen in Zellkulturflaschen vermehrt und ein Suspensionspool von jeder der sechs verschiedenen Zelllinien erstellt. Die Suspensionen wurden fünf Minuten bei 1500

U/min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die entstandenen Zellpellets wurden mit Gefriermedium (Cryo-safe Ir, c.c. pro GmbH, Neustadt, Deutschland) resuspendiert und in Einfrierröhrchen (Nunc Cryo Tube Vials, Nalge Nunc, Roskilde, Dänemark) auf identische Aliquots von 1,5 ml verteilt. Die Aliquots wurden über Nacht auf -80°C gekühlt und abschliessend in flüssigem Stickstoff kryo-konserviert. Für die im weiteren beschriebenen Zellproliferationsexperimente wurden jeweils ein bis zwei Aliquots pro Zelllinie aufgetaut, auf Zellkulturflaschen verteilt und drei bis vier Wochen lang in Kultur gehalten, bis eine ausreichende Zellzahl herangewachsen war, um die Versuche durchführen zu können.

1.2. Detektion von Mykoplasmen-Kontamination in der Zellkultur

Zur Überprüfung der Zellkultur auf Kontamination durch Mykoplasmen wurde das VenorGeM®.Mykoplasmen-Detektionskit (Minerva Biolabs GmbH, Berlin, Deutschland) auf der Basis der Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Der Test ist zum Nachweis der typischerweise als Kontamination in Zellkulturen auftretenden Mykoplasmenspezies geeignet und wurde entsprechend der Angaben des Herstellers durchgeführt. Vor Beginn aller Versuche mit Zellkultur wurden alle Zelllinien auf Mykoplasmen getestet. Bei keiner der Zelllinien konnte eine Kontamination durch Mykoplasmen detektiert werden.

1.3. Zellzählung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde eine Zählkammer nach Neubauer eingesetzt. Zunächst wurde aus der Zellsuspension mit Hilfe von PBS (Gibco®) eine Verdünnung von 1:10 hergestellt. Anschliessend wurden je 10 μl der Verdünnung in eine Zählkammer pipettiert und die insgesamt acht Grossquadrate wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt. Da ein Grossquadrat des Volumen von $0,1 \text{ mm}^3$ besitzt, musste man, um die Zellzahl pro ml zu erhalten, die gezählte Zellzahl durch die Anzahl der gezählten Quadrate teilen und danach mit dem Faktor 1000 und dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multiplizieren.

$$\frac{\text{Gezählte Zellzahl (8 Grossquadrate zu je } 1 \text{ mm}^3) \times 1000 \times \text{Verdünnungsfaktor (10)}}{\text{Anzahl der Grossquadrate (8)}} = \text{Zellzahl / ml}$$

Abbildung 1.1.: Formel für die Zellzahlberechnung mittels Zählkammer nach Neubauer

1.4. Erstellen von Eichkurven

Da in den folgenden Zellproliferationsassays der Einfluss von den vier Glitazonen Rosiglitazone, Pioglitazone, Ciglitazone, Troglitazone auf das Wachstum der verschiedenen Melanomzelllinien untersucht werden sollte, war es im Vorfeld wichtig, diejenige Zellkonzentration zu finden, die ein optimales Wachstumsverhalten über die Versuchsdauer von 72 Stunden gewährleistet. Ein optimales Wachstumsverhalten ist dann gegeben, wenn sich die Zellen im exponentiellen Wachstum befinden. Dies bedeutet, dass die Zellzahl nicht zu gross gewählt werden darf, damit innerhalb von 72 Stunden keine Wachstumshemmung aufgrund einer überhöhten Zellzahl auftritt. Die Zellzahl darf aber auch nicht zu klein gewählt sein, wodurch eventuell eine maximale Hemmung verschleiert würde. Dazu wurde für jede Zelllinie eine Eichkurve erstellt. Zunächst wurde für jede Zelllinie eine Verdünnungsreihe ausgehend von 8×10^4 Zellen/ml über verschiedene Verdünnungsschritte mit Kulturmedium bis zu einer Zellzahl von 2×10^3 Zellen/ml erstellt. Für jede Zellzahl wurden vierfach Ansätze erstellt, wobei jeweils $70 \mu\text{l}$ Zellsuspension in jeden Napf auf eine Mikrotiterplatte (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) gegeben wurde. Zusätzlich wurde pro Mikrotiterplatte ein Vierfachansatz mit jeweils $70 \mu\text{l}$ Kulturmedium als Leerwert für den ELISA-Reader pipettiert. Anschliessend erfolgte eine Inkubation im Brutschrank für 48 Stunden unter den bereits beschriebenen Standardbedingungen. Danach wurde in jeden Napf auf der Mikrotiterplatte $30 \mu\text{l}$ 10% Ethanol pipettiert, was genau der Menge entspricht, in der später die gelösten Testsubstanzen zugefügt wurden. Dadurch sollten eventuelle Änderungen der Extinktion durch die Zugabe von Ethanol

berücksichtigt werden. Abschliessend wurden die Mikrotiterplatten für weitere 48 Stunden inkubiert. Zur Ermittlung der Zelldichte wurde insgesamt 72 Stunden nach dem Aussäen der *Cell Proliferation Kit II* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) benutzt. Dafür wurden *XTT labeling reagent* und *electron coupling reagent* in einer Konzentration von 50 : 1 gemischt, was einer XTT Endkonzentration von 0,3 mg pro ml entspricht. Von dieser Konzentration wurden jeweils 50 µl pro Napf auf die Mikrotiterplatte pipettiert und die Platten zur weiteren Inkubation zurück in den Brutschrank gegeben. Zunächst wurde die Extinktion nach 5, 12 und 24 Stunden im ELISA-Reader gemessen. Da sich der fünf Stunden Wert als optimales Zeitfenster für die Auswertung des XTT Assays herausstellte, wurden alle weiteren Messungen mit dem XTT Assay nach einer Inkubationszeit von fünf Stunden durchgeführt.

1.5. Zellproliferationsassays mit Zusatz von Glitazonen

Zum Aussäen der einzelnen Melanomzellreihen auf die Mikrotiterplatten wurde jeweils diejenige Zellkonzentration gewählt, die ein optimales Wachstum für die Versuchsdauer von 72 Stunden gewährleistete. Die jeweiligen Zellzahlen /ml sind in Tabelle 1.4. zusammengefasst.

Zelllinie	Mel6	MV3	Lox	G361	MeWo	FemX-1
Zellzahl/ ml	14 000	14 000	16 000	16 000	15 000	14 000

Tabelle 1.1.: Zusammenfassende Darstellung der Zellzahlen/ml, die ein optimales Wachstum der jeweiligen Zelllinien über die Versuchsdauer von 72 Stunden gewährleisteten.

Auf den einzelnen Mikrotiterplatten wurde jeder Versuch in einem Vierfachansatz durchgeführt und jeder Versuch wurde in mindestens drei unabhängigen Versuchen wiederholt. Dies wurde für alle sechs Melanomzelllinien und jedes der vier Glitazone durchgeführt. So lagen am Ende für jeden einzelnen Versuch insgesamt mindestens 12 Messwerte vor. Zuerst wurde auf jede Mikrotiterplatte in jeweils vier Näpfe 70 µl des Kulturmediums pipettiert. Diese vier Näpfe dienten später dem ELISA-Reader als Leerwert. Als nächstes wurden, analog des Pipettierschemas (siehe Tabelle 1.2.) die

übrigen Näpfe mit jeweils 70 µl der Zellsuspension gefüllt. Die Zellkonzentration der Zellsuspension richtete sich nach der jeweiligen Eichkurve der entsprechenden Melanomzellreihe (Siehe Tabelle 1.1.). Anschliessend wurden die Mikrotiterplatten im Brutschrank für 72 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert, um ein optimales Anwachsen der Zellen am Boden der Näpfe zu gewährleisten. Nach dieser Anwachsphase sollten die verschiedenen Glitazone in gelöster Form den einzelnen Nöpfen zugesetzt werden. Da sich die Glitazone schwer lösen liessen, wurden im Vorfeld Versuche mit verschiedenen Lösungsmitteln, wie DMSO, Methanol und verschiedenen Konzentrationen von Ethanol durchgeführt. Da Ethanol die besten Ergebnisse lieferte, wurden für die weiteren Versuche alle Glitazone zunächst in 100% Ethanol gelöst und anschliessend in einer Verdünnungsreihe mit 10% Ethanol weiter verdünnt. Die endgültige Ethanolkonzentration pro Napf lag bei 3%. Um einen möglichen antiproliferativen Einfluss dieser Ethanolkonzentration auf die Melanomzelllinien zu überprüfen, wurde auf jeder Mikrotiterplatte ein Vierfachansatz 3% Ethanols als Kontrolle pipettiert. Diese Kontrolle bestand aus jeweils 70 µl Zellsuspension zu der 30 µl 10% Ethanol gegeben wurde (Siehe Tabelle 1.2.). Die Werte dieser Kontrolle dienten später bei der Auswertung der Zellproliferationassays als 100% Wert, zu denen die übrigen Werte in Relation gesetzt wurden.

Napf	1 – 4	5 - 8	9 - 12	13 - 16	17 - 20	21 - 24	25 - 28	29 - 32	33 - 36	37 - 40
Konzentration [mM]	LEERWERT	KONTROLLE	1	0,5	0,1	0,05	0,01	0,005	0,001	0,0005
Konzentration/ Napf [mM]			0,3	0,15	0,03	0,015	0,003	0,0015	0,0003	0,00015
Zellsuspension [µl]			70	70	70	70	70	70	70	70
Gesamtvolumen [µl]			100	100	100	100	100	100	100	100

Tabelle 1.2. Zusammenfassende Darstellung der Konzentrationen der Glitazone in den einzelnen Nöpfen in mM.

Die Melanomzelllinien wurden mit den verschiedenen Konzentrationen der Glitazone für 48 Stunden im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. 72 Stunden nach dem Aussäen, erfolgte die Auswertung der Zellproliferationsassays mit Hilfe des *Cell Proliferation Kit II* (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim). Dazu wurden *XTT labeling reagent* und *electron coupling reagent* in einem Verhältnis von 50 : 1 gemischt, was einer XTT Endkonzentration von 0,3 mg/ml entspricht. Von dieser Konzentration wurden jeweils 50 µl in jeden Napf der Mikrotiterplatte gegeben. Nach fünf Stunden wurde anschliessend bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm die Extinktion im ELISA-Reader gemessen.

1.6. Statistische Auswertungen

Für alle statistischen Berechnungen und Graphen wurde die Software *Graph Pad Prism* (Intuitive Software for Science, San Diego, USA) verwendet, wobei p-Werte < 0,05 als statistisch signifikant bewertet wurden. Zuerst wurde jedes der vier Glitazone auf seine Wirkung auf die sechs Melanomzelllinien untersucht. Dazu wurden die ELISA-Reader Werte in Prozent zum Kontrollwert gesetzt und mit steigender Konzentration graphisch aufgetragen. Um Aussagen treffen zu können, ab welcher Konzentration eine statistisch signifikante Hemmung auftritt, wurde ein *Friedman-Test* mit anschliessendem *Dunn's post-Test* vorgenommen. Die Auswahl der statistischen Tests erfolgte mit der freundlichen Unterstützung von Herrn Prof. Dr. Berger.

Als nächstes sollten Aussagen über die unterschiedliche Wirkung eines Glitazones auf die sechs Melanomzelllinien getroffen werden. Da alle Zelllinien bei allen Glitazonen ab einer Konzentration von 0,015 mM einen kontinuierlichen Abfall ihres Zellwachstums aufwiesen, wurde nur dieser Bereich betrachtet. Die gesamte Hemmung, die ein Glitazone auf eine Zelllinie ab einer Konzentration von 0,015 mM aufweist, entspricht der Fläche unter der Kurve ab dieser Konzentration. Die errechneten Flächen unter den Kurven der einzelnen Melanomzelllinien wurden anschliessend mit Hilfe eines *one-way ANOVA Tests* mit darauf folgendem *Tukey-Test* verglichen. Des weiteren sollten Aussagen gemacht werden, wie jede einzelne Melanomzelllinie auf die vier unterschiedlichen Glitazone reagiert. Dazu wurde für

jede Zelllinie ein Graph erstellt, die Konzentration bestimmt, ab der eine signifikante Hemmung auftrat und die Flächen unter den Kurven ab einer Konzentration von 0,015 mM wie oben beschrieben miteinander verglichen. Für alle Ergebnisse wurde zusätzlich die Standardabweichung bestimmt und graphisch dargestellt.

2. Immunhistochemische Färbungen

Für den immunhistochemischen Nachweis des PPAR γ wurde jede der sechs Melanomzelllinien und zusätzlich als Positivkontrolle *human processed lipoaspirate* (PLA) Zellen, auf 8-Kammer-Objektträger, *Falcon® Culture Slide* (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden (37°C und 5% CO₂) wurden die Zellen mit PBS-Puffer (Gibco® Dulbecco's Phosphat-Buffered Saline, Invitrogen, Carlsbad, USA) gespült und mit 4% Paraformaldehyd für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschliessend wurden die Zellen mit Methanol für 10 Minuten bei Raumtemperatur permeabilisiert und danach drei mal 5 Minuten mit 0,1% Triton X-100 in TBS-Puffer (Trizma Base, NaCl, HCl, pH 7,6) gespült, um eine zusätzliche nukleare Permeabilität zu erreichen. Nachdem die unspezifischen Bindungen mit normalem Schweine-Serum (Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:10 für 30 Minuten bei Raumtemperatur blockiert wurden, wurden die Zellen mit dem primären PPAR- γ Antikörper (polyclonal rabbit anti-human, Santa Cruz, Biotechnology Inc., USA) in einer Konzentration von 1:50 über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaliger Spülung mit TBS (pH 7,6) folgte eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur mit dem biotinierten sekundären Antikörper (Swine anti-rabbit, Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:200. Für die Verdünnung des Schweine-Serums, des primären und sekundären Antikörpers wurde jeweils *DAKO Antibody Diluent* (Dako, Glostrup, Dänemark) verwendet. Nach erneuter Spülung mit TBS (pH 7,6) wurden die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem *Vectastain®-ABC-AP Kit* (Vector Laboratories, Burlingame, USA) inkubiert. Nach mehrfacher Spülung mit TBS (pH 7,6) wurde die Aktivität der alkalischen Phosphatase mit Neufuchsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) nachgewiesen: 7,5 ml einer 4% Natriumnitritlösung (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) wurden mit 300 μ l Neufuchsin-Stammlösung (5g Neufuchsin

in 100 ml 2 N HCL) gemischt. Anschliessend wurden sofort 30 mg Naphthol-AS-Biphosphat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in 750 µl Dimethylformamid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) gelöst und als Substrat für die alkalische Phosphatase hinzugegeben. Die *Falcon®-Culture Slides* wurden in dieser Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Anschliessend wurde die Reaktion unter fliessendem Leitungswasser (5 Minuten) gestoppt. Zuletzt wurden die Präparate mit *Crystal/Mount* (Biomedica Corporation, Foster City, USA) beschichtet und danach mit *Permanent Mounting Media* (Biomedica, Foster City, USA) mit einem Deckglas versehen. Um die Spezifität des immunhistochemischen Nachweises zu gewährleisten, wurden bei jeder Färbung PLA Zellen als Positivkontrolle verwendet. Zusätzlich wurde für jede der sechs Zelllinien eine Negativkontrolle durchgeführt, bei der jeweils der primäre Antikörper weggelassen wurde. Bei keiner der Negativkontrollen konnte eine unspezifische Bindung festgestellt werden. Die Präparate wurden unter einem Photomikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 40-facher Vergrösserung betrachtet und die Lokalisation der Antikörperbindung (zytoplasmatisch und/oder nukleär) beurteilt.

3. Proteinbiochemie

3.1. Isolierung der Proteine aus den Melanomzelllinien

Für die Isolierung der zytoplasmatischen und nukleären Proteine aus den Melanomzelllinien wurde ein modifiziertes Extraktionsprotokoll verwendet, welches ursprünglich von Dignam et al. (1989) beschrieben wurde. Als Positivkontrolle für das Vorhandensein des PPAR γ -Proteins dienten PLA Zellen. Zunächst wurden für jede der sechs Melanomzelllinien und für die Fettgewebszelllinie eine Zellkulturflasche (Nunclon®, Nunc, Roskilde, Denmark) angelegt und diese so lange inkubiert bis ungefähr 90% des Flaschenbodens mit Zellen bedeckt waren. Anschliessend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS (Gibco® Dulbecco's Phosphat-Buffered Saline, Invitrogen, Carlsbad, USA) gewaschen und danach mit einem Zellschaber (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) in 1 ml PBS von dem Flaschenboden gelöst. Die Proben wurden 2 Minuten bei 1000 X g zentrifugiert und der Überstand

abpipettiert. Das Pellet wurde in 200 μ l *low salt* Puffer (20mM HEPES, pH 7,9; 10 mM KCL; 0,1 mM NaVO₄; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 0,2% Nonidet P-40; 10% Glycerol) der vor Gebrauch mit 1% *Protease Inhibitor Cocktail Set I* (Calbiochem®, San Diego, USA) versetzt wurde, resuspendiert. Nach einer Inkubation für 10 Minuten auf Eis, wurden die Proben für 30 Minuten bei 7000 X g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und im Folgenden als zytoplasmatische Proteinlösung verwendet. Das Pellet wurde anschliessend in 100 μ l *high salt* Puffer (20 mM HEPES, pH 7,9; 420 mM NaCl; 10 mM KCL; 0,1 mM NaVO₄; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 20% Glycerol; 1% *Protease Inhibitor Cocktail Set I*) resuspendiert und die nukleären Proteine wurden durch ein 30 minütiges Schütteln auf Eis extrahiert. Danach wurden die Proben für 30 Minuten bei 7000 X g und 4°C zentrifugiert und der Überstand als nukleäre Proteinlösung im Weiteren verwendet.

3.2. Konzentrationsbestimmungen von Proteinlösungen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Dazu wurde zunächst eine *Bradford Stock Solution* bestehend aus 100 ml 95% Ethanol, 200 ml 88% Phosphor Säure und 350 mg Serva Blue G (SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) hergestellt. Vor jeder Proteinbestimmung wurden 30 ml der *Bradford Stock Solution* mit 425 ml Aqua destillata, 15 ml 95% Ethanol, 30 ml 88% Phosphor Säure ein *Bradford Working Buffer* gemischt. Zunächst wurde eine Standardkurve erstellt. Dazu wurde mit einem Protein Standard (Pierce Albumin Standard, Rockford, USA) eine Verdünnungsreihe von 20 μ g/ml bis 180 μ g/ml hergestellt. Für die Verdünnung diente Aqua destillata. Die Verdünnungen wurden mit 1 ml Bradford Working Buffer versetzt, 10 Minuten inkubiert und anschliessend die Optische Dichte (OD) bei 595 nm mit einem Photometer (SmartSpec® 3000 Spectrophotometer, Bio-Rad, München, Deutschland) gemessen. Als Blankwert diente Aqua destillata. Die zu messenden Proteinlösungen wurden in einem Volumen von 100 μ l 1:10 verdünnt, mit 1 ml Bradford Working Buffer versetzt und für 10 Minuten inkubiert. Nach der Bestimmung der OD bei 595 nm konnte anhand der Standardkurve die jeweilige Proteinkonzentration bestimmt werden.

3.3. SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinlösungen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidelektrophorese (Laemmli, 1979; Ornstein-Davis, 1964) mit Hilfe des *Mini-PROTEAN® 3 Cell* (Biorad, München, Deutschland). Für die zytoplasmatischen und die nukleären Proteine wurden jeweils identische Gele verwendet. Die Zusammensetzungen von Trenn- und Sammelgel waren wie folgt:

Trenngel (13%) mit einer Dicke von 1,00 mm:

3,1 ml Aqua destillata

4,3 ml 30% Acrylamid/Bis Solution, 37,5:1 (Bio-Rad, München, Deutschland)

2,5 ml Trenngel-Puffer (1,5 M Tris-HCl, pH 8,8)

0,1 ml 10% SDS (plusone® Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

50 µl 10% APS (Serva, Heidelberg, Germany)

5 µl TEMED (Bio-Rad, München, Deutschland)

Sammelgel (5%) mit einer Dicke von 1,00 mm:

5,7 ml Aqua destillata

1,7 ml 30% Acrylamid/Bis Solution, 37,5:1 (Bio-Rad, München, Deutschland)

2,5 ml Trenngel-Puffer (0,5 M Tris-HCl, pH 6,8)

0,1 ml 10% SDS (plusone® Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)

50 µl 10% APS (Serva, Heidelberg, Germany)

10 µl TEMED (Bio-Rad, München, Deutschland)

Die Probestaschen wurden durch Einstecken eines Kammes in das noch flüssige Sammelgel geschaffen. Pro Tasche wurde eine Proteinmenge von 30 µg aufgetragen. Dazu wurden die Proteinlösungen mit reduzierendem Probenpuffer (3,55 ml Aqua destillata, 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH 6,8, 2,5 ml Glycerol, 2,0 ml 10% SDS, 0,2 ml 0,5% Bromphenol Blau (Bio-Rad, München, Deutschland), 50 µl β-

Mercaptoethanol) auf ein Gesamtvolumen von 40 μ l verdünnt und für 4 Minuten auf 95°C erhitzt. Anschliessend wurden die Proben in die Taschen des Gels pipettiert und die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 60 V bis die Proteinproben das Sammelgel passiert hatten. Danach wurde die Spannung auf 120 V erhöht. Als Proteinmarker wurden 10 μ l des *Full Range Rainbow® Molecular Weight Marker*, (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany). Für die Elektrophorese diente ein Tris/Glycine/SDS Puffer (pH 8,3) als Laufpuffer (Bio-Rad, München, Deutschland).

3.4. Western-Blot Analyse

3.4.1. Elektrophoretischer Transfer

Für den Proteintransfer aus einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran (Hybond®-ECL®, Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) wurde ein *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell* (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet. In der vorausgegangenen Elektrophorese wurde ein Proteinstandard verwendet, dessen farbige Banden auf eine Membran übertragen werden konnten. Nach der SDS-PAGE wurde ein Transferstapel (Schwamm, Filterpapier, Gel, Membran, Filterpapier, Schwamm) luftblasenfrei aufgebaut. Anschliessend wurde der Stapel in die mit Blotpuffer (48mM Tris, 39 mM Glycine, 20% Methanol, pH 9,2) gefüllte Mini Trans-Blot®-Apparatur eingestellt. Der Transfer erfolgte bei 4° C für eine Stunde bei 100 V. Als Kontrolle für einen positiven Transfer diente der übertragende Proteinmarker.

3.4.2. Immunhistochemischer Nachweis der Proteine

Nachdem der elektrophoretische Transfer beendet war, wurde die proteintragende Nitrozellulosemembran für 30 Minuten in *Blocking Buffer* (4% Milchpulver in TBS/0,5% Tween) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend erfolgte die Inkubation mit dem in *Blocking Buffer* 1:200 verdünnten primären Antikörper (polyclonal rabbit anti-human, Santa Cruz, Biotechnology Inc., USA) über Nacht bei

4°C. Nach fünfmaligem Waschen mit Puffer (TBS/0,05% Tween) wurde die Membran mit dem in *Blocking Buffer* 1:200 verdünnten sekundären Antikörper (polyclonal swine anti-rabbit immunoglobulins/HRP, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) geschüttelt (90min, RT). Nach erneutem fünfmaligem Waschen mit Puffer (TBS/0,05 % Tween) erfolgte der Nachweis der Antikörperreaktion.

3.4.3. Antikörpernachweis durch Chemilumineszens

Der Antikörpernachweis wurde mit Hilfe des *Hybond ECL Nitrocellulose Membran*® (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) nachgewiesen. Die Proteinseite der Membran wurde 1 min bei RT mit dem Detektionsreagenz (1:1 Mischung aus ECL-Lösung I und II) beschichtet. Die Lösung wurde entfernt und die Membran kurz getrocknet. Nach luftblasenfreiem Bedecken mit Klarsichtfolie wurde mit der Membran für 1-3 Minuten ein Röntgenfilm (Fuji Medical X-Ray Film, Fuji, Tokyo, Japan) belichtet.

3.4.4. Quantifizierung des Proteinnachweises

Um quantitative Aussagen über den Proteingehalt innerhalb der sechs Melanomzelllinien treffen zu können, wurde die Quantifizierungssoftware *Quantity One*® (Bio-Rad, Hercules, USA) eingesetzt. Dazu wurde zunächst der entwickelte Röntgenfilm eingescannt und anschliessend die Begrenzung der einzelnen Banden umfahren. Das von der Software berechnete *Volume* ergibt sich aus dem Produkt der Summe der Intensitäten der Pixel innerhalb der Begrenzung einer Bande und der Fläche einer Bande. Die daraus errechneten Zahlenwerte erlauben keine Aussagen über die absolute Menge an PPAR γ Protein, liefern aber eine gute Möglichkeit, innerhalb der sechs Zelllinien vergleichende Aussagen über die relative Proteinmenge zu treffen.

V. Ergebnisse

1. Ergebnisse der Zellproliferationsassays

Bei der Auswertung der Zellproliferationsassays wurden zuerst die vier Glitazone einzeln auf ihre jeweilige Wirkung auf die sechs verschiedenen Zelllinien untersucht.

1.1. Die Glitazone

1.1.1. Rosiglitazone

Eine Zusammenfassung der Wirkungen der einzelnen Dosierungen von Rosiglitazone auf die sechs Zelllinien ist in Abbildung 5.1. dargestellt. Rosiglitazone zeigt eine ähnliche Wirkung auf alle sechs Melanomzelllinien: In Konzentrationen von 0,00015 bis 0,0015 mM bewirkt es eine leichte Hemmung des Zellwachstums, die jedoch bei keiner Zelllinie signifikant ist ($p > 0,05$). In Konzentrationen von 0,0015 bis 0,015 mM sieht man einen leichten Anstieg des Zellwachstums, der jedoch bei keiner der Zelllinien signifikant ist ($p > 0,05$). Bereits ab 0,015 mM Rosiglitazone beobachtet man bei der Zelllinie MeWo eine signifikante Hemmung des Zellwachstums auf 81% der Kontrolle ($p < 0,05$). Konzentrationen ab 0,03 mM bewirken bei FemX-1 eine signifikante Hemmung auf 48% der Kontrolle ($p < 0,05$) und bei G361 eine signifikante Hemmung auf 50% der Kontrolle ($p > 0,01$). Ab Konzentrationen von 0,15 mM werden MV3 auf 68% ($p < 0,05$), Lox auf 29% ($p < 0,05$) und Mel6 auf 57% der Kontrolle ($p < 0,001$) signifikant gehemmt. In der höchsten Konzentration von 0,3 mM hemmt Rosiglitazone signifikant alle sechs Zelllinien, MV3 auf 6% der Kontrolle, Mel6 auf 4% der Kontrolle, Lox auf 18% der Kontrolle, MeWo auf 29%, FemX-1 auf 34% und G361 auf 2% der Kontrolle.

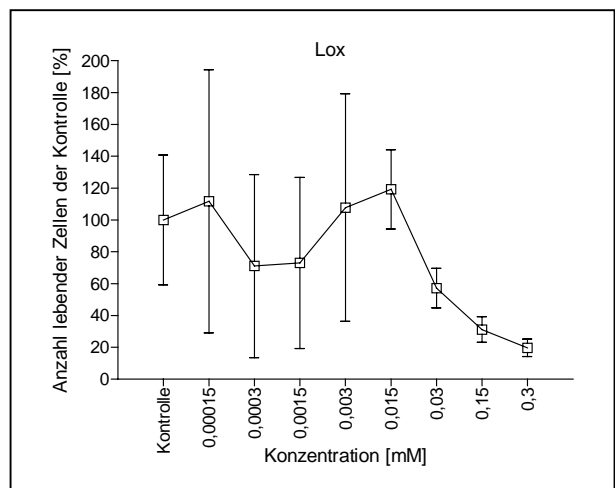
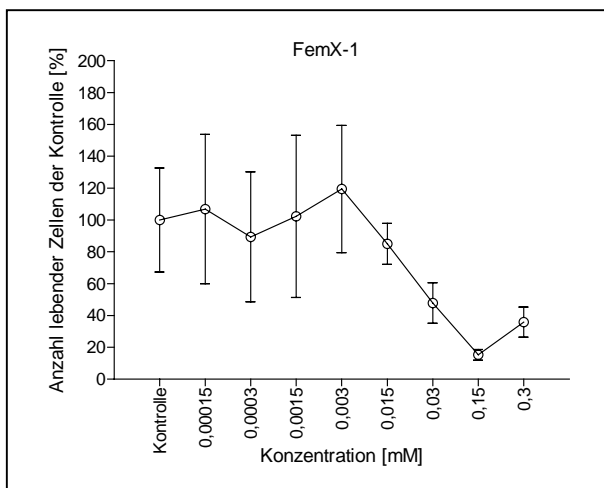
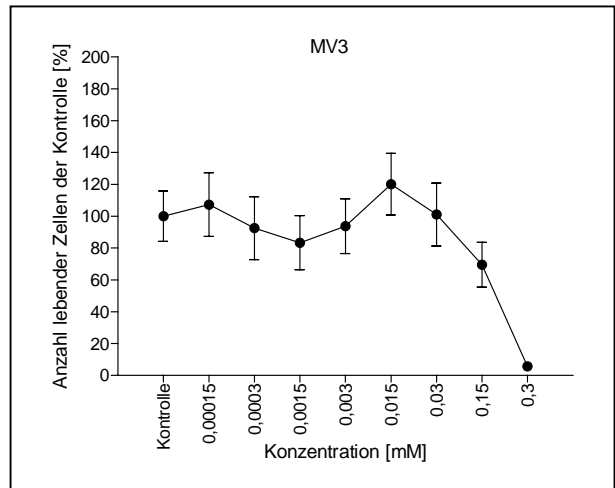
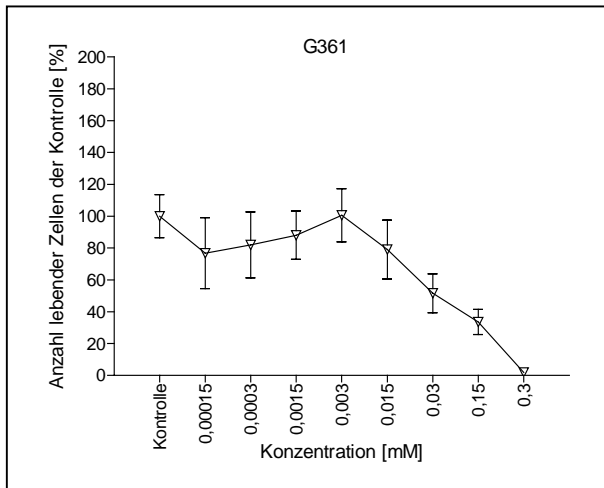
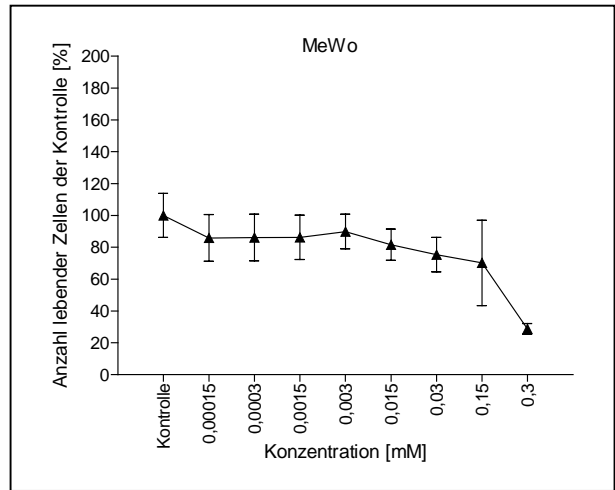
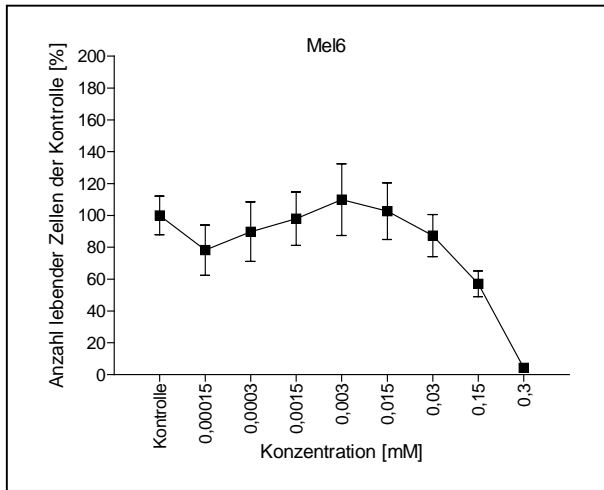


Abbildung 5.1.: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung von Rosiglitazone in unterschiedlichen Konzentrationen auf die sechs Melanomzelllinien.

Vergleicht man die Gesamtwirkung von Rosiglitazone ab einer Konzentration von 0,015 mM auf die verschiedenen Zelllinien (siehe Abbildung 5.2.), so zeigt sich, dass dieses Glitazone signifikant unterschiedlich starke antiproliferative Effekte auf die verschiedenen Melanomzelllinien besitzt. Auf die Zelllinie MV3 ist die antiproliferative Wirkung am wenigsten stark ausgeprägt. Die G361 Zellen werden am stärksten in ihrem Wachstum gehemmt, wobei G361 signifikant besser gehemmt wird als Lox ($p < 0,01$), Mel6 ($p < 0,001$), MeWo ($p < 0,001$) und MV3 ($p < 0,001$), aber nicht signifikant besser als FemX-1 ($p > 0,05$). Im Vergleich dazu wird MV3 signifikant schlechter gehemmt als Lox ($p < 0,001$), FemX-1 ($p < 0,001$) und G361 ($p < 0,001$), aber nicht signifikant schlechter als MeWo ($p > 0,05$) und Mel6 ($p > 0,05$).

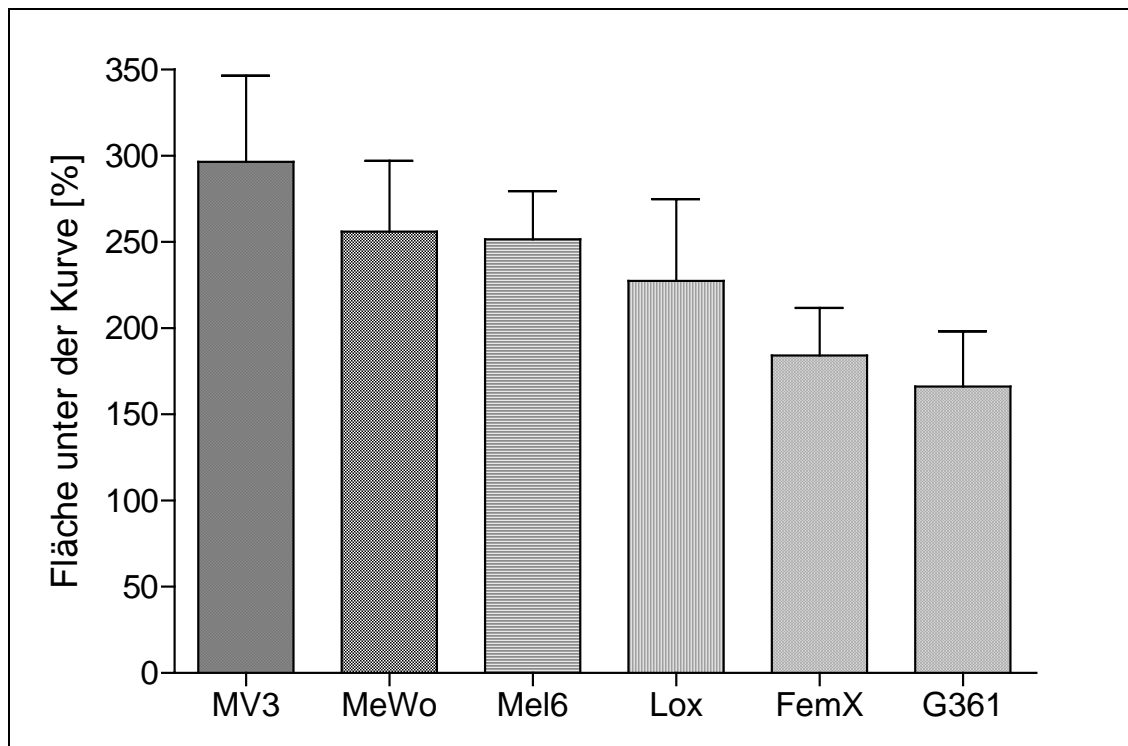


Abbildung 5.2.: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen Wirkung von Rosiglitazone ab einer Konzentration von 0,015 mM. Je geringer die Fläche unter der Kurve ausfällt (vergleiche Abbildung 5.1.), desto besser ist das Ansprechen der jeweiligen Zelllinie auf Rosiglitazone.

1.1.2. Ciglitazone

Eine Zusammenfassung der Wirkungen der einzelnen Dosierungen von Ciglitazone auf die sechs Zelllinien ist in Abbildung 5.3. dargestellt. Die Wirkung von Ciglitazone auf die sechs verschiedenen Melanomzelllinien verhält sich ähnlich wie die von Rosiglitazone: In Konzentrationen von 0,00015 bis 0,0015 mM bewirkt es eine leichte Hemmung des Zellwachstums, die jedoch nur bei Mel6 (0,00015 mM: $p < 0,01$; 0,0003 mM: $p < 0,05$) und MeWo (0,0003 mM: $p < 0,05$) signifikant ist. In Konzentrationsbereichen von 0,0015 bis 0,015 mM lässt sich ein leichter Anstieg des Zellwachstums beobachten, der aber bei keiner der Zelllinien signifikant ist. Ab Konzentrationen von 0,03 mM werden bereits die Zellen Mel6 signifikant auf 60% der Kontrolle gehemmt ($p < 0,01$), MeWo signifikant auf 48% der Kontrolle ($p < 0,05$), FemX-1 signifikant auf 40% der Kontrolle ($p < 0,05$), G361 signifikant auf 51% der Kontrolle ($p < 0,05$) und Lox signifikant auf 39% der Kontrolle ($p < 0,01$). MV3 wird ab einer Konzentration von 0,15 mM signifikant auf 2% der Kontrolle gehemmt ($p < 0,001$). In der höchsten Konzentration von 0,3 mM hemmt Ciglitazone signifikant alle sechs Zelllinien, MV3 auf 2% der Kontrolle, Mel6 auf 2% der Kontrolle, Lox auf 6% der Kontrolle, MeWo auf 3%, FemX-1 auf 2% und G361 auf 17% der Kontrolle.

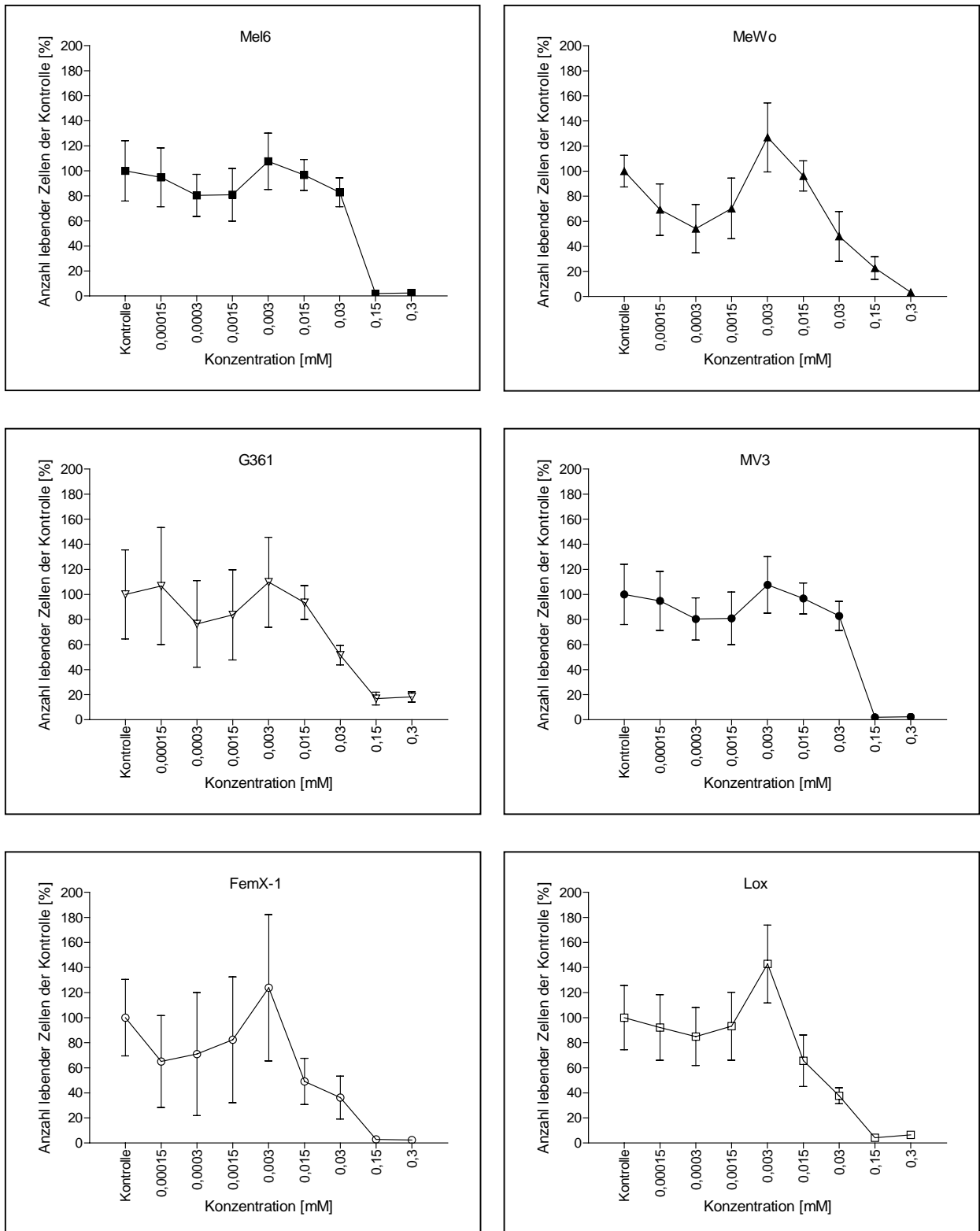


Abbildung 5.3.: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung von Ciglitazone in unterschiedlichen Konzentrationen auf die sechs Melanomzelllinien.

Vergleicht man die Gesamtwirkung von Ciglitazone auf die verschiedenen Zelllinien (siehe Abbildung 5.4.) ab einer Konzentration von 0,015 mM, so sieht man, dass Ciglitazone signifikant unterschiedlich starke antiproliferative Effekte auf die verschiedenen Melanomzelllinien besitzt. Auf die Zelllinie MV3 ist die antiproliferative Wirkung am geringsten ausgeprägt. Die FemX-1 Zellen werden am stärksten in ihrem Wachstum gehemmt, wobei sie signifikant besser als Mel6 ($p < 0,01$), MeWo ($p < 0,01$), G361 ($p < 0,001$) und MV3 ($p < 0,001$) gehemmt werden, aber nicht signifikant besser als Lox ($p > 0,05$). MV3, G361 und MeWo weisen untereinander keinen signifikanten Unterschied im Bezug auf ihre Hemmung auf ($p > 0,05$), werden aber alle signifikant besser durch Ciglitazone gehemmt als Mel6, Lox und FemX-1.

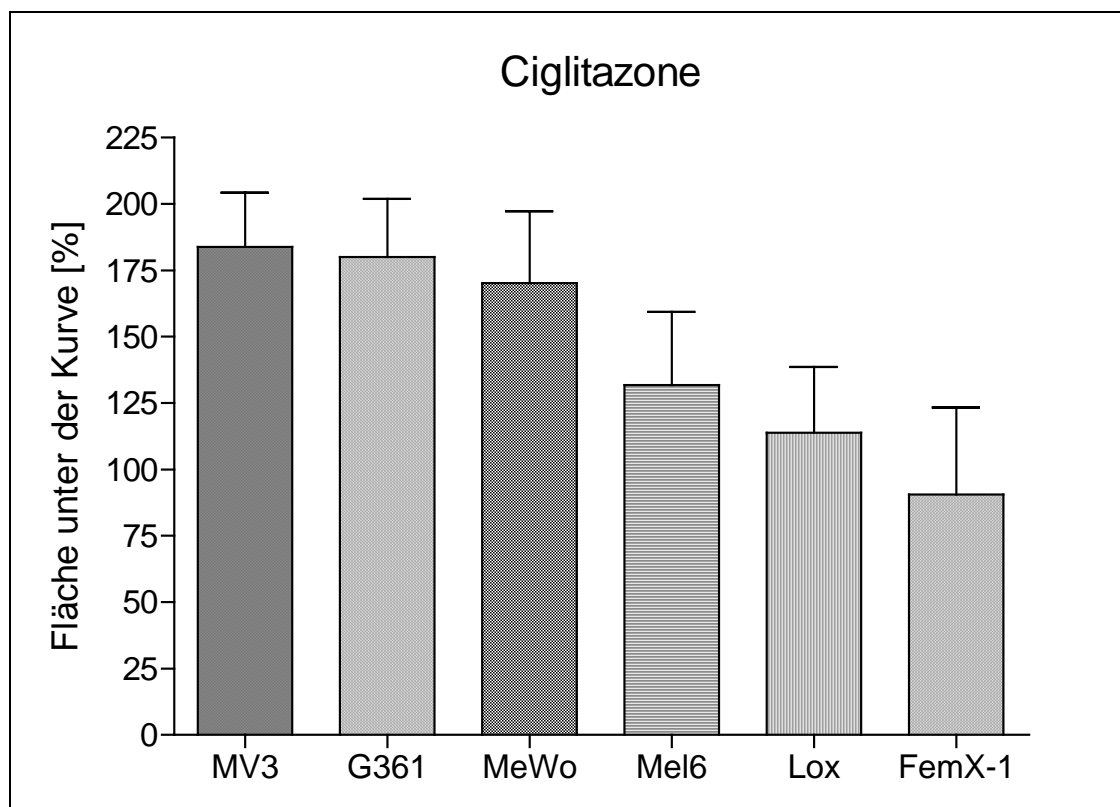


Abbildung 5.4.: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen Wirkung von Ciglitazone ab einer Konzentration von 0,015 mM. Je geringer die Fläche unter der Kurve ausfällt (vergleiche Abbildung 5.3.) ausfällt, desto besser ist das Ansprechen der jeweiligen Zelllinie auf Ciglitazone.

1.1.3. Pioglitazone

Eine Zusammenfassung der Wirkungen der einzelnen Dosierungen von Pioglitazone auf die sechs Zelllinien ist in Abbildung 5.5. dargestellt. Bei Pioglitazone lässt sich bei Konzentrationen zwischen 0,00015 und 0,0015 mM ein leichter Abfall des Zellwachstums beobachten, der aber nur bei Mel6 (0,003 mM: $p < 0,01$), FemX-1 (0,00015 mM: $p < 0,001$; 0,0003 mM: $p < 0,0003$) und MV3 (0,0003 mM: $p < 0,05$; 0,0015 mM: $p < 0,05$) signifikant ist. In Konzentrationsbereichen von 0,0015 mM und 0,015 mM sieht man einen leichten Anstieg des Zellwachstums, der aber bei keiner der sechs Zelllinien signifikant ist ($p > 0,05$). Ab Konzentrationen von 0,03 mM bewirkt Pioglitazone bei Mel6 eine signifikante Hemmung des Zellwachstums auf 47% der Kontrolle ($p < 0,001$), bei MV3 signifikant auf 57% der Kontrolle ($p < 0,001$) und bei Lox signifikant auf 36% der Kontrolle ($p < 0,001$). Ab Konzentrationen von 0,15 mM werden FemX-1 signifikant auf 75% der Kontrolle gehemmt ($p < 0,05$) und ab Konzentrationen von 0,3 mM werden MeWo signifikant auf 81% der Kontrolle ($p < 0,01$) und G361 signifikant auf 54% der Kontrolle gehemmt ($p < 0,001$). In der höchsten Konzentration von 0,3 mM hemmt Pioglitazone signifikant alle sechs Zelllinien: MV3 auf 29% der Kontrolle, Mel6 auf 34% der Kontrolle, Lox auf 40% der Kontrolle, MeWo auf 81%, FemX-1 auf 81% und G361 auf 54% der Kontrolle.

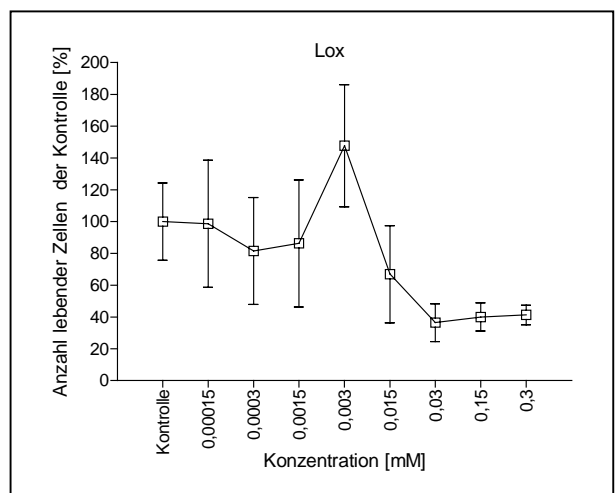
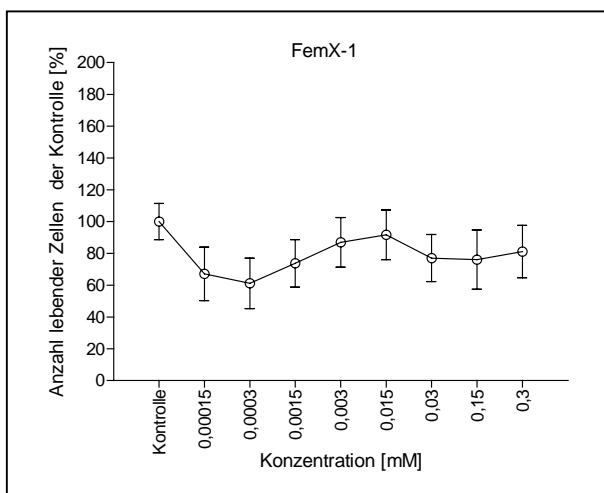
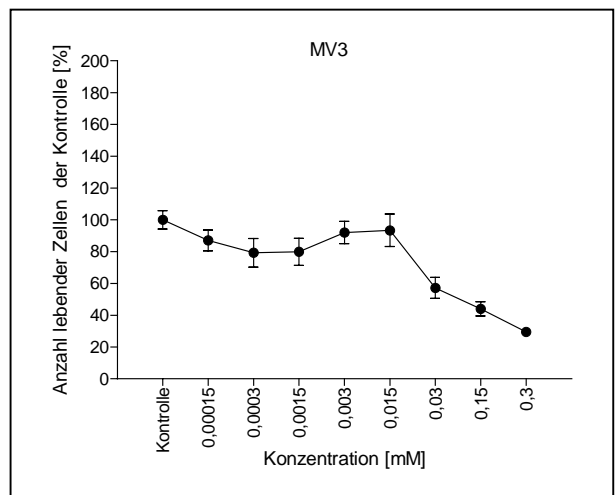
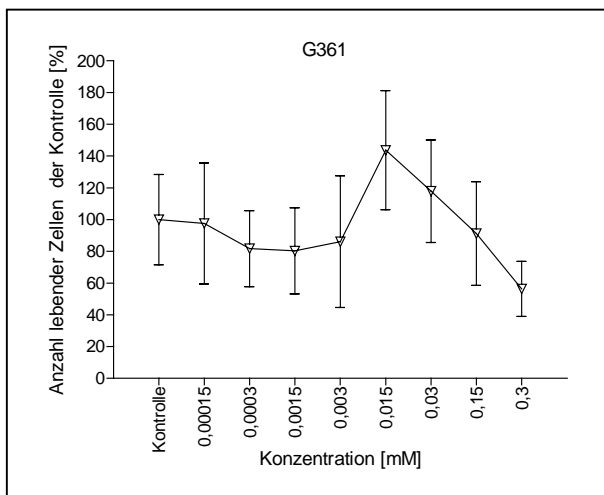
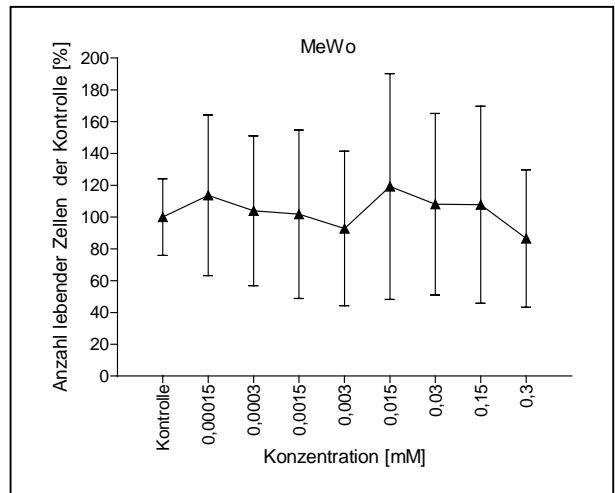
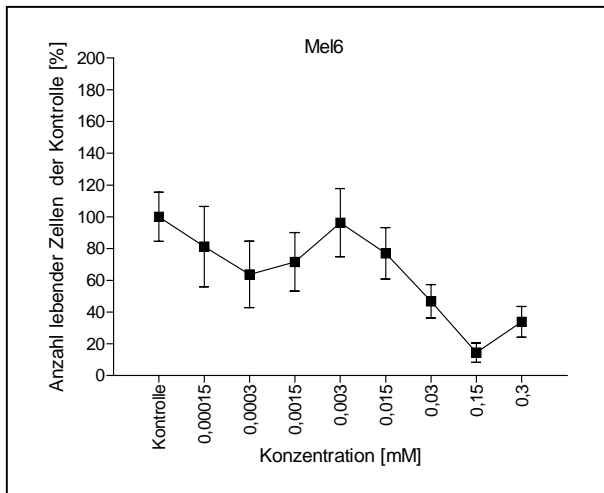


Abbildung 5.5.: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung von Pioglitazone in unterschiedlichen Konzentrationen auf die sechs Melanomzelllinien.

Vergleicht man die Gesamtwirkung von Pioglitazone auf die verschiedenen Zelllinien (siehe Abbildung 5.6.) ab einer Konzentration von 0,015 mM, so zeigt sich, dass Pioglitazone signifikant unterschiedlich starke antiproliferative Effekte auf die verschiedenen Melanomzellen besitzt. MeWo wird am wenigsten stark gehemmt, die Zelllinie Mel6 wird am stärksten in ihrem Wachstum gehemmt. Die Hemmungswirkung auf die Zelllinien MV3, Lox und Mel6 ist untereinander nicht signifikant verschieden ($p > 0,05$). Die Zelllinien MeWo, G361 und FemX-1 zeigen untereinander in Bezug auf ihre Hemmung ebenfalls keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$), werden aber alle signifikant schlechter gehemmt als MV3, Lox und Mel6.

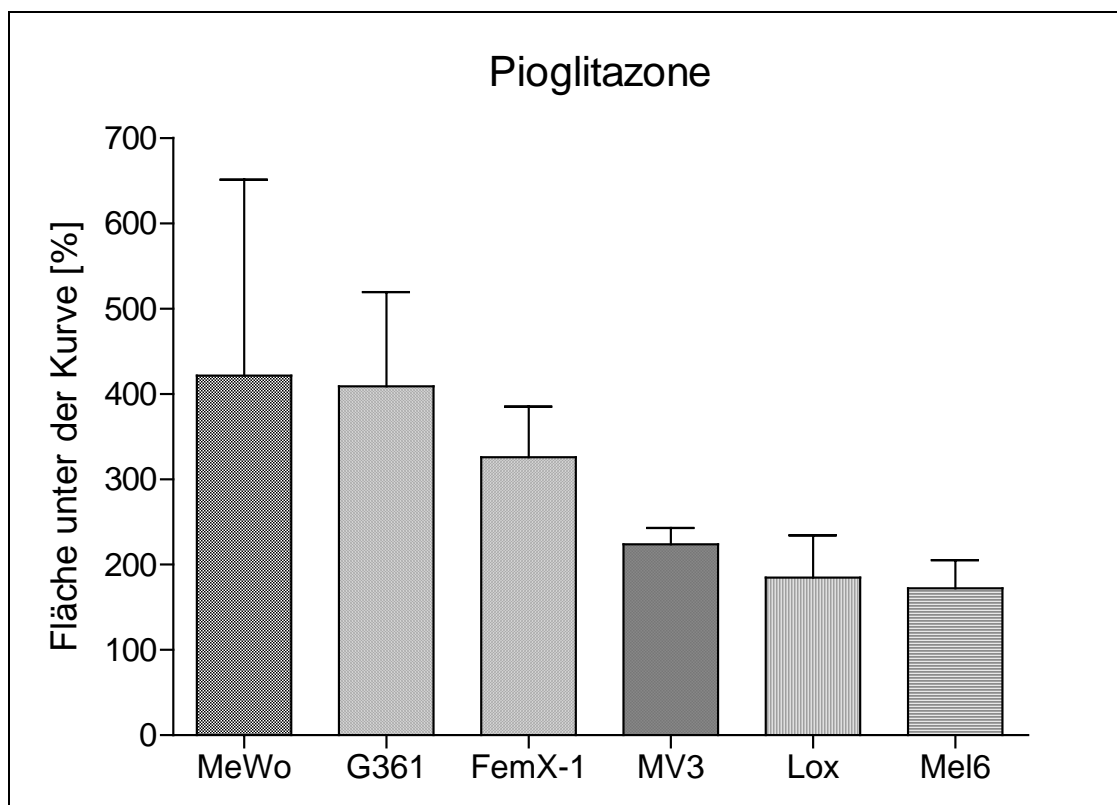


Abbildung 5.6: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen Wirkung von Pioglitazone ab einer Konzentration von 0,015 mM. Je geringer die Fläche unter der Kurve ausfällt (vergleiche Abbildung 5.5.), desto besser ist das Ansprechen der jeweiligen Zelllinie auf Pioglitazone.

1.1.4. Troglitazone

Eine Zusammenfassung der Wirkungen der einzelnen Dosierungen von Troglitazone auf die sechs Zelllinien ist in Abbildung 5.7. dargestellt. Der Kurvenverlauf von Troglitazone entspricht wieder dem der übrigen Glitazone. Im Konzentrationsbereich zwischen 0,00015 und 0,0015 mM sieht man eine leichte Hemmung des Zellwachstums, die aber bei keiner der Zelllinien signifikant ist. Bei Konzentrationen zwischen 0,0015 und 0,015 mM beobachtet man einen leichten Anstieg des Zellwachstums, der bei keiner der sechs Zelllinien signifikant ist. Bereits ab Konzentrationen vom 0,03 mM werden die Zelllinien Mel6 signifikant auf 51% der Kontrolle ($p < 0,01$), MeWo signifikant auf 63% der Kontrolle ($p < 0,01$), FemX-1 signifikant auf 34% der Kontrolle ($p < 0,001$), G361 signifikant auf 46% der Kontrolle ($p < 0,001$) und Lox signifikant auf 23% der Kontrolle gehemmt ($p < 0,05$). MV3 wird ab Konzentrationen von 0,15 mM signifikant auf 11% der Kontrolle gehemmt ($p < 0,05$). In der höchsten Konzentration von 0,3 mM hemmt Troglitazone signifikant alle sechs Zelllinien: MV3 auf 5% der Kontrolle, Mel6 auf 8% der Kontrolle, Lox auf 9% der Kontrolle, MeWo auf 48%, FemX-1 auf 16% und G361 auf 4% der Kontrolle.

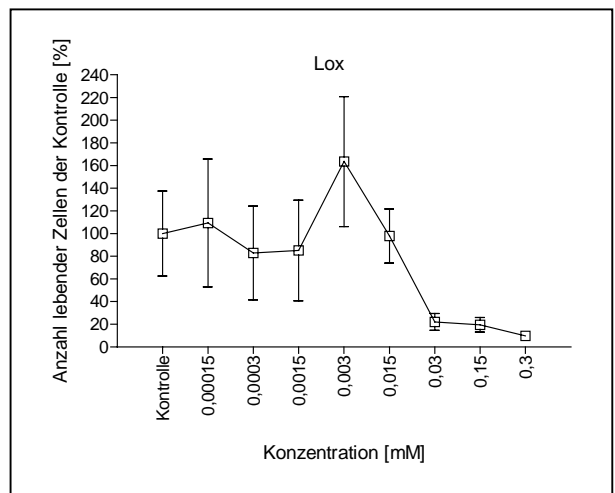
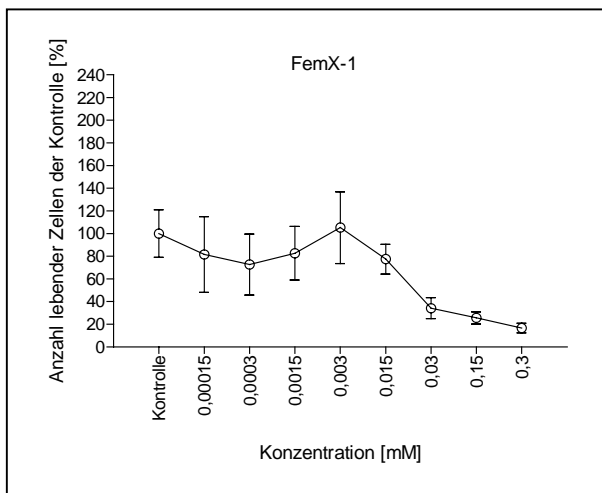
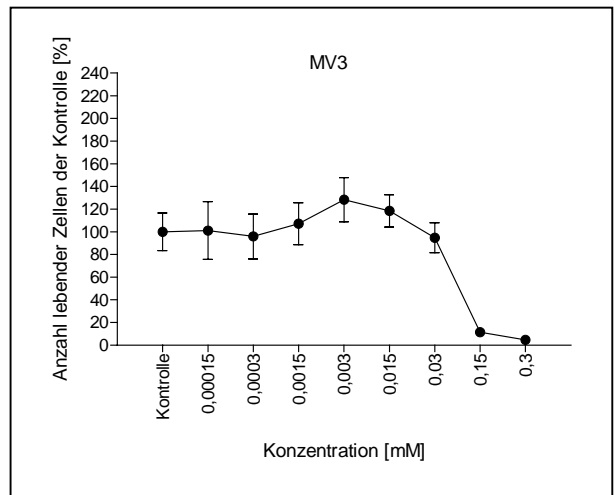
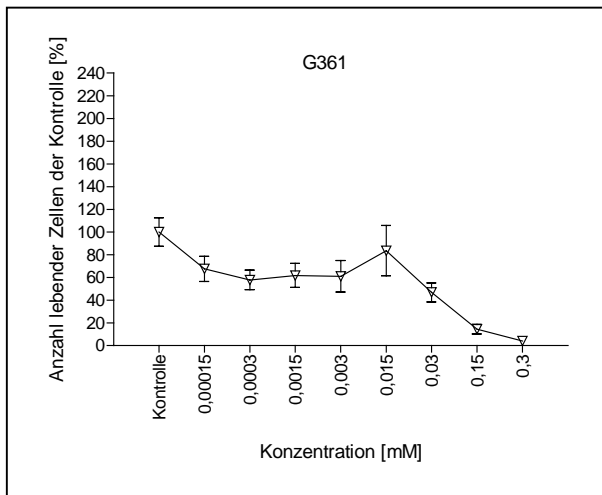
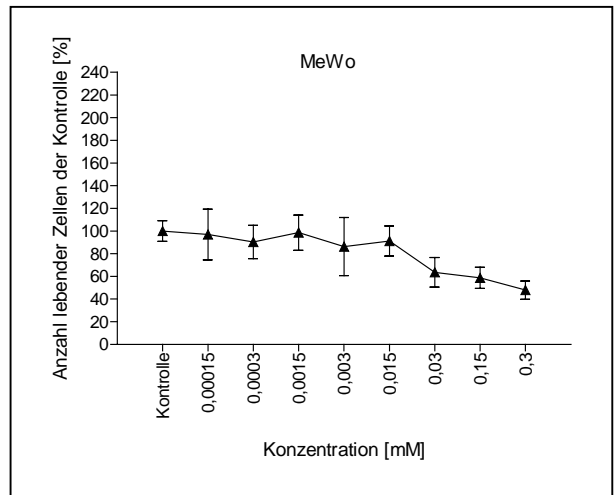
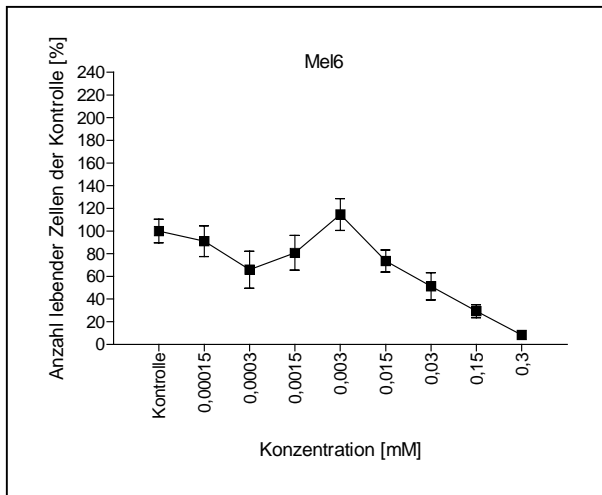


Abbildung 5.7.: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung von Troglitazone in unterschiedlichen Konzentrationen auf die sechs Melanomzelllinien.

Vergleicht man die Gesamtwirkung von Troglitazone auf die verschiedenen Zelllinien (siehe Abbildung 5.8.) ab einer Konzentration von 0,015 mM, so sieht man, dass Troglitazone eine signifikant unterschiedlich starke antiproliferative Wirkung auf die verschiedenen Melanomzellen besitzt. Auf die Zelllinie MeWo ist die antiproliferative Wirkung am wenigsten stark ausgeprägt. Die Zelllinien Mel6, FemX-1, Lox und G361 unterscheiden sich untereinander in Bezug auf ihre Hemmung nicht signifikant ($p > 0,05$), werden aber alle signifikant besser gehemmt als MeWo und MV3. Zwischen Mewo und MV3 besteht kein signifikanter Unterschied in Bezug auf ihre Hemmung ($p > 0,05$).

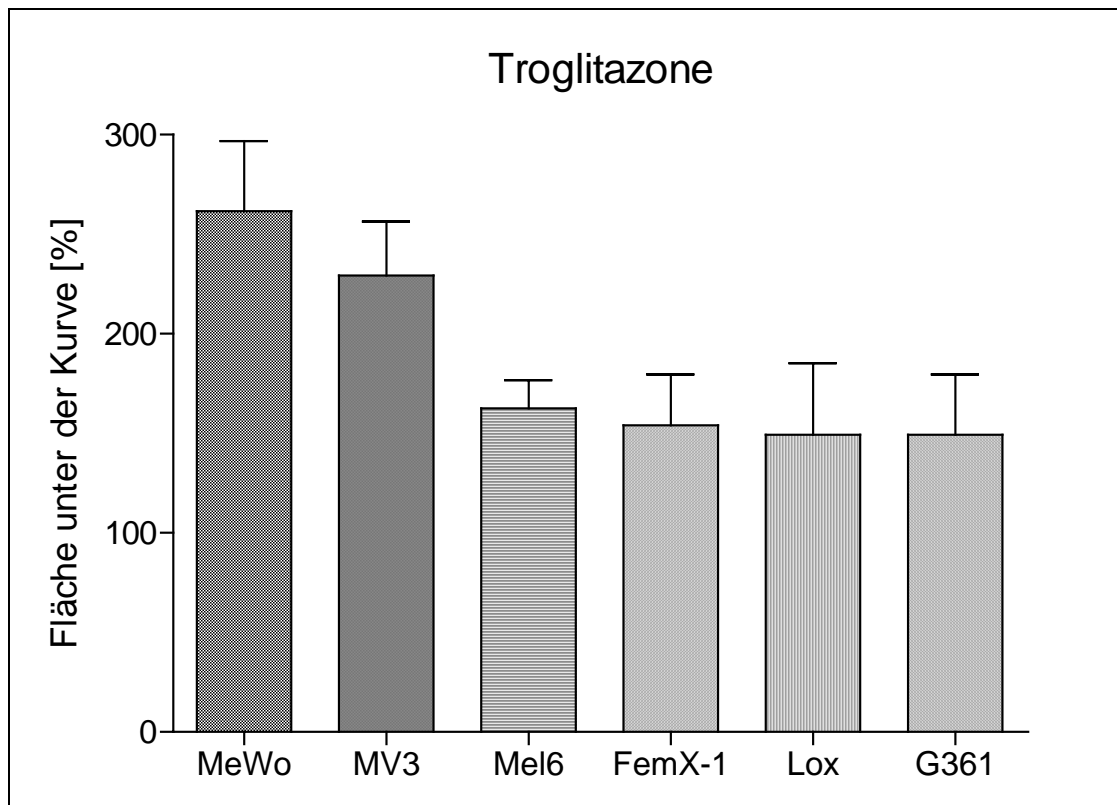


Abbildung 5.8: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen Wirkung von Troglitazone ab einer Konzentration von 0,015 mM. Je geringer die Fläche unter der Kurve ausfällt (vergleiche Abbildung 5.7.), desto besser ist das Ansprechen der jeweiligen Zelllinie auf Troglitazone.

1.1.5. Vergleich der Wirkung der Glitazone untereinander

Um die Frage zu klären, welches der vier untersuchten Glitazone insgesamt die beste antiproliferative Wirkung auf die Melanomzellen besitzt, wurde für jedes Glitazone seine Hemmung auf alle sechs Melanomzelllinien ab einer Konzentration von 0,015 mM zusammengefasst und in Abbildung 5.9. dargestellt. Es zeigte sich, dass Ciglitazone den stärksten antiproliferativen Effekt besitzt, gefolgt von Rosiglitazone und Troglitazone. Den geringsten Effekt besitzt Pioglitazone, wobei nur zwischen Pioglitazone und Ciglitazone ein signifikanter Unterschied besteht ($p < 0,01$).

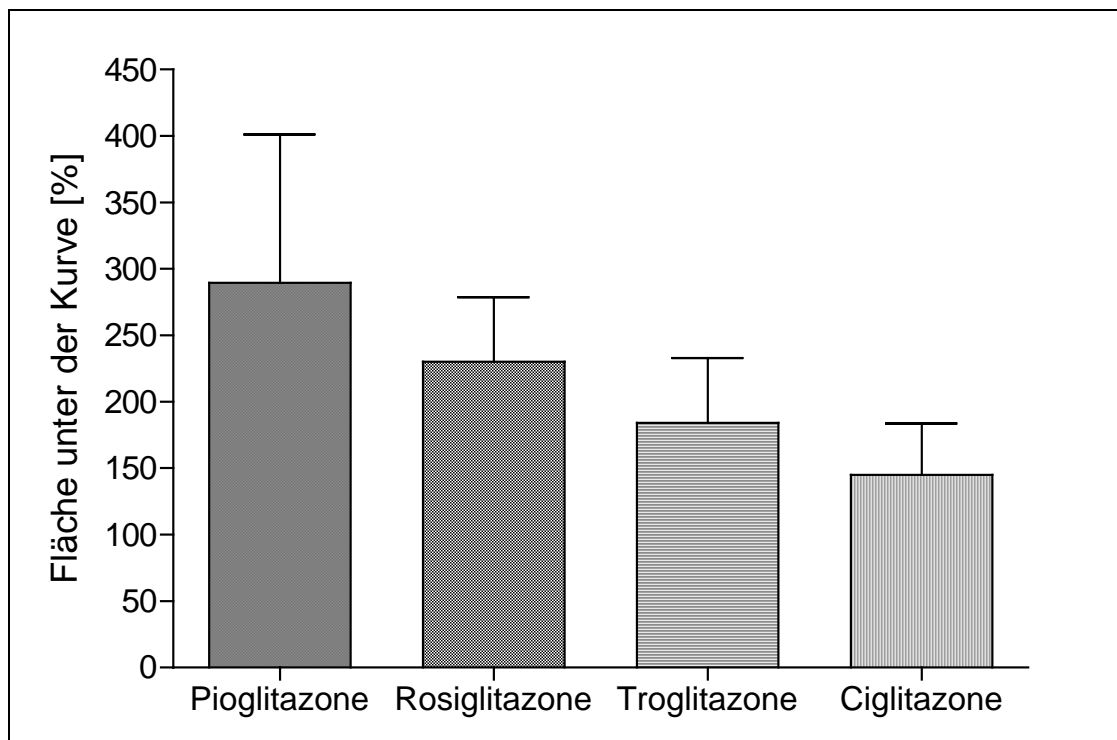


Abbildung 5.9.: Zusammenfassende Darstellung der Gesamtwirkung der Glitazone auf alle sechs Zelllinien. Je kleiner die Fläche unter der Kurve ausfällt, desto grösser ist die Wachstumshemmende Wirkung des Glitazons.

1.2. Die Zelllinien

Um die Empfindlichkeit der einzelnen Zelllinien gegenüber der wachstumsinhibierenden Wirkung der Glitazone zu vergleichen, wurde im Anschluss jede Melanomzelllinie noch einmal separat betrachtet.

1.2.1. MV3

Die Wirkung der unterschiedlichen Konzentrationen der vier Glitazone auf die Zelllinie MV3 ist in Abbildung 5.10. dargestellt. In Konzentrationsbereichen von 0,00015 bis 0,0015 mM sieht man einen leichten Abfall des Zellwachstums, der jedoch nur bei Pioglitazone signifikant ist (0,00015 mM: $p < 0,001$; 0,0003 mM: $p < 0,001$). Zwischen 0,0015 und 0,015 mM beobachtet man einen leichten Anstieg des Zellwachstums, der aber bei keinem der vier Glitazone signifikant ist ($p > 0,05$). Pioglitazone bewirkt bereits ab einer Konzentration von 0,03 mM eine signifikante Hemmung auf 57% der Kontrolle ($p < 0,001$). Ab einer Konzentration von 0,15 mM bewirkt Rosiglitazone eine signifikante Wachstumshemmung auf 11% der Kontrolle ($p < 0,05$), Ciglitazone eine signifikante Hemmung auf 2% der Kontrolle ($p < 0,001$) und Troglitazone eine signifikante Hemmung auf 11% der Kontrolle ($p < 0,05$). In der höchsten Konzentration von 0,3 mM hemmen alle Glitazone das Wachstum von MV3 signifikant: Rosiglitazone auf 6% der Kontrolle, Ciglitazone auf 2% der Kontrolle, Pioglitazone auf 29% der Kontrolle und Troglitazone auf 5% der Kontrolle.

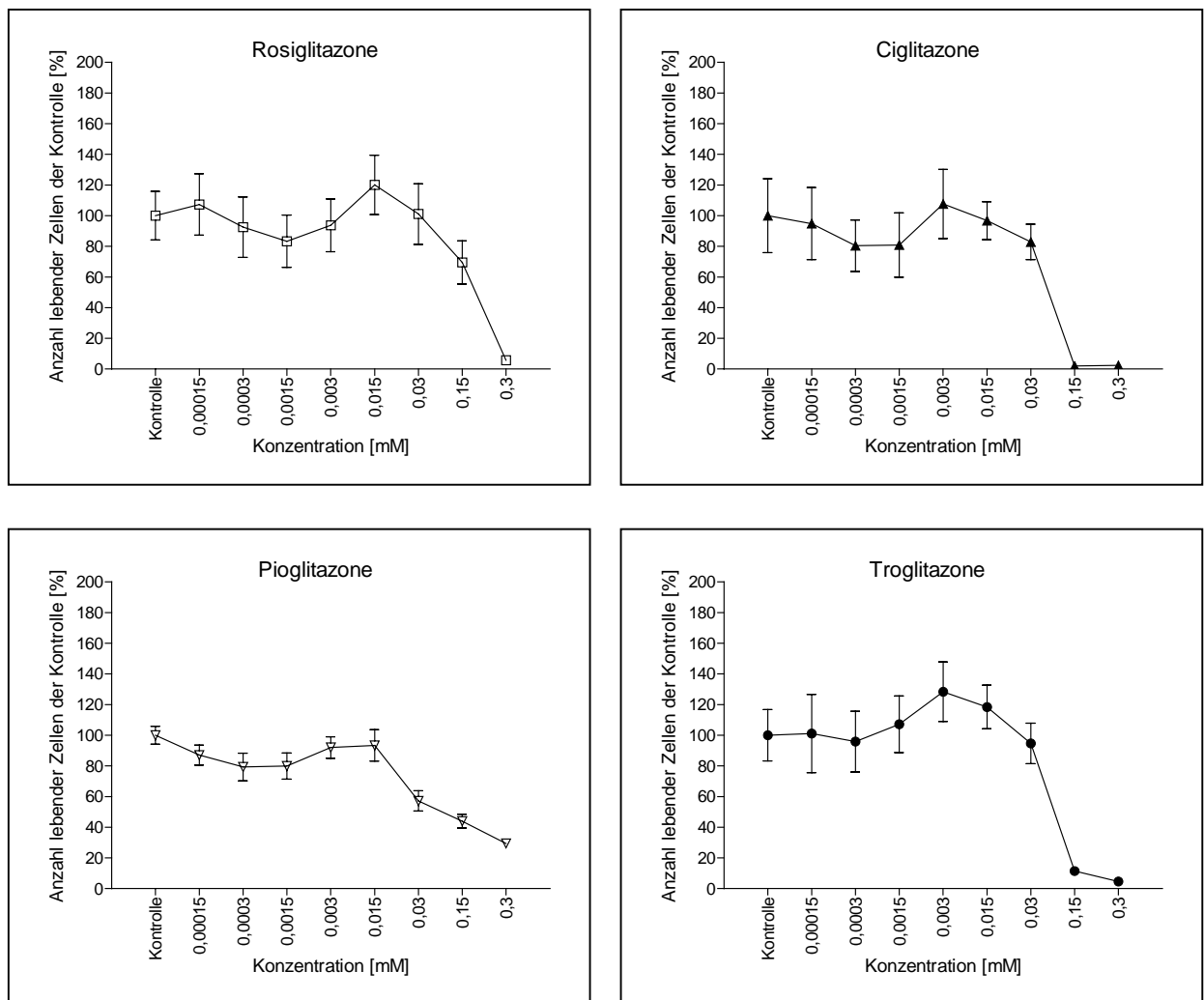


Abbildung 5.10.: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung der Glitazone auf MV3.

Vergleicht man die Gesamthemmung der einzelnen Glitazone auf die Linie MV3 ab einer Konzentration von 0,015 mM (siehe Abbildung 5.11.), so sieht man, dass Rosiglitazone signifikant am schlechtesten hemmt und Ciglitazone signifikant am besten. Zwischen der hemmenden Wirkung von Troglitazone und Pioglitazone besteht kein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$).

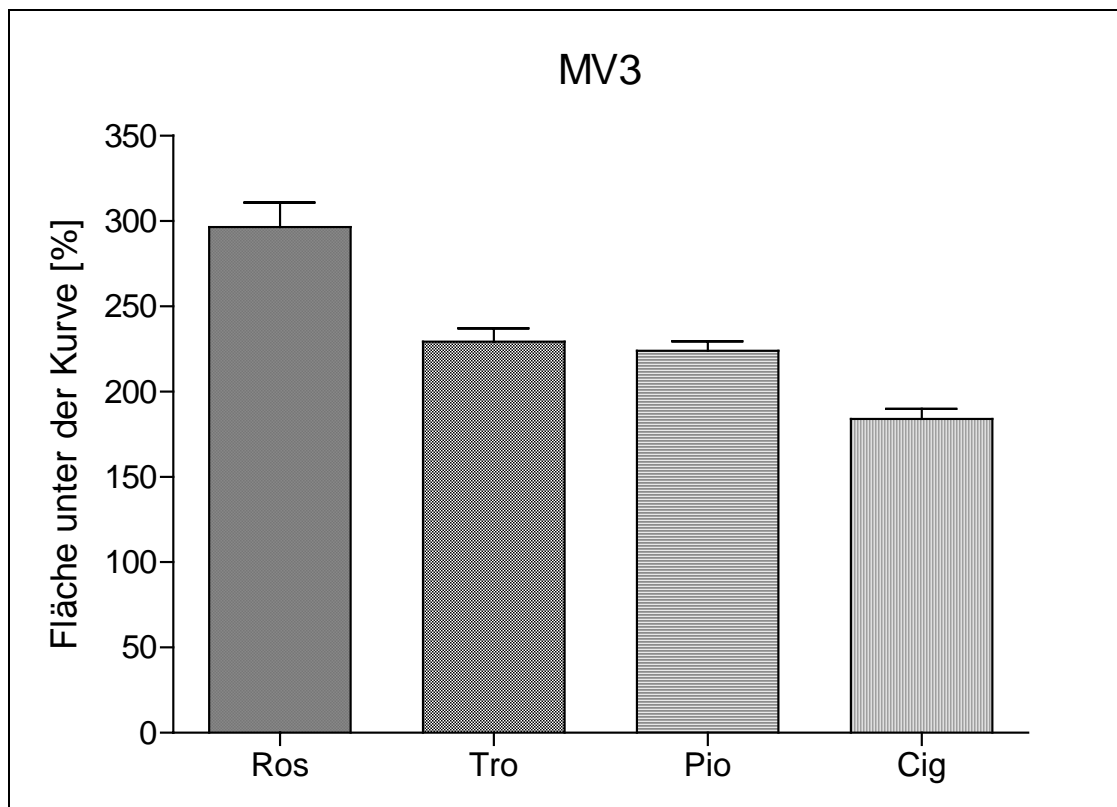


Abbildung 5.11.: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung der Glitazone auf MV3 ab einer Konzentration von 0,015 mM. Je geringer die Fläche unter der Kurve ausfällt (vergleiche Abbildung 5.10.), desto besser ist die wachstumshemmende Eigenschaft des Glitazones auf MV3.

1.2.2. Mel6

Die Wirkung der unterschiedlichen Konzentrationen der vier Glitazone auf die Zelllinie Mel6 ist in Abbildung 5.12. dargestellt. Zwischen 0,00015 und 0,0015 mM beobachtet man eine leichte Hemmung des Zellwachstums, die nur bei Ciglitazone (0,00015 mM: $p < 0,01$; 0,0003 mM: $p < 0,05$), und Pioglitazone (0,0003 mM: $p < 0,01$) signifikant ist. Der leichte Anstieg des Zellwachstums bei Konzentrationen von 0,0015 bis 0,015 mM ist bei keinem der vier Glitazone signifikant ($p > 0,05$). Bereits ab Konzentrationen von 0,03 mM bewirkt Ciglitazone eine signifikante Wachstumshemmung auf 60% der Kontrolle ($p < 0,01$), Pioglitazone eine signifikante Hemmung auf 47% der Kontrolle ($p < 0,001$) und Troglitazone eine signifikante Hemmung auf 51% der Kontrolle ($p < 0,01$). Rosiglitazone bewirkt ab 0,15 mM eine signifikante Wachstumshemmung auf 57% der Kontrolle ($p < 0,001$). In der höchsten Konzentration von 0,3 mM hemmen alle Glitazone das Wachstum von Mel6 signifikant: Rosiglitazone auf 4% der Kontrolle, Ciglitazone auf 2% der Kontrolle,

Pioglitazone auf 34% der Kontrolle und Troglitazone auf 8% der Kontrolle.

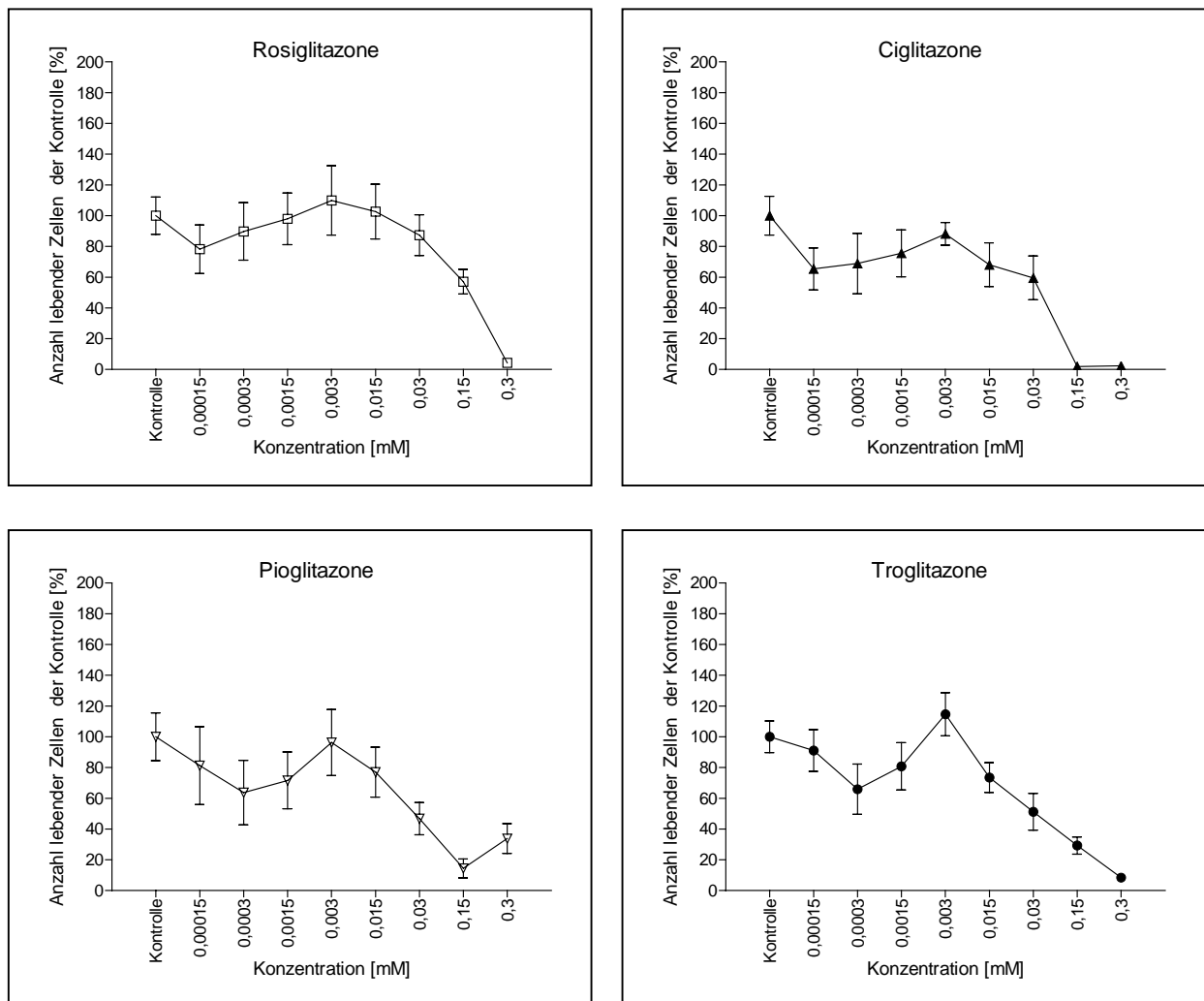


Abbildung 5.12.: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung der Glitazone auf Mel6.

Beim Vergleich der Gesamtwirkung der Glitazone auf die Linie Mel6 ab einer Konzentration von 0,015 mM (siehe Abbildung 5.13.) sieht man, dass Rosiglitazone das Wachstum signifikant schlechter hemmt als die übrigen Glitazone ($p < 0,05$). Ciglitazone, Pioglitazone, Troglitazone unterscheiden sich in ihrer hemmenden Wirkung untereinander nicht signifikant ($p > 0,05$).

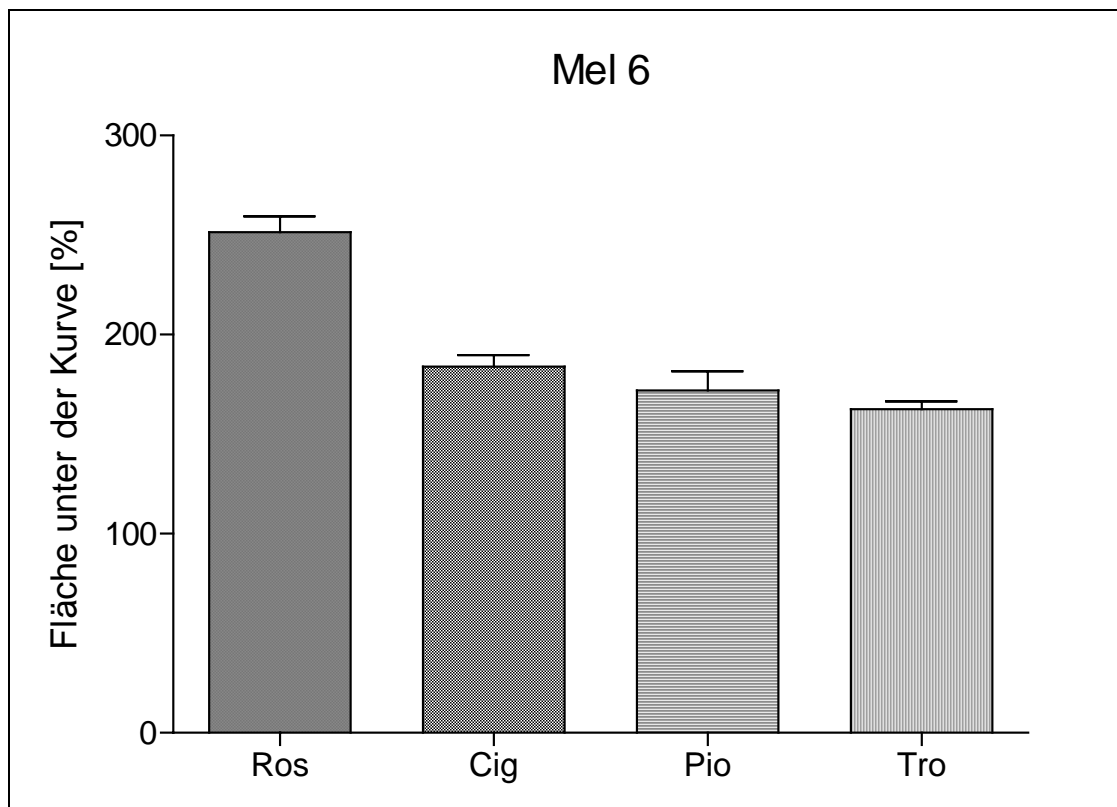


Abbildung 5.13.: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung der Glitazone auf Mel6 ab einer Konzentration von 0,015 mM. Je geringer die Fläche unter der Kurve ausfällt (vergleiche Abbildung 5.12.), desto besser ist die wachstumshemmende Eigenschaft des Glitazones auf Mel6.

1.2.3. Lox

Die Wirkung der unterschiedlichen Konzentrationen der vier Glitazone auf die Zelllinie Lox ist in Abbildung 5.14. dargestellt. Die leicht hemmende Wirkung bei Konzentrationen von 0,00015 bis 0,0015 mM ist bei keinem der vier Glitazone signifikant ($p > 0,05$). Ebenso nicht signifikant ist der zu beobachtende Anstieg des Zellwachstums im Konzentrationsbereich von 0,0015 bis 0,015 mM ($p > 0,05$). Die Lox Zellen werden bereits ab einer Konzentration von 0,03 mM von Ciglitazone signifikant auf 39% der Kontrolle ($p < 0,01$) gehemmt, von Pioglitazone signifikant auf 36% der Kontrolle ($p < 0,001$) und von Troglitazone signifikant auf 23% der Kontrolle ($p < 0,05$). Ab einer Konzentration von 0,15 mM hemmt Rosiglitazone signifikant das Wachstum auf 29% der Kontrolle ($p < 0,05$). In der höchsten Konzentration von 0,3 mM hemmen alle Glitazone das Wachstum von Lox signifikant: Rosiglitazone auf 18% der Kontrolle, Ciglitazone auf 6% der Kontrolle, Pioglitazone auf 40% der Kontrolle und Troglitazone auf 9% der Kontrolle.

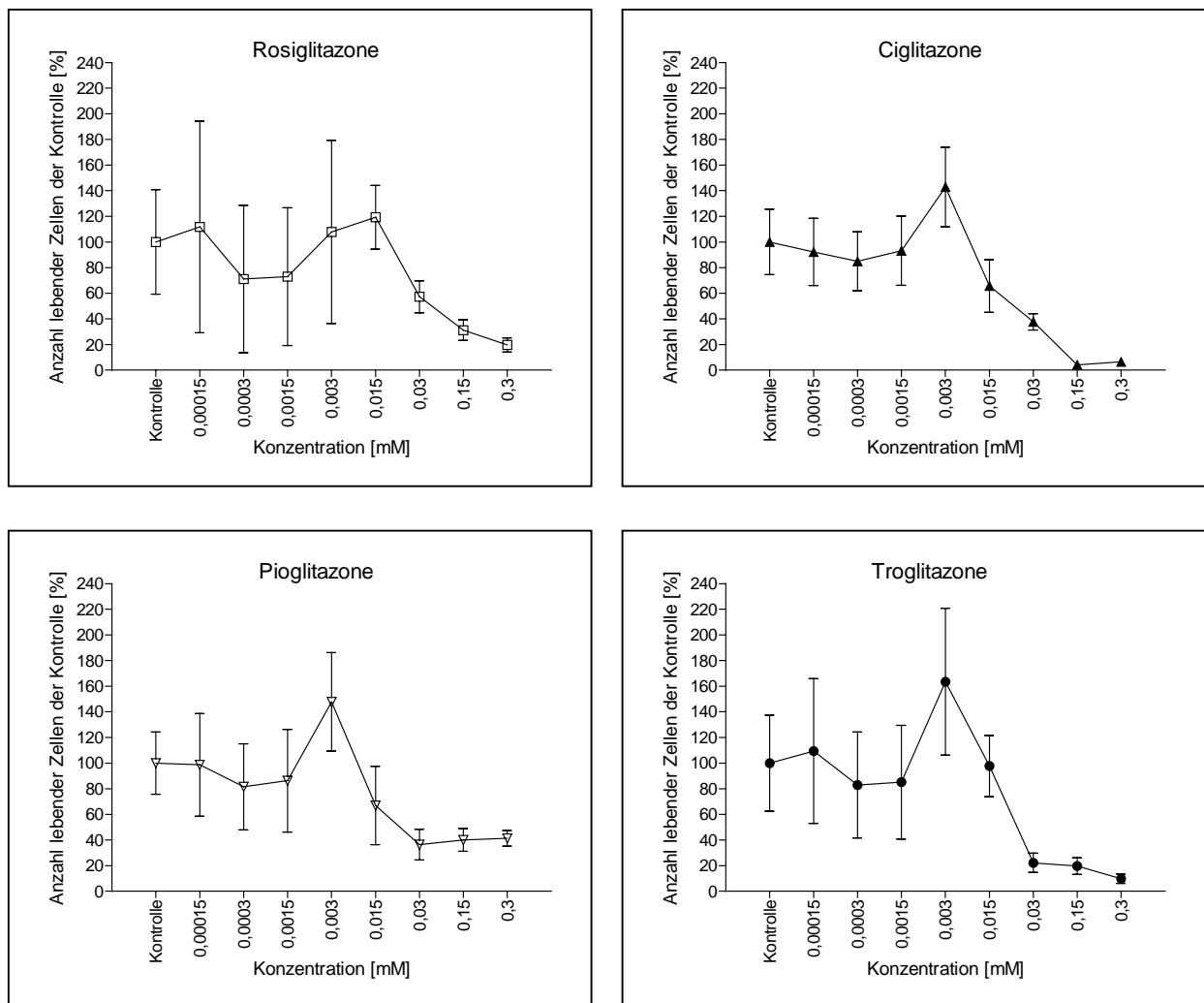


Abbildung 5.14.: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung der Glitazone auf Lox.

Beim Vergleich der Gesamthemmung der Glitazone auf die Lox Zellen zeigt sich ab einer Konzentration von 0,015 mM (siehe Abbildung 5.15.), dass Rosiglitazone signifikant schlechter hemmt als Troglitazone ($p < 0,001$) und Ciglitazone ($p < 0,001$), aber nicht signifikant schlechter als Pioglitazone ($p > 0,05$). Ciglitazone hemmt signifikant besser als Pioglitazone ($p < 0,001$) und Rosiglitazone ($p < 0,001$), aber nicht signifikant besser als Troglitazone ($p > 0,05$). Die hemmende Wirkung von Pioglitazone und Troglitazone unterscheidet sich nicht signifikant ($p > 0,05$).

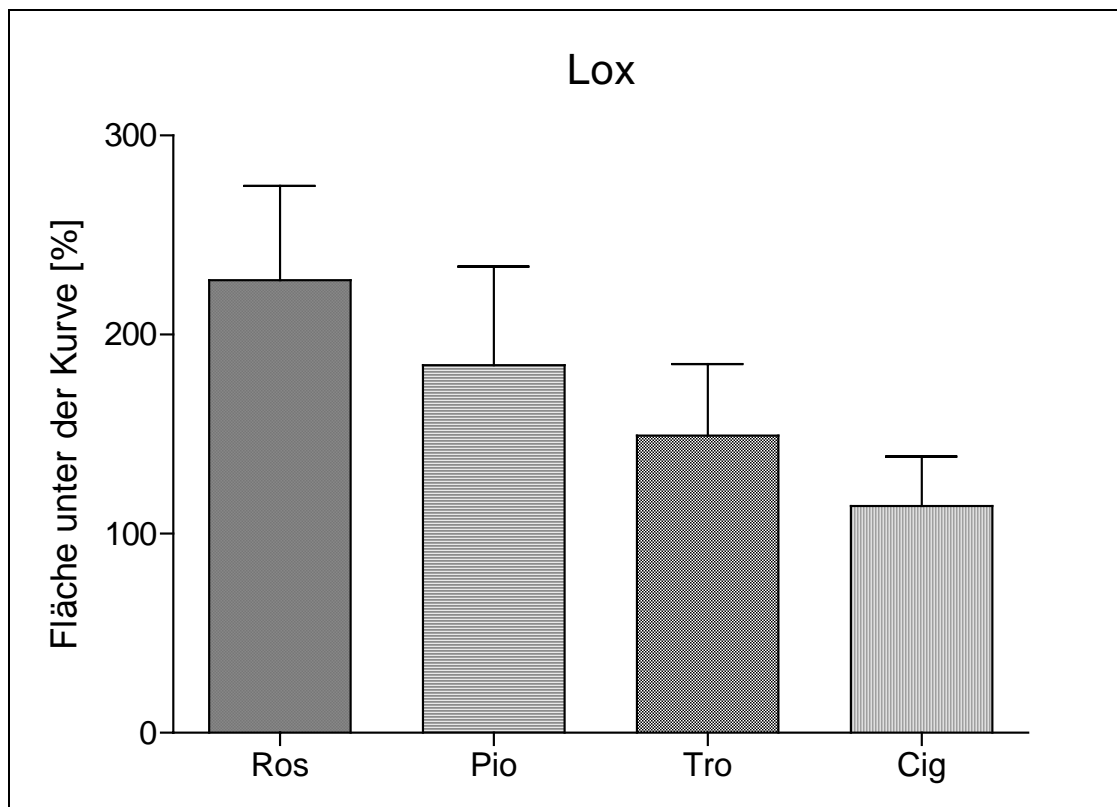


Abbildung 5.15.: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung der Glitazone auf Lox ab einer Konzentration von 0,015 mM. Je geringer die Fläche unter der Kurve ausfällt (vergleiche Abbildung 5.14.), desto besser ist die wachstumshemmende Eigenschaft des Glitazones auf Lox.

1.2.4. MeWo

Die Wirkung der unterschiedlichen Konzentrationen der vier Glitazone auf die Zelllinie MeWo ist in Abbildung 5.16. dargestellt. Der leicht hemmende Einfluss bei Konzentrationen im Bereich von 0,00015 bis 0,0015 mM ist nur bei Ciglitazone (0,0003 mM: $p < 0,05$) signifikant. Der leichte Anstieg des Zellwachstums ist bei keinem der vier Glitazone signifikant ($p > 0,05$). Rosiglitazone hemmt bereits ab einer Konzentration von 0,015 mM das Wachstum signifikant auf 81% der Kontrolle ($p > 0,05$). Ab Konzentrationen von 0,03 mM hemmt Ciglitazone das Wachstum signifikant auf 48% der Kontrolle ($p < 0,05$) und Troglitazone das Wachstum signifikant auf 63% der Kontrolle ($p < 0,01$). Ab einer Konzentration von 0,3 mM hemmt Pioglitazone das Wachstum signifikant auf 81% der Kontrolle ($p < 0,01$). In der höchsten Konzentration von 0,3 mM hemmen alle Glitazone das Wachstum von MeWo signifikant: Rosiglitazone auf 29% der Kontrolle, Ciglitazone auf 3% der Kontrolle, Pioglitazone auf 81% der Kontrolle und Troglitazone auf 48% der Kontrolle.

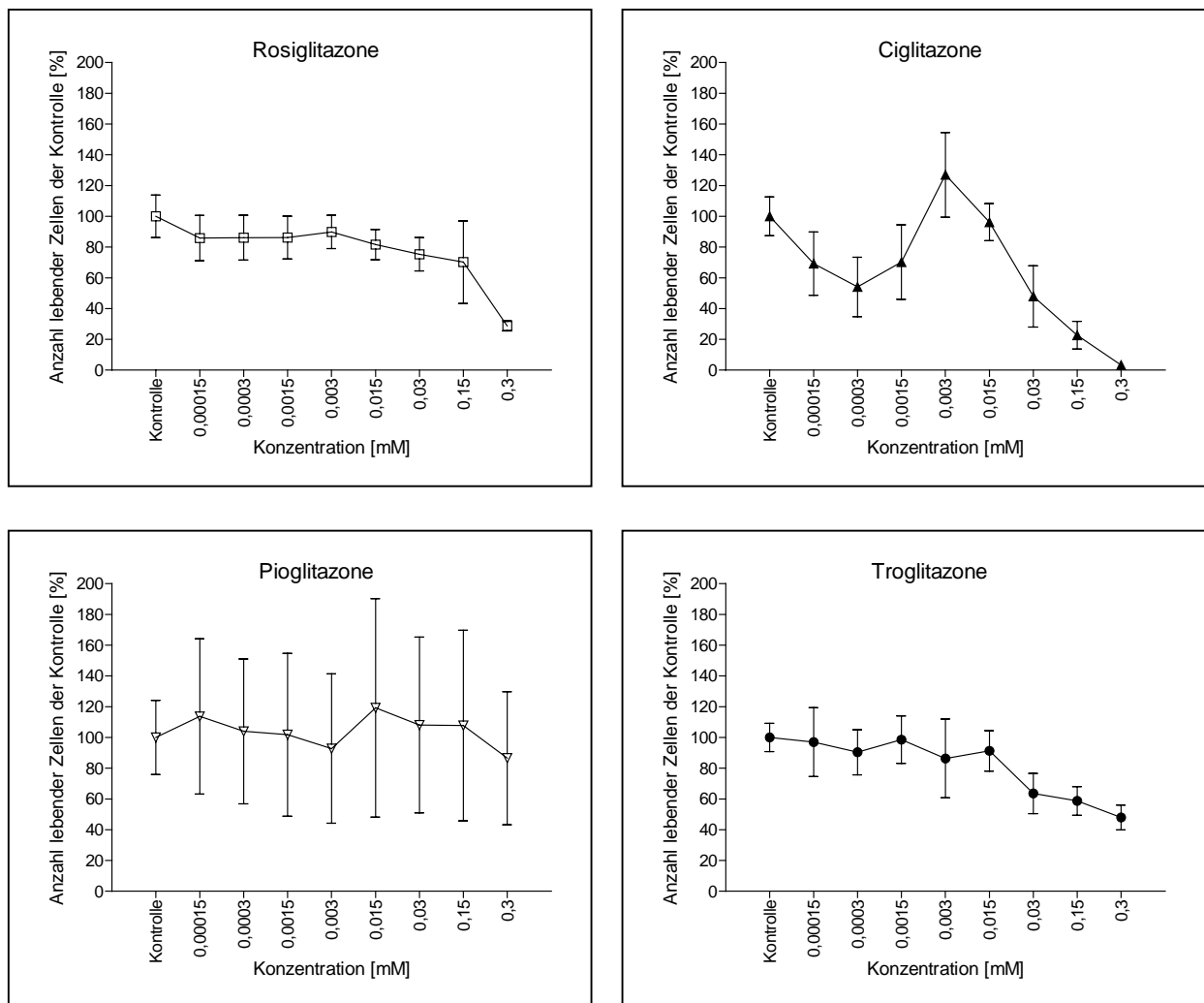


Abbildung 5.16.: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung der Glitazone auf MeWo.

Beim Vergleich der Gesamthemmung der Glitazone auf die MeWo Zellen ab einer Konzentration von 0,015 mM zeigt sich (siehe Abbildung 5.17.), dass Pioglitazone das Zellwachstum der MeWo Zellen signifikant schlechter hemmt als Rosiglitazone ($p < 0,01$), Ciglitazone ($p < 0,001$), Troglitazone ($p < 0,05$). Rosiglitazone, Ciglitazone und Troglitazone unterscheiden sich nicht signifikant im Bezug auf ihre Hemmung.

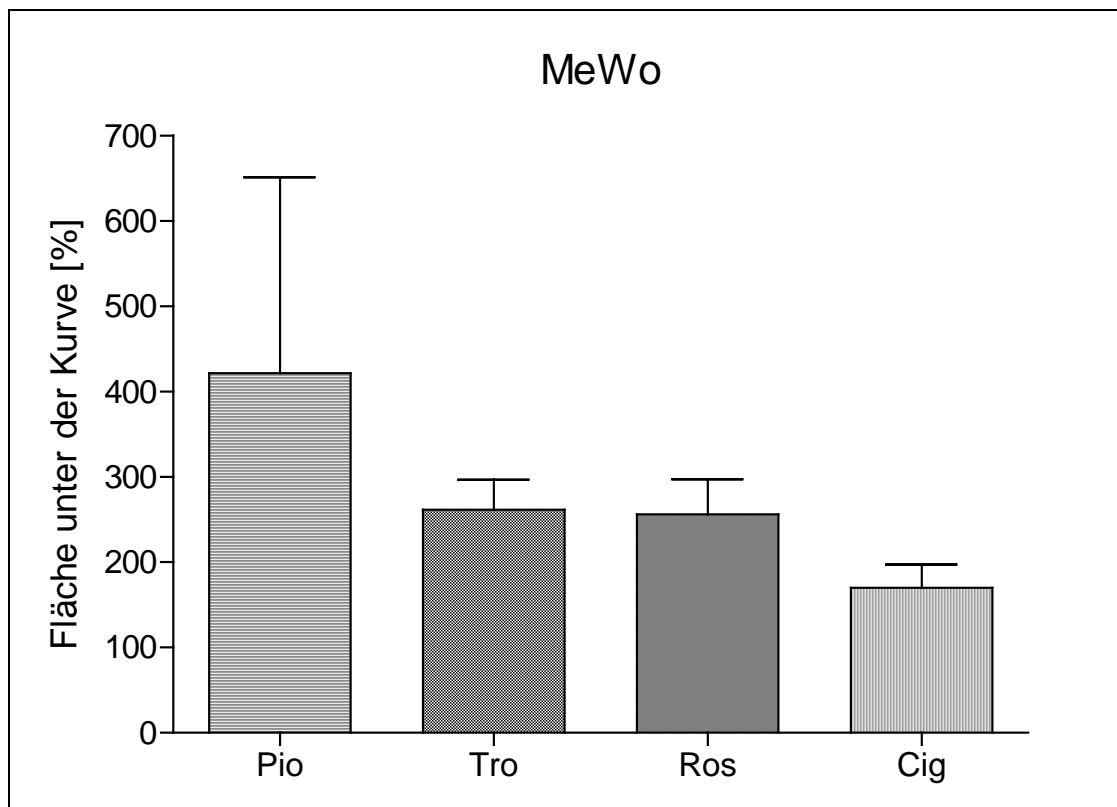


Abbildung 5.17.: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung der Glitazone auf MeWo ab einer Konzentration von 0,015 mM. Je geringer die Fläche unter der Kurve, desto besser ist die wachstumshemmende Eigenschaft des Glitazones auf MeWo.

1.2.5. FemX-1

Die Wirkung der unterschiedlichen Konzentrationen der vier Glitazone auf die FemX-1 Zellen ist in Abbildung 5.18. dargestellt. In Konzentrationsbereichen von 0,00015 bis 0,0015 mM zeigt sich eine leichte Hemmung, die aber nur bei Pioglitazone (0,00015 mM: $p < 0,001$; 0,0003 mM: $p < 0,001$) signifikant ist. Der anschliessende Anstieg des Zellwachstums bei Konzentrationen zwischen 0,0015 und 0,015 mM ist bei keinem der Glitazone signifikant ($p > 0,05$). Bereits ab Konzentrationen von 0,03 mM hemmt Rosiglitazone das Wachstum der Zellen signifikant auf 48% der Kontrolle ($p < 0,05$), Ciglitazone signifikant auf 40% der Kontrolle ($p < 0,05$) und Troglitazone signifikant auf 34% der Kontrolle ($p < 0,001$). Pioglitazone hemmt ab 0,15 mM das Wachstum signifikant auf 75% der Kontrolle ($p < 0,05$). In der höchsten Konzentration von 0,3 mM hemmen alle Glitazone das Wachstum von FemX-1 signifikant: Rosiglitazone auf 34% der Kontrolle, Ciglitazone auf 2% der Kontrolle, Pioglitazone auf 81% der Kontrolle und Troglitazone auf 16% der Kontrolle.

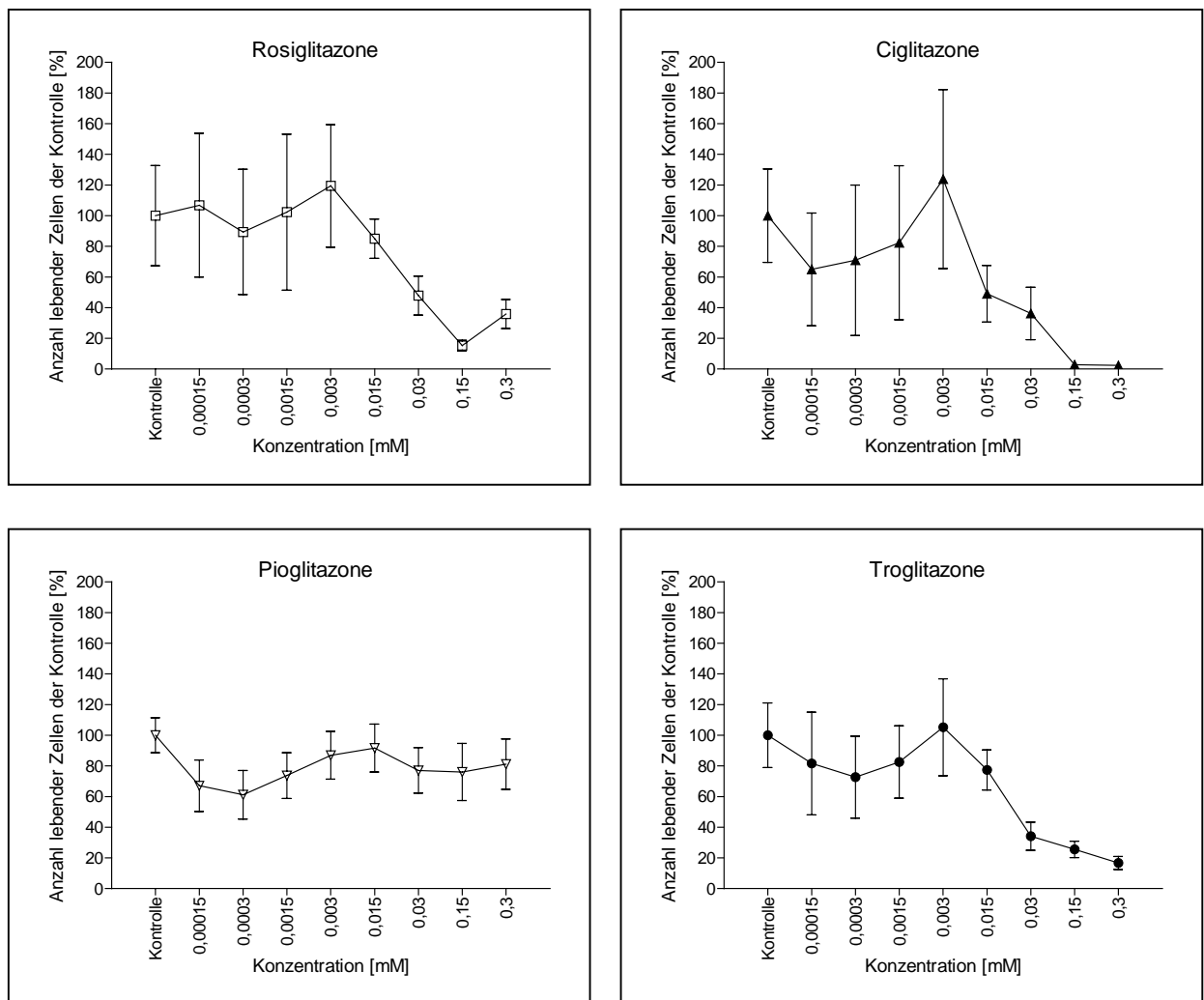


Abbildung 5.18.: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung der Glitazone auf FemX-1.

Vergleicht man die gesamt hemmende Wirkung der einzelnen Glitazone auf die FemX-1 Zellen ab einer Konzentration von 0,015 mM (siehe Abbildung 5.19), so zeigt sich, dass Pioglitazone signifikant am schlechtesten hemmt und Ciglitazone signifikant am besten. Zwischen der hemmenden Wirkung von Rosiglitazone und Troglitazone besteht kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

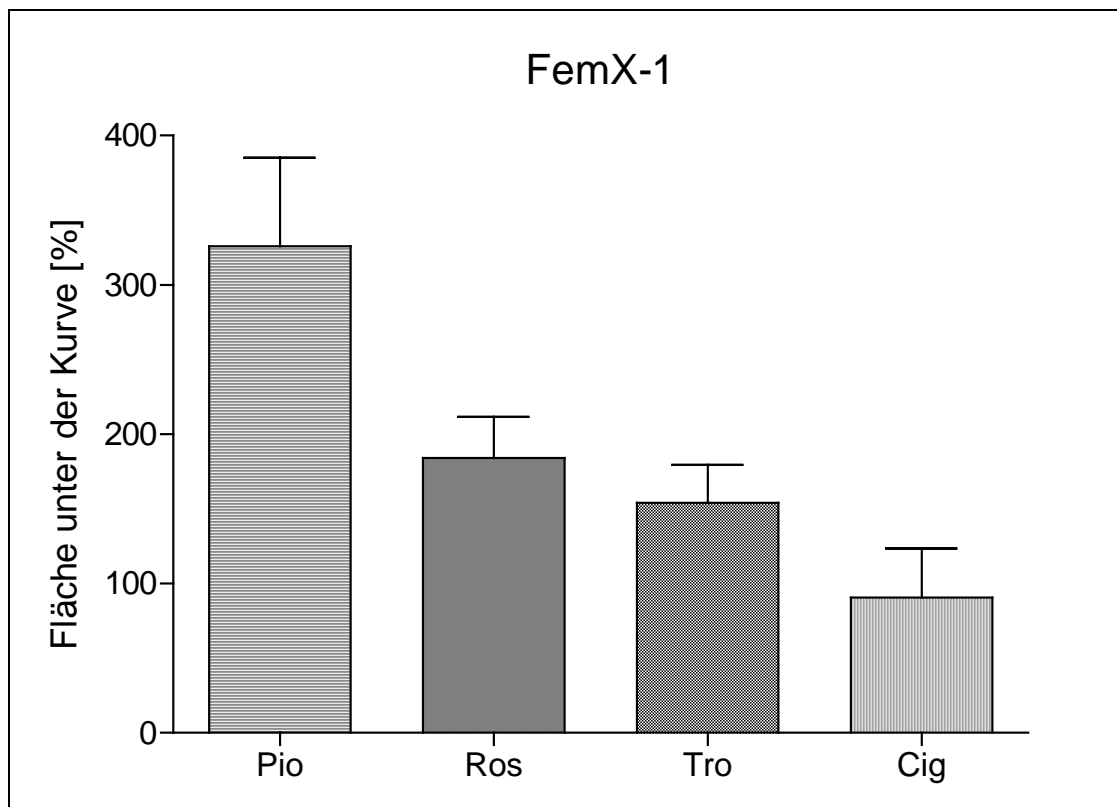


Abbildung 5.19.: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung der Glitazone auf FemX-1 ab einer Konzentration von 0,015 mM. Je geringer die Fläche unter der Kurve ausfällt (vergleiche Abbildung 5.18.), desto besser ist die wachstumshemmende Eigenschaft des Glitazones auf FemX-1.

1.2.6. G361

Die Wirkung der unterschiedlichen Konzentrationen der vier Glitazone auf die G361 Zellen ist in Abbildung 5.20. dargestellt. Die leichte Hemmung des Zellwachstums bei Konzentrationen zwischen 0,00015 und 0,0015 mM und der leichte Anstieg des Zellwachstums im Konzentrationsbereich von 0,0015 bis 0,015 mM ist bei keinem der Glitazone signifikant ($p > 0,05$). Bereits ab einer Konzentration von 0,03 mM hemmt Rosiglitazone das Wachstum signifikant auf 51% der Kontrolle ($p < 0,01$), Ciglitazone signifikant auf 51% der Kontrolle ($p < 0,05$) und Troglitazone signifikant auf 46% der Kontrolle ($p < 0,001$). Pioglitazone hemmt ab einer Konzentration von 0,3 mM das Wachstum signifikant auf 54% der Kontrolle ($p < 0,001$). In der höchsten Konzentration von 0,3 mM hemmen alle Glitazone das Wachstum von G361 signifikant: Rosiglitazone auf 2% der Kontrolle, Ciglitazone auf 17% der Kontrolle, Pioglitazone auf 54% der Kontrolle und Troglitazone auf 4% der

Kontrolle.

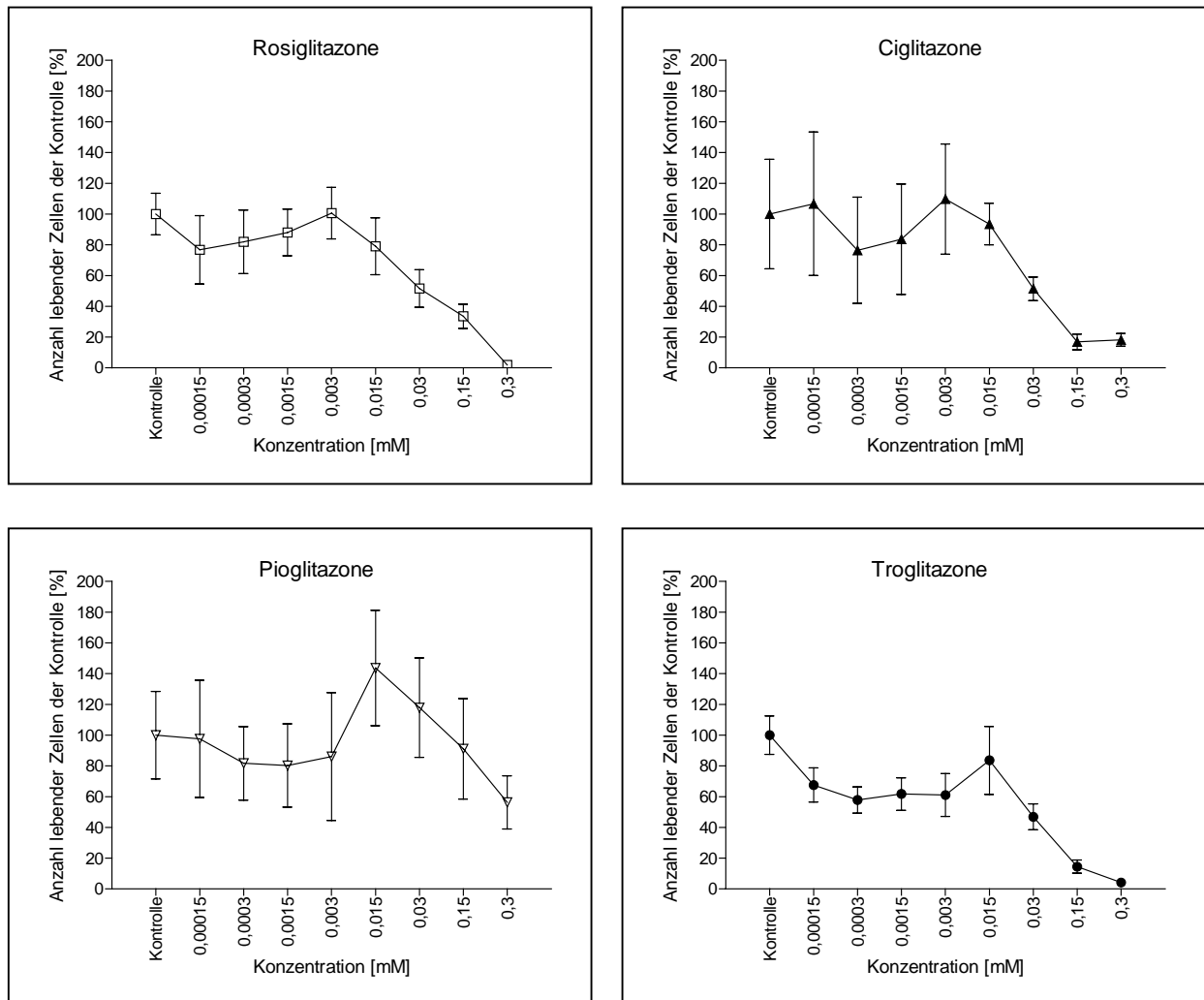


Abbildung 5.20.: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung der Glitazone auf G361.

Vergleicht man die gesamt hemmende Wirkung der einzelnen Glitazone auf die G361 Zellen ab einer Konzentration von 0,015 mM (siehe Abbildung 5.21), so zeigt sich, dass Pioglitazone das Zellwachstum signifikant am schlechtesten hemmt. Ciglitazone, Rosiglitazone und Troglitazone unterscheiden sich in Bezug auf ihre Hemmung nicht signifikant ($p > 0,05$).

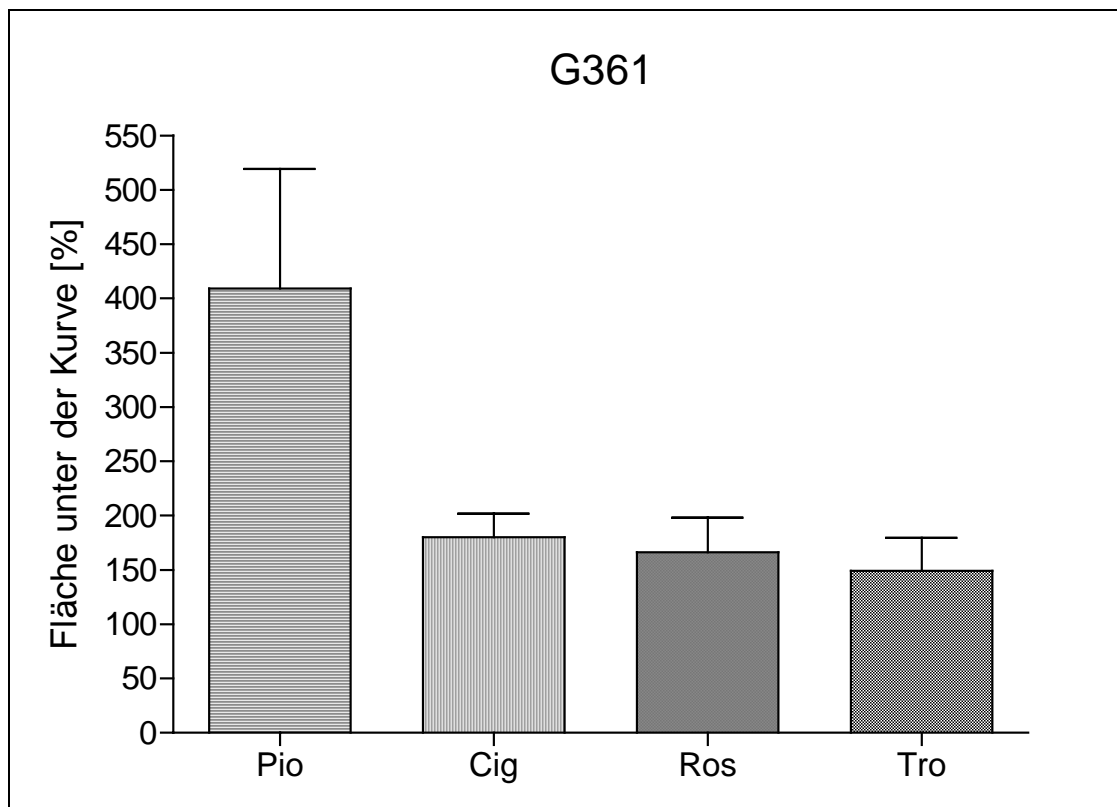


Abbildung 5.21.: Zusammenfassende Darstellung der Wirkung der Glitazone auf G361 ab einer Konzentration von 0,015 mM. Je geringer die Fläche unter der Kurve ausfällt (vergleiche Abbildung 5.20.), desto besser ist die wachstumshemmende Eigenschaft des Glitazones auf G361.

2. Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen

Der PPAR γ konnte in allen Melanomzellen nachgewiesen werden (siehe Abbildungen 2.1. und 2.2. a-f). PPAR γ liess sich hauptsächlich im Zytoplasma in Form einer granulierten Markierung nachweisen. Zusätzlich konnte er, wenn auch in geringeren Maßen, perinukleär und im Nukleus selbst nachgewiesen werden. In Abbildung 2.1. sind die Befunde der Positivkontrolle, *human processed liopaspirate* Zellen (PLA), dargestellt.

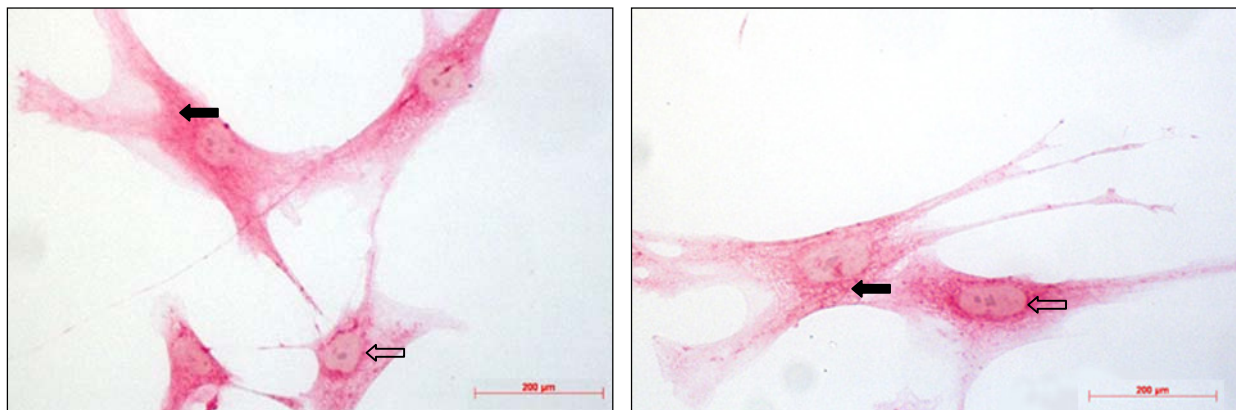


Abbildung 2.1.: Immunhistochemischer Nachweis des PPAR γ in PLA Zellen. Schwarze Pfeile: granuliertes PPAR γ im Zytoplasma, Weisse Pfeile: PPAR γ perinukleär.

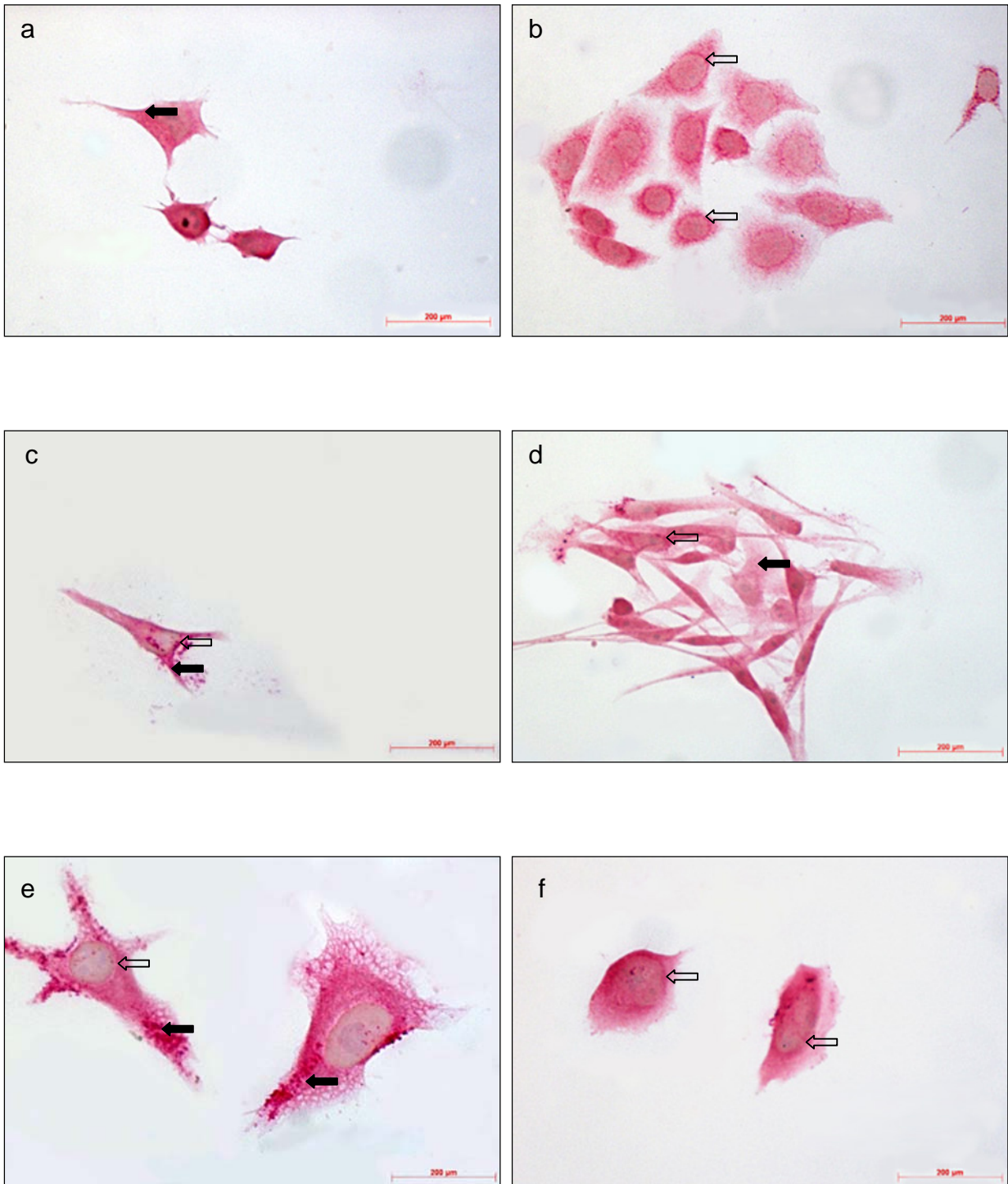


Abbildung 2.2.: Immunhistochemischer Nachweis des PPAR γ in humanen Melanomzellen. a: Mel6, b: Lox, c: G361, d: MeWo, e: FemX-1, f: MV3. Schwarze Pfeile: granuliertes PPAR γ im Zytoplasma, Weisse Pfeile: PPAR γ perinukleär.

3. Ergebnisse der Proteinextraktion

Für den Nachweis des PPAR γ Proteins mittels Western-Blot-Analysen wurden die zytoplasmatischen und die nukleären Proteinfractionen separat betrachtet.

3.1. Ergebnisse der Bradford Standardkurve

Für die Konzentrationsbestimmung der Proteinlösungen mittels eines *Bradford*-Assays wurde zuerst eine Standardkurve erstellt. Dazu wurde die gemessene optische Dichte (OD) in Relation zur den Proteinkonzentrationen der Standardreihe aufgetragen (siehe Abbildung 3.1.). Anschliessend wurden die gesuchten Proteinkonzentrationen der Proben anhand der jeweils gemessenen optischen Dichte mit Hilfe dieser Eichkurve ermittelt.

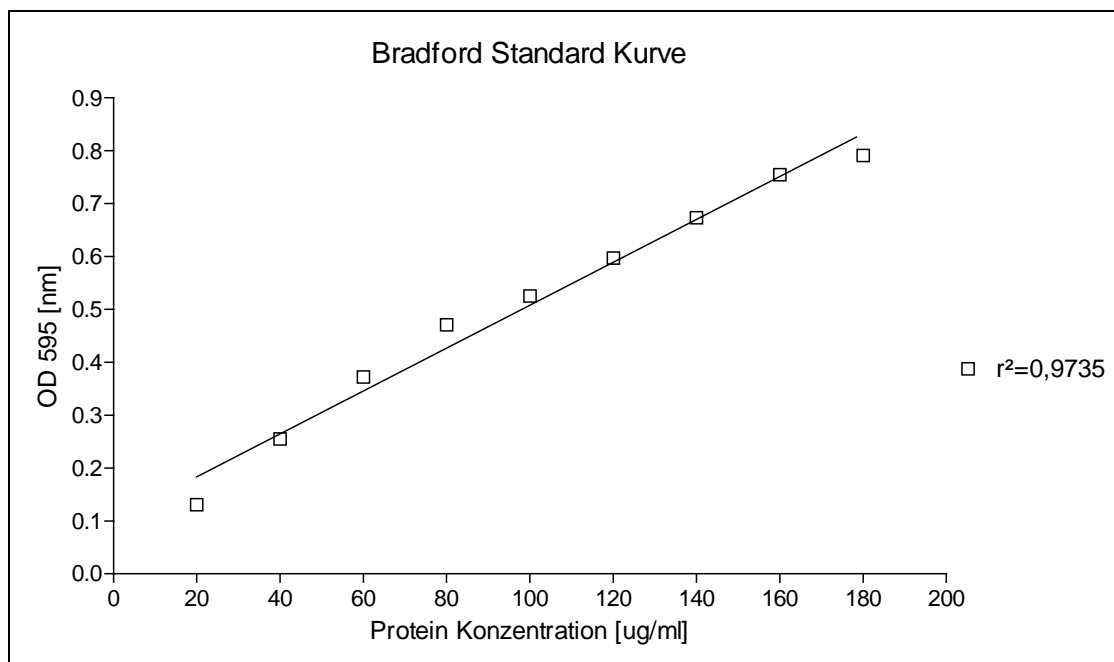


Abbildung 3.1. : Graphische Darstellung der Bradford Standard Kurve. Der Regressionsquotient beträgt 0,9735.

3.2. Western-Blot Analyse der zytoplasmatischen Proteine

Der Nachweis des PPAR γ Proteins aus der zytoplasmatischen Proteinfraction ist in Abbildung 3.2. dargestellt. Das PPAR γ Protein besitzt ein Molek\u00fclgewicht von circa 50 kilo Dalton (kDa) (Sato et al., 2000; Placha et al., 2003). Aus Abbildung 3.2. wird ersichtlich, dass der PPAR γ in allen sechs Melanomzellen im Zytoplasma nachgewiesen wurde. Als Positivkontrolle dienten *human processed lipoaspirate* Zellen (PLA), da PPAR γ in hohem Masse im Fettgewebe exprimiert wird (Tontonoz et al., 1995). Bei den PLA Zellen erkennt man eine zus\u00e4tzliche Bande bei circa 40 kDa. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um ein Abbauprodukt des Rezeptors.

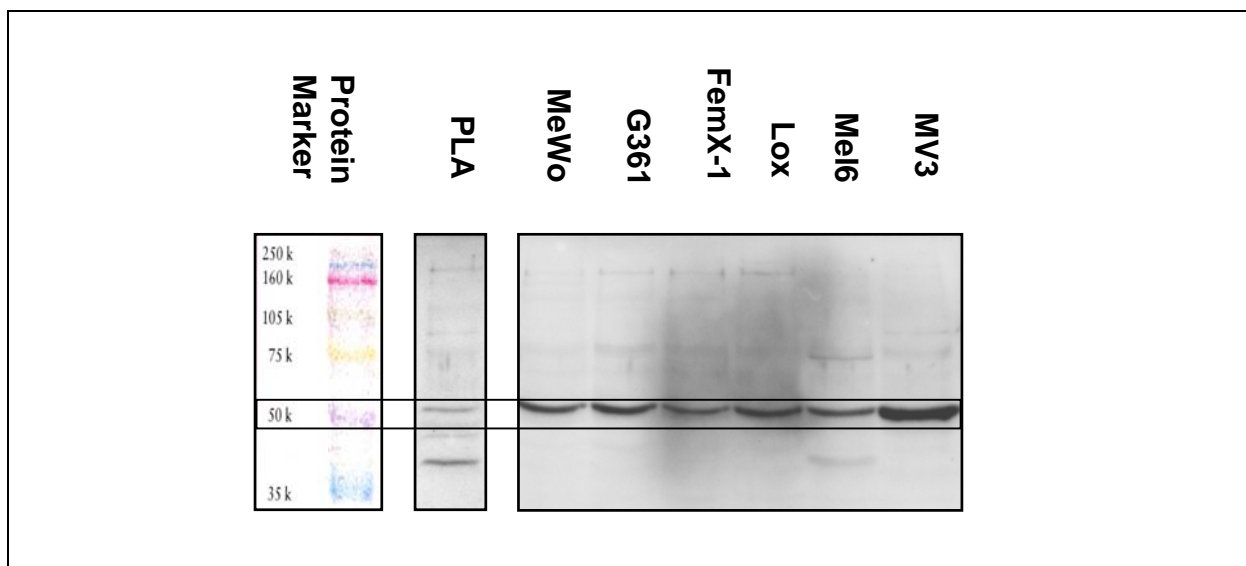


Abbildung 3.2.: Darstellung des PPAR γ Protein aus der zytoplasmatischen Proteinfraction. Alle sechs Zelllinien exprimieren PPAR γ im Zytoplasma. Als Positivkontrolle dienten PLA Zellen.

3.3. Western-Blot Analyse der nukleären Proteine

Der Nachweis des PPAR γ Proteins aus der nukleären Proteinfraction ist in Abbildung 3.3. dargestellt. Die zu erwartende Bande liegt bei 50 kDa (Sato et al., 2000; Placha et al., 2003). Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass der PPAR γ bei allen sechs Melanomzelllinien im Zellkern nachgewiesen wurde.

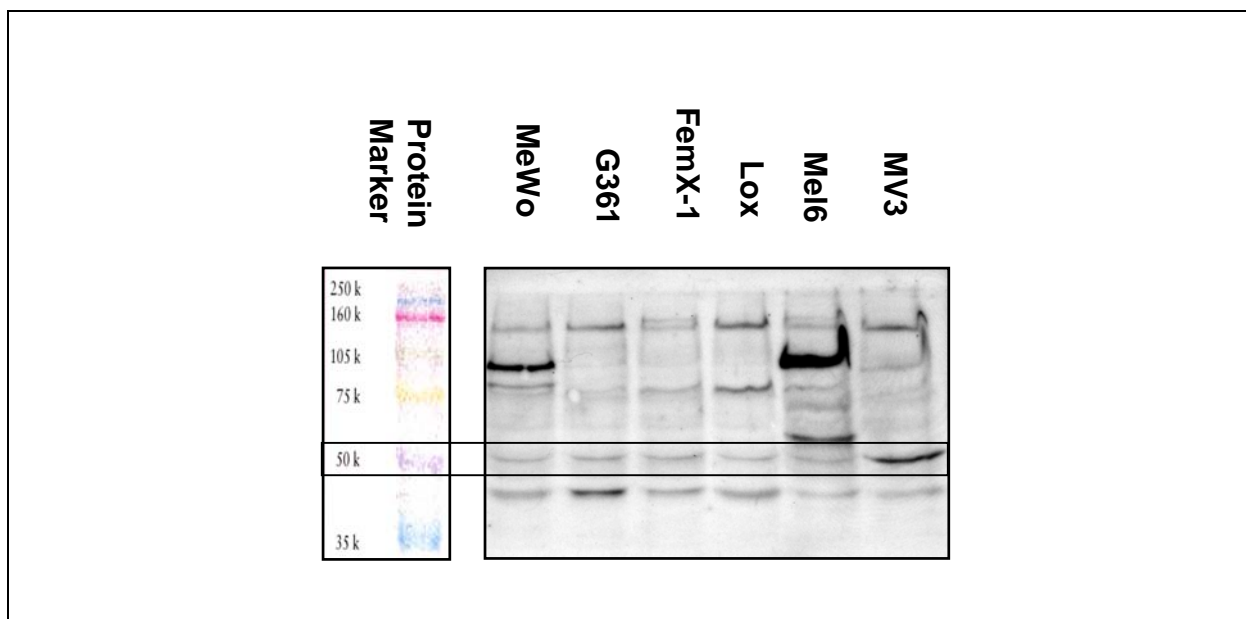


Abbildung 3.2.: Darstellung des PPAR γ Protein aus der nukleären Proteinfraction. Alle sechs Zelllinien exprimieren PPAR γ im Nukleus.

3.4. Ergebnisse der Quantifizierung der zytoplasmatischen Proteine

Um vergleichende Aussagen über die relative Proteinmenge innerhalb der zytoplasmatischen Proteine zu treffen, wurde die Quantifizierungs Software Quantity One® (Bio-Rad, München, Deutschland) verwendet. Das von der Software berechnete *Volume* ergibt sich aus dem Produkt der Summe der Intensitäten der Pixel innerhalb der Begrenzung einer Bande und der Fläche einer Bande (siehe IV.3.4.4.). Die MV3 Zellen enthielten im Verhältnis am meisten zytoplasmatisches PPAR γ Protein, gefolgt von Lox, MeWo, G361 und FemX-1. Am wenigsten zytoplasmatisches PPAR γ Protein enthielten die Mel6 Zellen.

Um eine Aussage darüber treffen zu können, welche Zellen insgesamt am besten in ihrem Wachstum gehemmt werden konnten, wurde für jede Zelllinie die hemmende Wirkung der vier Glitazone ab einer Konzentration von 0,015 mM zusammengefasst. Die Lox Zellen liessen sich demnach am besten in ihrem Wachstum hemmen, gefolgt von Mel6, FemX-1, G361 und MV3. Die MeWo Zellen liessen sich von den Glitazonen am schlechtesten in ihrem Wachstum hemmen. Um zu überprüfen ob die Empfindlichkeit gegenüber den Glitazonen mit der Expression des PPAR γ korreliert, wurde die Empfindlichkeit der einzelnen Zelllinien in Relation zu ihrer jeweiligen PPAR γ Expression graphisch aufgetragen (siehe Abbildung 3.4.). Anhand dieser Abbildung lässt sich erkennen, dass keine Korrelation besteht.

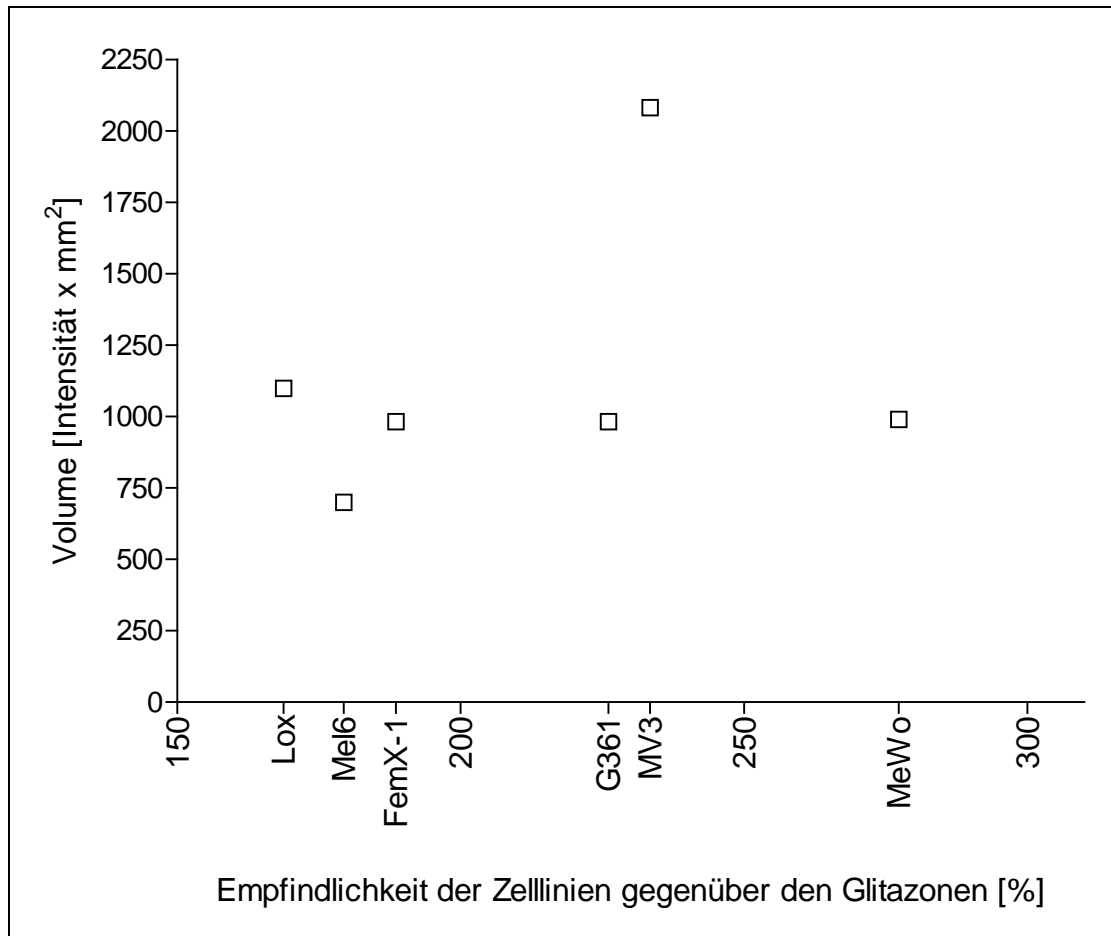


Abbildung 3.4.: Darstellung der Empfindlichkeit der einzelnen Zelllinien gegenüber den Glitazonen (X-Achse) im Verhältnis zu der jeweiligen Expression an PPAR γ -Protein (Y-Achse). Es besteht keine Korrelation zwischen der Empfindlichkeit und der Expression an PPAR γ Protein.

VI. Diskussion

Die Inzidenzrate des malignen Melanoms ist in den letzten Jahren schneller als bei allen anderen Tumoren angestiegen (Jemal et al., 2004) und verdoppelt sich zur Zeit alle 10 Jahre (Cole et al., 1996). Bei eingetretener Fernmetastasierung ist eine kurative Heilung meist nicht mehr möglich, die mediane Überlebensdauer beträgt ohne eine Behandlung nur 4 bis 6 Monate (Orfanos et al., 1994). Auch Therapieversuche mit Polychemotherapie und Immuntherapie zeigten nicht den erhofften Erfolg. Daher tritt die Suche nach neuen Therapieansätzen immer weiter in den Vordergrund.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass die Glitazone als Liganden des *peroxisome proliferator-activated receptor* γ (PPAR γ) das Wachstums verschiedener epithelialer Tumore der Brust (Elstner et al., 1998), der Prostata (Kubota et al., 1998), der Lunge (Tsubouchi et al., 2000), des Kolons (Sarraf et al., 1998), des Magens (Sato et al., 2000), der Blase (Guan et al., 1999) und des Pankreas (Motomura et al., 2000) verhindern können.

Ziel dieser Arbeit war es daher zu überprüfen, ob Glitazone auch auf das maligne Melanom einen antiproliferativen Effekt besitzen und wenn ja, ob zwischen den Glitazonen qualitative Unterschiede in Bezug auf ihre Wirkung existieren. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob sich innerhalb der sechs humanen Melanomzelllinien Unterschiede auf ihre Empfindlichkeit gegenüber der Glitazone zeigten. Parallel dazu wurde sowohl immunhistochemisch als auch mit *Western Blotting* untersucht, ob sich der PPAR γ in den sechs humanen Melanomzelllinien nachweisen lässt. Schliesslich sollten quantitative Messungen über den Rezeptorgehalt der einzelnen Zelllinien Aufschluss darüber geben, ob die Wirkung der Glitazone auf die Melanomzelllinien mit dem jeweiligen Rezeptorgehalt korreliert.

Die vorliegende Arbeit zeigte, dass alle vier Glitazone (Rosiglitazone, Ciglitazone, Pioglitazone, Troglitazone) eine konzentrationsabhängige inhibitorische Wirkung auf das Tumorwachstum aller sechs humanen Melanomzelllinien (MV3, Mel6, Lox, MeWo, FemX-1, G361) besitzen. Dabei hemmte Ciglitazone das Wachstum aller sechs Zelllinien am besten. Ciglitazone-Konzentrationen ab 0,03 mM bewirkten bereits eine signifikante Wachstumshemmung in den Zelllinien Mel6 auf 60% der

Kontrolle, MeWo auf 48% der Kontrolle, FemX-1 auf 40% der Kontrolle, G361 auf 51% der Kontrolle und Lox auf 39% der Kontrolle. In der höchsten Konzentration von 0,3 mM hemmte Rosiglitazone signifikant alle sechs Zelllinien, MV3 auf 6% der Kontrolle, Mel6 auf 4% der Kontrolle, Lox auf 18% der Kontrolle, MeWo auf 29%, FemX-1 auf 34% und G361 auf 2% der Kontrolle. Die zweitbeste wachstumshemmende Wirkung wurde durch Troglitazone erreicht. Auch hier wurde bereits ab einer Konzentration von 0,03 mM das Wachstum der Zelllinien Mel6 auf 51% der Kontrolle, MeWo auf 63% der Kontrolle, FemX-1 auf 34% der Kontrolle, G361 auf 46% der Kontrolle und Lox auf 23% der Kontrolle signifikant gehemmt. In der höchsten Konzentration von 0,3 mM hemmte Troglitazone signifikant alle sechs Zelllinien: MV3 auf 5% der Kontrolle, Mel6 auf 8% der Kontrolle, Lox auf 9% der Kontrolle, MeWo auf 48%, FemX-1 auf 16% und G361 auf 4% der Kontrolle. Bei Rosiglitazone konnte eine signifikante wachstumshemmende Wirkung ab einer Konzentration von 0,03 mM bei den Zelllinien MeWo auf 81% der Kontrolle, FemX-1 auf 48% der Kontrolle und G361 auf 50% der Kontrolle erreicht werden. In der höchsten Konzentration von 0,3 mM hemmte Rosiglitazone signifikant alle sechs Zelllinien, MV3 auf 6% der Kontrolle, Mel6 auf 4% der Kontrolle, Lox auf 18% der Kontrolle, MeWo auf 29%, FemX-1 auf 34% und G361 auf 2% der Kontrolle. Pioglitazone konnte das Wachstum der Zelllinien am schlechtesten hemmen. Hier konnte ab einer Konzentration von 0,03 mM eine signifikante Wachstumshemmung der Zelllinien Mel6 auf 47% der Kontrolle, MV3 auf 57% der Kontrolle und Lox auf 36% der Kontrolle erreicht werden. In der höchsten Konzentration von 0,3 mM hemmte Pioglitazone signifikant alle sechs Zelllinien: MV3 auf 29% der Kontrolle, Mel6 auf 34% der Kontrolle, Lox auf 40% der Kontrolle, MeWo auf 81%, FemX-1 auf 81% und G361 auf 54% der Kontrolle.

Bei der Untersuchung, ob sich innerhalb der sechs Zelllinien Unterschiede hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit gegenüber den Glitazonen ergaben, zeigte sich dass die Linie Lox am empfindlichsten gegenüber der Wirkung aller Glitazone war (Siehe Abbildung 3.5.). Darauf folgten die Zelllinien Mel6, FemX-1, G361, MV3 und schliesslich die Zelllinie MeWo, die sich am schlechtesten hemmen liess. Diese Wirkung der Glitazone auf die Melanomzelllinien, wirft die Frage nach dem genauen Wirkungsmechanismus der PPAR γ -Agonisten auf, vor allem ob die Wirkung der Glitazone auch wirklich über den PPAR γ Rezeptor vermittelt wird. Obwohl der

genaue molekulare Mechanismus der antiproliferativen Wirkung der PPAR γ Agonisten zur Zeit noch nicht vollständig aufgedeckt wurde, gibt es verschiedene Ansätze, eine Erklärung zu liefern. So konnten Tsujie et al. (2003) eine Korrelation zwischen der Wirkung von PPAR γ -Agonisten auf humane gastrointestinale Adenokarzinom-Zelllinien und der Expression des PPAR γ nachweisen und somit darauf schliessen, dass die antiproliferative Wirkung der Glitazone über eine Aktivierung des PPAR γ vermittelt wird. Zu der gleichen Schlussfolgerung kamen Brockman et al. (1998), die eine Korrelation zwischen der antiproliferativen Wirkung eines PPAR γ -Agonisten auf humane Kolonkarzinom-Zelllinien und der Expression des PPAR γ feststellten. Mögliche Mechanismen der wachstumshemmenden Wirkung der Glitazone, die über eine Aktivierung des PPAR γ induziert werden, sind ein Anhalten des Zellzyklus in der G1 Phase (Brockman et al., 1998; Sato et al., 2000; Kitamura et al., 1999) oder eine Induktion der Apoptose (Clay et al., 1999, Kubota et al., 1998). Eine weitere Erklärung für die wachstumshemmende Wirkung der Glitazone auf Tumorzellen ist die Beobachtung, dass eine Aktivierung des PPAR γ zu einer Redifferenzierung führt (Tontonoz et al., 1997). Da maligne Zellen im allgemeinen durch ein unkontrolliertes Wachstum und das Unvermögen zur gewebsspezifischen Differenzierung charakterisiert sind, scheint es ein attraktives Konzept zu sein, Tumore durch die Induktion von Differenzierung zu behandeln. So konnten Tontonoz et al. (1997) zeigen, dass bei Liposarkomzellen durch die Stimulation von PPAR γ mittels der Glitazone Troglitazone und Pioglitazone eine Redifferenzierung und damit eine Hemmung des Tumorwachstums erreicht wurde. Um zu untersuchen, ob die hier beobachtete Wachstumshemmung der Glitazone über eine mögliche Aktivierung des PPAR γ vermittelt wird, wurden alle sechs Melanomzelllinien auf das Vorhandensein des PPAR γ hin untersucht. Dazu wurden sowohl immunhistochemische Verfahren als auch *Western Blotting* eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, dass der PPAR γ bei allen sechs humanen Melanomzelllinien vorhanden ist. Dabei zeigte der immunhistochemische Nachweis und die Western Blot Analysen das gleiche Ergebnis, dass der PPAR γ hauptsächlich im Zytoplasma, und in geringerem Maße auch nukleär vorhanden ist. Dies deckt sich mit den immunhistochemischen Beobachtungen von Mössner et al. (2002), die den PPAR γ ebenfalls bei humanen Melanomzellen nachwiesen und Kang et al. (2004), die den

PPAR γ bei humanen Melanozyten nachwiesen. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass der PPAR γ , wie andere Transkriptionsfaktoren, sich hauptsächlich im Zytoplasma befindet, bis er, ausgelöst durch eine Aktivierung, in den Kern transloziert wird, um eine DNS Interaktion zu ermöglichen. Diese Sequestrierung des PPAR γ könnte ein wichtiger Regulationsmechanismus sein und sollte durch weitere Studien näher aufgeklärt werden. Zusätzlich liess sich anhand der Ergebnisse des *Western Blotting* erkennen, dass in der zytoplasmatischen Proteinfraction die Expression des PPAR γ in den Melanomzellen grösser war als bei den PLA Zellen, was auf eine bereits stattgefundenene Aktivierung des PPAR γ schliessen lässt. Bei den nukleären Proteinen liessen sich zusätzlich zahlreiche Banden nachweisen, die wahrscheinlich *splice* Varianten des PPAR γ entsprechen, von denen bereits sieben, PPAR γ -1 bis PPAR γ -7, nachgewiesen werden konnten (Zhou et al., 2002). Die genaue physiologische Bedeutung der verschiedenen Isoformen des PPAR γ konnte noch nicht ausreichend erklärt werden. Jedoch konnten viele Berichte bestätigen, dass über PPAR γ eine Vielzahl unterschiedlicher Gene aktiviert wird (Tontonoz et al., 2000; Chinetti et al., 2001). Wahrscheinlich tragen die verschiedenen Isoformen des PPAR γ zu der Vielfältigkeit der aktivierten Gene und der damit verbundenen biologischen Funktion bei (Zhou et al., 2000).

Um bei den einzelnen Zelllinien einen Zusammenhang zwischen dem Vorkommen des PPAR γ und der Empfindlichkeit gegenüber den Glitazonen nachzuweisen, wurden quantitative Messungen des PPAR γ Proteingehalts innerhalb der sechs Zelllinien durchgeführt (Siehe Abbildung 3.4.). Dabei zeigte sich jedoch keine Korrelation zwischen der Expression des PPAR γ und dem Ansprechen auf die Glitazone. Dies spricht dafür, dass der antiproliferative Effekt nicht nur auf einer Aktivierung des Rezeptors beruht, sondern wahrscheinlich ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Wirkmechanismen dem Effekt der PPAR γ Agonisten zugrunde liegt. Auf Grund der Beteiligung einer Vielzahl von Faktoren, die auf die Aktivierung von PPAR γ , den Transport in den Zellkern und die Bindung an das PPAR γ -*Responsive Element* (PPRE) Einfluss nehmen, hängt die zu erwartende Antwort auf PPAR γ Agonisten nicht nur von der Quantität des PPAR γ -Proteins in einer Zelllinie ab. Mögliche Erklärungen für die Diskrepanz zwischen beobachteter Wachstumshemmung durch die Glitazone und Expression des PPAR γ könnten

Mutationen des PPAR γ in bestimmten Zelllinien, Defekte bei anderen Faktoren, die für eine Aktivierung oder die Bindung des PPAR γ an PPAR γ -Responsive Element (PPRE) nötig sind, oder der Defekt in bestimmten Zielgenen nach der PPAR γ Aktivierung sein.

Neben der beschriebenen signifikanten Wachstumshemmung der Glitazone auf die Melanomzelllinien in höheren Konzentrationen ab 0,015 mM, zeigte sich bereits in niedrigeren Konzentrationsbereichen von 0,00015 bis 0,0015 mM bei allen sechs Zelllinien eine leichte Hemmung des Zellwachstums. Diese wies aber nur bei den Kombinationen Ciglitazone (0,00015 mM, 0,0003 mM) / Mel6, Ciglitazone (0,0003 mM) / MeWo, Pioglitazone (0,003 mM) / Mel6, Pioglitazone (0,00015 mM, 0,0003 mM) / FemX-1 und Pioglitazone (0,0003 mM, 0,0015 mM) / MV3 eine Signifikanz auf. Palakurthi et al. (2001) konnten mit Hilfe von PPAR $\gamma^{-/-}$ und PPAR $\gamma^{+/+}$ embryonalen Mausstammzellen nachweisen, dass die Wachstumsinhibierung, die durch die PPAR γ Liganden induziert wurde, unabhängig von dem Vorhandensein des PPAR γ ist. Stattdessen sollen die Glitazone eine zweifache pharmakologische Wirkung aufweisen. Zum einen inhibieren die Glitazone die Einleitung der Translation über eine Entleerung von intrazellulären Ca²⁺ Speichern, was völlig PPAR γ unabhängig geschieht und zu einem Anhalten des Zellzyklus in der G1 Phase führt. Andererseits aktivieren die Glitazone den PPAR γ und damit die Transkribierung von PPAR γ gesteuerten Genen, was zu einer Differenzierung führt (Palakurthi et al., 2001). Dies deckt sich mit den Beobachtungen von Müller et al. (1998), die eine Resistenz von humanen Brustkrebszellen gegenüber den Glitazonen feststellten, obwohl diese in hohem Maße PPAR γ exprimierten. Dies liefert eventuell eine Erklärung für die gering wachstumshemmende Wirkung der Glitazone in niedrigerer Dosierung, die möglicherweise durch einen PPAR γ unabhängigen Mechanismus, der die Einleitung der Translation inhibiert (Palakurthi et al., 2001) ausgelöst wurde.

Neben der wachstumshemmenden Wirkung der Glitazone in niedrigen (0,00015 bis 0,0015 mM) und höheren (ab 0,015 mM) Konzentrationen, bewirkten die Glitazone in Konzentrationsbereichen zwischen 0,0015 und 0,015 mM hingegen bei allen Zelllinien einen leichten Anstieg des Zellwachstums, der aber bei keiner der Zelllinien signifikant war. Lucarelli et al. (2002) konnten nachweisen, dass Troglitazone in einer Konzentration von 0,005 mM bei humanen Osteosarkomzellen *in vitro* ein Überleben der Tumorzellen induzieren konnte. Dies sollte über eine Aktivierung der

Serin/Threonin Kinase Akt geschehen, was einen Schutz der Zelle vor Apoptose bewirkt, wobei der genaue molekulare Mechanismus unklar bleibt. Ob ähnliche Mechanismen für die beobachtete Wachstumssteigerung beim malignen Melanom verantwortlich sind bleibt ungeklärt, zumal die Wachstumssteigerung keine Signifikanz aufweist. Die Möglichkeit, mit den Glitazonen eine neue Gruppe von Stoffen zur Behandlung des malignen Melanoms und anderer Tumorentitäten gefunden zu haben, erscheint deshalb so attraktiv, da einige Vertreter dieser Stoffklasse bereits als Medikamente zur Behandlung des Typ-II-Diabetes zugelassen sind. So ist Rosiglitazone unter dem Handelsnamen Avandia® und Pioglitazone unter Actos® erhältlich. Ciglitazone, der Vorläufer der heute erhältlichen Glitazone, kam aufgrund seines Nebenwirkungsspektrums nicht weiter für die Anwendung am Menschen in Frage. Ebenso wurde Troglitazone (Rezulin®) aufgrund schwerer Leberfunktionsstörungen im März 2000 vom Markt genommen. Im Hinblick auf die Ergebnisse dieser Arbeit, mit einem leichten Anstieg des Zellwachstums im Bereich von Konzentration zwischen 0,0015 und 0,015 mM, erkennt man, wie wichtig weiterführende Studien sind, um die Wirkung der Glitazone *in vivo* zu testen und einen genauen Dosisbereich zu finden, in dem der inhibitorische Effekt der Glitazone erreicht wird. Bereits durchgeführte *in vivo* Studien mit Zelllinien anderer Tumorentitäten zeigen widersprüchliche Ergebnisse. Sarraf et al. (1998) konnten bei *nude* Mäusen, die mit humanen Kolonkarzinom Zellen beimpft wurden, durch eine tägliche Gabe von 200 mg/kg Körpergewicht Troglitazone eine Reduktion der Tumormasse erreichen. Im Gegensatz dazu konnten Lefebvre et al. (2001) anhand eines Mausmodells zeigen, dass eine tägliche Gabe von 150 mg/kg Körpergewicht Troglitazone die Entwicklung von Kolontumoren förderten. Elstner et al. (1998) konnten in einem Mausmodell mit humanen Brustkrebszellen erst durch eine tägliche Gabe von 1000 mg/kg Körpergewicht Troglitazone wiederum eine Reduktion der Tumormasse erreichen. Dies könnte dafür sprechen, dass die wachstumshemmende Wirkung der Glitazone auf Tumore erst in höheren Dosierungen erreicht wird. Debrock et al. (2003) untersuchten in einer Phase II Studie die Effektivität einer Antitumortherapie mit Rosiglitazone, indem sie neun Liposarkom-Patienten mit 4 mg Rosiglitazone pro Tag behandelten. Das klinische Ergebnis blieb enttäuschend, denn der durchschnittliche Zeitraum bis zu einer Verdopplung der Tumormasse betrug lediglich 5,5 Monate. Zusätzlich dazu konnte

kein Anzeichen für eine Redifferenzierung des Tumors nachgewiesen werden, obwohl eine Aktivierung von PPAR γ *in vivo* festgestellt wurde. Eine Erklärung für die Ineffektivität dieser Rosiglitazone Therapie ist die geringe Dosis, zumal die maximale Tagesdosis Rosiglitazone bei der Behandlung des Type-II-Diabetes bereits bei 8 mg pro Tag liegt. Eine weitere Möglichkeit, die Wirkung der PPAR γ Agonisten zu verstärken, wäre eine gleichzeitige Stimulation mit RXR-spezifischen Liganden, da frühere Arbeiten zeigten, dass eine maximale Aktivierung des PPAR γ /RXR Heterodimers erreicht wird, wenn beide Rezeptoren durch ihre spezifischen Liganden aktiviert werden (Kliwer *et al*, 1992; Isseman *et al*, 1990).

Auch wenn der genaue Mechanismus der wachstumshemmenden Wirkung der Glitazone noch nicht vollständig aufgeklärt wurde, bleibt der antiproliferative Effekt auf bestimmte Tumorentitäten unbestritten. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich diese Wirkung auch auf das maligne Melanom übertragen lässt, was im Hinblick auf die ansonsten ungenügenden Therapiemöglichkeiten bei metastasiertem Melanom, ein viel versprechender Ansatz für weiterführende Studien sein könnte.

VII. Zusammenfassung

Die Prognose nach eingetretener Metastasierung ist beim kutanen malignen Melanom trotz Chemotherapie infaust, so dass ein grosses Interesse für neue Therapieansätze besteht. Für die Glitazone als spezifische Agonisten des *Peroxisome-Proliferator-activated receptor- γ* (PPAR γ) wurde bereits eine antiproliferative Wirkung auf verschiedene Tumorentitäten wie Brust, Prostata, Lunge, Kolon, Magen, Blase und Pankreas nachgewiesen. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Wirkung von vier PPAR γ -Agonisten (Rosiglitazone, Ciglitazone, Pioglitazone und Troglitazone) auf das Zellwachstum von sechs humanen Melanomzelllinien (MV3, Mel6, Lox, MeWo, FemX-1 und G361) *in vitro* zu untersuchen. Zusätzlich wurde der PPAR γ in den sechs Zelllinien sowohl immunhistochemisch als auch im *Western Blot* nachgewiesen und quantitative Messungen über den Gehalt an PPAR γ Protein vorgenommen, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Rezeptorexpression und der Empfindlichkeit gegenüber den Glitazonen zu erklären. Alle vier Glitazone zeigten eine deutlich konzentrationsabhängige wachstumshemmende Wirkung auf alle sechs Zelllinien, wobei Ciglitazone das Wachstum am besten hemmte, gefolgt von Rosiglitazone, Troglitazone und Pioglitazone. Zwischen den einzelnen Zelllinien zeigten sich Unterschiede bezüglich ihrer Empfindlichkeit gegenüber den einzelnen Glitazonen. In geringen Konzentrationen zeigte sich bei allen sechs Zelllinien ein leichter Anstieg des Wachstums, der jedoch bei keiner Zelllinie signifikant war. Alle sechs Melanomzelllinien exprimierten PPAR γ im Kern, aber noch stärker im Zytoplasma. Es zeigte sich jedoch keine Korrelation zwischen der Menge an PPAR γ Protein in den Zelllinien und der Wirkung der Glitazone. Die antiproliferative Wirkung der Glitazone wird danach nicht ausschliesslich über eine Aktivierung des PPAR γ vermittelt, sondern es müssen zusätzliche Mechanismen eine Rolle spielen. Da ein deutlicher proliferationshemmender Effekt der Glitazone auf kutane maligne Melanome nachgewiesen werden konnte und die Stoffklasse der Glitazone bereits zur Behandlung des Typ-II-Diabetes zugelassen ist, sollte die Gabe von Glitazonen als adjuvante oder Kombinationstherapie des malignen Melanoms weiterführend in Tiermodellen und klinischen Studien überprüft werden.

VIII. Literaturverzeichnis

Antoine EC, Benhammouda A, Bernard A (1997) Salpetriere Hospital experience with biochemotherapy in metastatic melanoma. *Cancer J Sci Am* 3 Suppl 1: 16

Becker N, Wahrendorf J (1998) *Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland, 1981-1990*. 3 Auflage, Springer Verlag

Begum NM, Nakashiro KI, Kawamata H, Uchida D, Shintani S, Ikawa Y, Sato M, Hamakawa H (2002) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ and the growth inhibitory effect of its synthetic ligands in human salivary gland cancer cell lines. *Int J Oncol* 20: 599-605

Berger J, Moller DE (2002) The Mechanism of action of PPARs. *Ann Rev Med* 53: 409-435

Braissant O, Fougere F, Scotto C, Dauca M, Wahli W (1996) Differential Expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs): Tissue Distribution of PPAR- α , - β , - γ in the Adult Rat. *Endocrinology* 137: 354-366

Brockman JA, Gupta RA, Dubois RN (1998) Activation of PPAR γ leads to inhibition of anchorage-independent growth of human colorectal cancer cells. *Gastroenterology* 115: 1049-1055

Camp HS, Li O, Wise SC, Hong YH, Frankowski CL, Shen X, Vanbogelen R, Leff T (2000) Differential Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ by Troglitazone and Rosiglitazone. *Diabetes* 49: 539-547

Campbell SE, Stone WL, Whaley AG, Qui M, Krishnan K (2003) Gamma (γ) tocopherol upregulates peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) gamma (γ) expression in SW 480 human colon cancer cell lines. *BMC Cancer* 3:25

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

Chen Z, Wang ZY, Chen SJ (1997) Acute promyelocytic leukemia: cellular and molecular basis of differentiation and apoptosis. *Pharmacol Ther* 76(1-3):141-9

Chinetti G, Lestavel S, Bocher V, Remaley AT, Neve B, Torra IP, Teissier E, Minnich A, Jaye M, Duverger N, Brewer HB, Fruchart J, Clavey V, Staels B (2001) PPAR- α and PPAR- γ activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway. *Nature Medicine* 7:53-58

Cho MC, Lee HS, Kim JH, Choe YK, Hong JT, Paik SG, Yoon do Y (2003). A simple ELISA for screening ligands of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *J Biochem Mol Biol* 36(2): 207-213

Clark RB, Bishop-Bailey D, Estrada-Hernandez T, Hla T, Puddington L, Padula SJ (2000) The Nuclear Receptor PPAR γ and Immunoregulation: PPAR γ Mediates Inhibition of Helper T Cell Response. *J Immunol* 164: 1364-1371

Clay CE, Namen AW, Atsumi G, Willingham MC, High KP, Kute TE, Trimboli AJ, Fonteh AN, Dawson PA, Chilton FH (1999) Influence of J series prostaglandins on apoptosis and tumorigenesis of breast cancer cells. *Carcinogenesis* 20: 1905-1911

Cole BF, Gelber RD, Kirkwood JM, Goldhirsch A, Barylak E, Borden E (1996) Quality-of-life-adjusted survival analysis of interferon alfa-2b adjuvant treatment of high-risk resected cutaneous melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol* 14(10):2666-73

Crosby T, Fish R, Coles B, Mason MD (2000) Systemic treatment for metastatic cutaneous melanoma. *Cochrane Database Sywt Rev*: CD001215

Debrock G, Vanhentenrijk V, Sciote R, Debiec-Rychter M, Oyen R, Van Oosterom A (2003) A phase II trial with rosiglitazone in liposarcoma patients. *Br J Cancer* 89: 1409-1412

Demetri GD, Fletcher CD, Mueller E, Sarraf P, Naujoks R, Campbell N, Spiegelman BM, Singer S. (1999) Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 96(7):3951

Edward M (2001) Melanoma cell-derived factors stimulate glycosaminoglycan synthesis by fibroblast cultured as monolayers and within contracted collagen lattices. *Br J Dermatol* 144: 465-47

Eickelberg O, Roth M, Lörx R, Bruce V, Rüdiger J, Johnson M, Block LM (1999) Ligand-independent Activation of the Glucocorticoid Receptor by β_2 -Adrenergic Receptor Agonists in Primary Human Lung Fibroblasts and Vascular Smooth Muscle Cells. *J Bio Chem* 274(2): 1005-1010

Elstner E, Muller C, Koshizuka K, Williamson EA, Park D, Asou H, Shintaku P, Said JW, Heber D, Koeffler HP (1998) Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BXH mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8806-8811

Evans RM, Barish GD, Wang YX (2004) PPARs and the complex journey to obesity. *Nature Medicine* 10(4): 1-6

Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J (1997) The organization, promoter analysis, and expression of the human PPAR γ gene. *J Biol Chem* 272: 18779-18789

Fodstad O, Aamdal S, McMenamin M, Nesland JM, Phil A (1988a) A new experimental metastasis model in athymic nude mice, the human malignant melanoma LOX. *Int J Cancer* 41: 442-449

Fodstad O, Kjonniksen I, Aamdal S, Nesland JM, Boyd MR, Phil A (1988b) Extrapulmonary, tissue-specific metastasis formation in nude mice injected with FEMX-I human melanoma cells. *Cancer Res* 48: 4382-4388

Forman BM, Che J, Evans RM (1996) The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators. *Ann N Y Acad. Sci* 804:266-275

Grommes C, Landreth GE, Heneka MT (2004) Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol* 5(7): 419-429

Guan YF, Zhang YH, Breyer RM, Davis L, Breyer MD (1999) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) in human transitional bladder cancer and its role in inducing cell death. *Neoplasia* 1: 330-339

Gupta RA, Dubois RN (2002) Controversy: PPAR γ as a target for treatment of colorectal cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283: 266-269

Harris SG, Phipps RP (2001) The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis. *Eur J Immunol* 31: 1098-1105

Hegarty BD, Furler SM, Oakes ND, Kraegen EW, Cooney GJ (2004) Peroxisome Proliferator-Activated receptor (PPAR) Activation Induces tissue-Specific Effects on Fatty Acid Uptake and Metabolism *in Vivo* – A Study using the Novel PPAR α/γ Agonist Tesaglitazar. *Endocrinology* 145: 3158-3164

Huang ME, Ye YC, Chen SR, Chai JR, Lu JX, Zhao L, Gu LJ, Wang ZY (1989) Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Haematol Blood Transfus* 32:88-96

Issemann I, Green S (1990) Activation of a member of the steroid receptor superfamily by peroxisome proliferators, *Nature* 347 645-650

Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ; American Cancer Society (2004) Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin.* 54(1):8-29

Kang HY, Chung E, Lee M, Cho Y, Kang W H (2004) Expression and function of peroxisome proliferator-activated receptors in human melanocytes. *British Journal of Dermatology* 150: 462-468

Kato M, Kusumi T, Tsuuchida S, Tanaka M, Sasaki M, Kudo H (2004) Induction of differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor γ expression in colon cancer cell lines by troglitazone. *J Cancer Res Clin Oncol* 130: 73-79

Keshamouni CG, Reddy RC, Arenberg DA, Joel B, Thannickal VJ, Kalemkerian GP, Standiford TJ (2004) Peroxisome proliferator-activated receptor- γ activation inhibits tumor progression in non-small-cell lung cancer. *Oncogene* 23: 100-108

Kliwer SA, Umesono K, Mangelsdorf DJ, Evans RM (1992) Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. *Nature* 30;355(6359):446-9

Kim EJ, Park KS, Chung SY, Sheen YY, Moon DC, Song YS, Kim KS, Song S, Yun YP, Lee MK, Oh KW, Yoon DY, Hong JT (2003) Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Activator 15-Deoxy- $\sigma^{12,14}$ -Prostaglandin J_2 Inhibits Neuroblastoma Cell Growth through Induction of Apoptosis: Association with Extracellular Signal-Regulated Kinase Pathway. *J Pharm Exp Ther* 307: 505-517

Künzli S, Saurat JH (2003) Peroxisome proliferator-activated receptors in cutaneous biology. *Br J Dermatol* 149: 229-236

Kubota T, Koshizuka K, Williamson EA, Asou H, Said JW, Holden S, Miyoshi I, Koeffler HP (1998) Ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ (Troglitazone) has potent antitumor effect against human prostate cancer both in vitro and in vivo. *Cancer Res* 58: 3344-3352

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 15;227(259):680-5

Lefebvre AM, Chen I, Desreumaux P, Najib J, Fruchart JC, Geboes K, Briggs M, Heyman R, Auwerx J (1998) Activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma promotes the development of colon tumors in C57BL/6J-APCMin/+ mice. *Nature Medicine* 4: 1053–1057

Leff T, Mathews ST, Camp HS (2004) Review: peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and its role in the development and treatment of diabetes. *Exp Diabetes Res* 5(2): 99-109

Legha SS, Ring S, Eton O (1997) Development and results of biochemotherapy in metastatic melanoma: the University of Texas M.D. Anderson Cancer Center experience. *Cancer J Sci Am* 3 Supl 1: 9

Lehmann JM, Lenhard JM, Oliver BB, Ringold GM, Kliewer SA (1997) Peroxisome proliferator-activated receptor α and γ are activated by indomethacin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J Biol Chem* 272: 3406-3410

Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson T, Kliewer SA (1995) An antidiabetic thiazolidindione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor γ . *J Biol Chem* 270: 12953-12956

Lemberger T, Saladin R, Vazquez M, Assimacopoulos F, Staels B, Desvergne B, Wahli W, Auwerx J (1996) Expression of the Peroxisome Proliferator-activated Receptor α Gene Is Stimulated by Stress and Follows a Diurnal Rhythm. *J Biol Chem* 3(19): 1764-1769

Lucarelli E, Sangiogi L, Maini V, Lattanzi G, Marmioli S, Reggiani M, Mordenti M, Gobbi GA, Scrimieri F, Zambon-Bertoja A, Picci P (2002) Troglitazone affects survival of human osteosarcoma cells. *Int J Cancer* 89: 344-351

Mentzel T, Fletcher CD (1995) Lipomatous tumours of soft tissues: an update. *Virchows Arch*; 427(4):353-63

Mössner R, Schulz U, Krüger U, Middel P, Schinner S, Füzesi L, Neumann C, Reich K (2002) Agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibit cell growth in malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 119: 576-82

Mohanty P, Aljada A, Ghanim H, Hofmeyer D, Tripathy D, Syed T, Al-Haddad W, Dhindsa S, Dandona P (2004) Evidence for a potent Antiinflammatory Effect of Rosiglitazone. *J Clin Endocrinol Metabol* 89: 2728-2735

Monden M (2003) Thiazolidinediones inhibit growth of gastrointestinal, biliary, and pancreatic adenocarcinoma cells through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor alpha pathway. *Exp Cell Res* 10;289(1):143-51

Motomura W, Okumura T, Takahashi N, Obara T, Kohgo Y (2000) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ by Troglitazone inhibits cell growth through the increase of p27Kip1 in human pancreatic carcinoma cells. *Cancer Res* 60:5558-5564

Motomura W, Nagamine M, Tanno S, Sawamukai M, Takahashi N, Kohgo Y, Okumura T (2004) Inhibition of cell invasion and morphological change by troglitazone in human pancreatic cancer cells. *J Gastroenterol* 39: 461-468

Orfanos CE, Jung EG, Rassner G, Wolff HH, Garbe C (1994) Position and recommendations of the Malignant Melanoma Committee of the German Society of Dermatology on diagnosis, treatment and after-care of malignant melanoma of the skin. *Status* 1993/94. *Hautarzt* 45(5):285-91

Ornstein, L (1964) Electrophoresis. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci* 28;121:321-49

Palakurthi SS, Aktas H, Grubissich LM, Mortensen RM, Halperin JA (2001) Anticancer effects of thiazolidinediones are independent of peroxisome proliferator-activated receptor γ and mediate by inhibition of translation initiation. *Cancer Res* 61: 6213-6218

Palakurthi SS, Flückiger R, Aktas H, Changolkar AK, Shahsafaei A, Harneit S, Kilic E, Halperin JA (2000) Inhibition of Translation Initiation Mediates the Anticancer Effect of the n-3 Polyunsaturated Fatty Acid Eicosapentaenoic Acid. *Cancer Res* 60: 2919-2925

Pang L, Nie M, Corbett L, Knox AJ (2003) Cyclooxygenase-2 Expression by Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs in Human Airway Smooth Muscle Cells: Role of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors. *J Immunol* 170: 1043-1051

Panigrahy D, Shen LQ, Kieran MW, Kaipainen A. (2003) Therapeutic potential of thiazolidinediones as anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs* 12(12):1925-37

Placha W, Gil D, Dembinska-Kiec A, Laidler P (2003) The effect of PPAR γ ligands on the proliferation and apoptosis of human melanoma cells. *Melanoma Res* 13:447-456

Reich K, Heine A, Hugo S, Blaschke V, Middel P, Kase A, Tilg H, Blaschke S, Gutgesell C, Neumann C (2001) Engagement of the Fc ϵ RI Stimulates the Production of IL-16 in Langerhans Cell-Like Dendritic Cells. *J Immunol* 167: 6321-6329

Rauth S, Green A, Kichima J, Shilkaitis A (1998) Suppression of tumorigenic and metastatic potentials of human melanoma cell lines by mutated (143 Val-Ala) p53. *Br J Cancer* 77: 2215-2222

Saltiel AR, Olefsky JM (1996) Thiazolidinediones in the Treatment of Insulin Resistance and Type II Diabetes. *Diabetes* 45: 16661-1669

Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, De Angelo DJ, Partridge JB, Holden SA, Chen LB, Singer S, Fletcher C, Spiegelmann (1998) Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR γ . *Nature Medicine* 4: 1046-1052

Sarraf P, Mueller E, Smith WM, Wright HM, Kum JB, Aaltonen LA, De la Chapelle A, Spiegelmann BM, Eng C (1999) Loss of function mutations in PPAR γ associated with human colon cancer. *Mol Cell* 3: 799-804

Sato H, Ishihara S, Kawashima K, Moriyama N, Suetsugu H, Kazumori H, Okuyama T, Rumi MAK, Kukuda R, Nagasue N, Kinoshita Y (2000) Expression of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ in gastric cancer and inhibitory effects of PPAR γ agonists. *Br J Cancer* 83: 1394-1400

Schwartz S, Raskin P, Fonseca V, Graveline JF(1998) Effect of troglitazone in insulin-treated patients with type II diabetes mellitus. Troglitazone and Exogenous Insulin Study Group. *N Engl J Med* 26;338(13):861-6

Shen PF (2004) Molecular mechanism of chemoprevention and therapy of cancer by retinoids. *Front Biosci* 1(9): 2663-2670

Shimada T, Kojima K, Yoshiura K, Hiraishi H, Terano A (2002) Characteristics of the peroxisome proliferator activated receptor γ (PPAR γ) ligand induced apoptosis in colon cancer cells. *Gut* 50: 658-664

Su JL, Simmons C J, Wisely B, Ellis B, Winegar DA (1998) Monitoring of PPAR alpha protein expression in human tissue by the use of PPAR alpha-specific Mabs. *Hybridoma* 17:47-53

Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM (1995) Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev* 5(5):571-6

Tontonoz P, Singer S, Forman BM, Sarraf P, Fletcher JA, Fletcher CD, Brun RP, Mueller E, Altiock S, Oppenheim H, Evans RM, Spiegelman BM (1997) Terminal differentiation of human liposarcoma cells induced by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor gamma and the retinoid X receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 7;94(1):237-41

Tontonoz L, Nagy L, Alvarez J, Thomazy VA, Evans RM (1998) PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93:241-252

Tsubouchi Y, Sano H, Kawahito Y, Mukai S, Yamada R, Kohno M, Inoue K, Hla T, Konodo M (2000) Inhibition of human lung cancer cell growth by the peroxisome proliferator-activated receptor γ agonists through induction of apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 400-405

Tsujie M, Nakamori S, Okami J, Hayashi N, Hiraoka N, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Sarraf P, Mueller E, Jones D, King FJ, DeAngelo DJ, Partridge JB, Holden SA, Chen LB, Singer S, Fletcher C, Spiegelman BM (1998) Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPAR gamma. *Nature Medicine* 4: 1046–1052

Tsujie M, Nakamori S, Okami J, Hayashi N, Hiraoka N, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Sakon M, Monden M (2003) Thiazolidinediones inhibit growth of gastrointestinal, biliary, and pancreatic adenocarcinoma cells through activation of the peroxisome proliferator-activated receptor γ /retinoid X receptor α pathway. *Exp Cell Res* 289: 143-151

Whiteman DC, Valery P, McWhirter W, Green AC (1997) Risk factors for childhood melanoma in Queensland, Australia. *Int J Cancer* 70:26.

Yoshida K, Tanabe K, Fujii D, Oue N, Yasui W, Toge T (2003) Induction Mechanism of Apoptosis by Troglitazone Through Peroxisome Proliferator-activated Receptor- γ in Gastric Carcinoma Cells. *Anticancer Res* 23: 267-274

Yoshimura R, Matsuyama M, Segawa Y, Hase T, Mitsushashi M, Tsuchida K, Wada S, Kawahito Y, Sano H, Nakatani T (2003) Expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in human urinary bladder carcinoma and growth inhibition by its agonist. *Int J Cancer* 104: 597-602

Yoshizumi T, Ohta T, Ninomiya I, Terada I, Fushida S, Fujimura T, Nishimura G, Shimizu K, Yi S, Miwa K. (2004) Thiazolidinedione, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, inhibits growth and metastasis of HT-29 human colon cancer cells through differentiation-promoting effects. *Int J Oncol* 25(3):631-9

Zhou J, Wilson KM, Medh JD (2002) Genetic analysis of four novel peroxisome proliferator activated receptor-gamma splice variants in monkey macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 293(1):274-83

IX. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.