

Aus dem Institut für Anatomie II:
Experimentelle Morphologie

(Direktor: Prof. Dr. U. Schumacher)

Zentrum für Experimentelle Medizin

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**In vitro Untersuchungen zur Kombinationstherapie
des humanen malignen Melanoms.**

Dissertation

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

vorgelegt von

Dr. med. Christian Freudlsperger

aus Albstadt-Ebingen

Hamburg, 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin

Der Universität Hamburg am: 14.11.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die/der Vorsitzende/r: Prof. Dr. U. Schumacher

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. M. Augustin

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. H. – E. Laack

I.	Arbeitshypothese und Fragestellung	8
II.	Einleitung.....	9
1.	Das maligne Melanom	9
2.	Substanzen mit antiproliferativer Wirkung auf das maligne Melanom.....	9
2.1.	Der PPAR- γ Agonist Rosiglitazone	9
2.2.	Das Mistellektin I.....	10
2.3.	Der Proteasomen Inhibitor Bortezomib	11
III.	Material.....	14
1.	Die Melanomzelllinien.....	14
2.	Die antiproliferativen Substanzen	14
IV.	Methoden.....	15
1.	Zellproliferationsteste.....	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	18
1.6.	Statistische Auswertungen	19
1.6.1.	Balkendiagramme.....	20
1.6.2.	Dosis-Wirkungs-Kurven und EC ₅₀ Werte	20
1.6.3.	Gesamtwirkung.....	21
2.	Nachweis einer Apoptose Induktion durch Bortezomib.....	21
2.1.	Apoptose Nachweis anhand von morphologischen Kriterien.....	21
2.1.1.	Herstellung von Zytospin Präparaten.....	22
2.1.2.	Feulgen Färbung	22
2.2.	Apoptose Nachweis durch Bestimmung von DNS Fragmenten.....	23
2.2.1.	Proben Vorbereitung.....	23

2.2.2.	Bestimmung von DNS Fragmenten mit ELISA	23
3.	Nachweis der NF κ B Inhibition	24
3.1.	Western Blot	24
3.1.1.	Isolierung der Proteine aus den Melanomzellen	24
3.1.2.	Konzentrationsbestimmungen von Proteinen in Lösung	25
3.1.3.	SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese	26
3.1.4.	Elektrophoretischer Transfer von Proteinen	27
3.1.5.	Immunologischer Nachweis der Proteine	28
3.1.6.	Antikörpernachweis durch Chemilumineszens	28
3.1.7.	Quantifizierung der Proteine	28
3.2.	Immunzytochemie.....	29
V.	Ergebnisse.....	31
1.	Ergebnisse der Zellproliferationsassays	31
1.1.	Einzelsubstanzen.....	31
1.1.1.	Balkendiagramme.....	31
1.1.2.	Dosis-Wirkungs-Kurven und EC ₅₀ Werte	32
1.2.	Zweifachkombinationen	37
1.2.1.	Balkendiagramme.....	37
1.2.2.	Dosis-Wirkungs-Kurven und EC ₅₀ -Werte	38
1.3.	Dreifachkombination	42
1.3.1.	Balkendiagramme.....	42
1.3.2.	Dosis-Wirkungskurven und EC ₅₀ -Werte.....	43
1.4.	Vergleich der Gesamthemmung der verschiedenen Zusätze	45
2.	Ergebnisse des Nachweises der Apoptoseinduktion	47
2.1.	Nachweis einer Apoptose Induktion anhand morphologischer Kriterien	47
2.2.	Ergebnisse des molekularen Tests.....	48
3.	Ergebnisse des NF κ B Nachweises.....	49
3.1.	NF κ B Nachweis durch Western Blot.....	49
3.2.	NF κ B Nachweis mit immunzytochemischen Färbungen	51
VI.	Diskussion	52

VII. Zusammenfassung	59
VIII. Literaturverzeichnis	60
IX. Danksagung	70
X. Publikationsverzeichnis	72
XI. Erklärung	73

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 assay
FCS	Fetales Kälberserum (f etal c alf s erum)
FDA	US F ood and D rug A dministration
g	Erdbeschleunigung
IKK	I κB K inase K omplex
IL-1/6	I nterleukin-1/6
KCl	K alium c hlorid
kDa	k ilo D alton
min	M inute(n)
ml	m illiliter
ML-I	M istellektin I
mM	m illimolar
NaCl	N atrium c hlorid
NaVO ₄	N atriumvanadat
nm/nM	N anometer/ N anomolar
NFκB	N ukleärer F aktor κ B
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- g amma
PPRE	P eroxisome p roliferator r esponse element
RIP	R ibosom-inaktivierenden P roteine
RXR	R etinoid X - R ezeptor

SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (tris buffered saline)
TNF- α	Tumornekrosefaktor-α
$\mu\text{g}/\mu\text{l}$	mikrogramm/mikroliter
U	Enzymeinheit (unit)
V	Volt

I. Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Mortalität des malignen Melanoms übersteigt die aller anderen Hauttumoren zusammengenommen um ein Vielfaches, was zum einem an seiner Tendenz zur frühen Metastasierung und zum anderen an seiner ausgeprägten Resistenz gegenüber konventioneller Chemotherapie liegt. Nach eingetretener Fernmetastasierung bleibt Dacarbazin, mit einer Ansprechrate von lediglich 15-20%, die zurzeit wirksamste Monosubstanz. Die Anwendung von unterschiedlichen Polychemo- und Chemoimmuntherapieschemata führte bis jetzt zu keiner signifikanten Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit, obgleich die Toxizität der kombinierten Chemotherapien im Vergleich zur Monotherapie signifikant erhöht war. Da das maligne Melanom weltweit eine deutlich steigende Inzidenz aufweist, besteht weiterhin ein großer Bedarf an neuen Therapieoptionen zur systemischen Behandlung von malignen Melanomen. Für bestimmte Substanzen, wie dem PPAR- γ Agonisten Rosiglitazone, dem Mistellektin I und dem Proteasomen Inhibitor Bortezomib, konnte bereits in der Verwendung als Einzelsubstanzen in vitro eine antiproliferative Wirkung auf das maligne Melanom beschrieben werden, wobei dieser Effekt durch jeweils unterschiedliche Mechanismen erzielt wurde. Ausgehend von diesen drei viel versprechenden Substanzen, sollten in der vorliegenden Arbeit folgende Fragen geklärt werden:

- Zeigt eine Zweifachkombination aus den Stoffen, Rosiglitazone, Mistellektin I und Bortezomib einen gesteigerten antiproliferativen Effekt auf humane Melanomzelllinien im Vergleich zu den jeweiligen Einzelsubstanzen?
- Ist eine Dreifachkombination aus Rosiglitazone, Mistellektin-I und Bortezomib effektiver als die beste Zweifachkombination?
- Welche Hinweise für die molekularen Wirkmechanismen der antiproliferativen Wirkung von Bortezomib auf die Melanomzellen gibt es?

II. Einleitung

1. Das maligne Melanom

Die Inzidenz des kutanen malignen Melanoms hat in den vergangenen Jahrzehnten weltweit dramatisch zugenommen (Desmond et al., 2003). In der Bundesrepublik Deutschland stieg die Inzidenzrate von 3 Fällen pro 100 000 Einwohner und Jahr Anfang der 1970er Jahre auf etwas 12 Fälle pro 100 000 Einwohner und Jahr um die Jahrtausendwende (Garbe et al., 2001). Die Mortalität des malignen Melanoms übersteigt die aller anderen Hauttumoren zusammengenommen um ein Vielfaches, was zum einem an seiner Tendenz zur frühen Metastasierung und zum anderen an seiner ausgeprägten Resistenz gegenüber konventioneller Chemotherapie liegt. Nach eingetretener Fernmetastasierung (Stadium IV) liegt die mediane Überlebenszeit bei lediglich 6-10 Monaten und die 5-Jahres Überlebensrate bei unter 5% (Balch et al., 2001). Dacarbazin (Detimedac[®]) als wirksamstes Einzelpräparat gilt nach wie vor als Standardtherapie, weist jedoch eine Ansprechrate von lediglich 15-20% auf, die zudem nur mit einer durchschnittlichen Ansprechzeit von nur 4 Monaten verbunden ist. Zurzeit gibt es keine randomisierten klinischen Studien, die eine Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit durch Polychemo- oder Chemoimmuntherapieschemata im Vergleich zu einer Monotherapie mit Dacarbazin aufweisen (Sun et al., 2001). Dies zeigt die dringende Notwendigkeit für neue Ansatzpunkte in der Melanomtherapie auf.

2. Substanzen mit antiproliferativer Wirkung auf das maligne Melanom

2.1. Der PPAR- γ Agonist Rosiglitazone

Die *Peroxisome proliferator-activated receptors* (PPARs) 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). Zurzeit gibt es drei bekannte Formen von PPARs: α , β und γ . Die wahrscheinlich am meisten erforschte Form ist PPAR- γ , der in einer großen Vielfalt von Zellen exprimiert wird, zu denen Adipozyten, Makrophagen und Enterozyten gezählt werden. Genau wie andere Mitglieder der nukleären Rezeptorfamilie reguliert auch PPAR- γ die Genexpression indem er nach Ligandenbindung Heterodimere mit dem Retinoid X-Rezeptor (RXR) bildet. Das PPAR/RXR Heterodimer bindet an eine bestimmte Nukleotidsequenz, das *peroxisome proliferator response elements* (PPRE), das sich in der Promotor-Region von Zielgenen befindet (Murphy et al., 2000). 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 (Spiegelman, 1998). Sie werden bereits klinisch als orale Antidiabetika beim nicht-insulinabhängigem Typ-II-Diabetes eingesetzt (Lehmann et al., 1995). Neuere Forschungen haben zusätzlich gezeigt, dass PPAR- γ Liganden die zelluläre Differenzierung induzieren und das Wachstum von Karzinomen verschiedener Gewebe wie Mamma (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. Mögliche Mechanismen der antiproliferativen Wirkung der Glitazone sind ein Anhalten des Zellzyklus in der G₁ Phase wie es bei Kolonkarzinom Zellen beobachtet wurde (Brockmann et al., 1998), ein Auslösen einer Redifferenzierung maligner Zellen (Kitamura et al., 1999) oder eine Induktion der Apoptose, wie es bei Mammakarzinom- (Elstner et al., 1998), Chorionkarzinom- (Keelan et al., 1999) und Prostatakarzinomzellen (Kubota et al., 1998) bereits beschrieben wurde.

Für das maligne Melanom wurde *in vitro* eine antiproliferative Wirkung des Glitazons Rosiglitazone beschrieben, die aber nicht durch eine Induktion der Apoptose vermittelt wurde (Freudlsperger et al., 2006), sondern vielmehr durch ein Anhalten des Zellzyklus in der G₁ Phase (Mössner et al., 2002).

2.2. Das Mistellektin I

Mistelextrakte finden wegen ihrer immunmodulierenden Wirkung bei einer großen Zahl von Tumorpatienten ihre Anwendung. Neben anderen Inhaltsstoffen wie

Viscotoxine oder Flavonoide werden hauptsächlich die drei Mistellektine für die Wirkung der Mistelextrakte verantwortlich gemacht, wobei das Mistellektin I (ML-I) das biologisch wirksamste und am besten untersuchte ist. ML-I besteht aus einer zytotoxischen A-Kette und einer kohlenhydratbindenden B-Kette und weist viele Ähnlichkeiten mit dem Ricin-Molekül auf (Dietrich et al., 1992). Die B-Kette von ML-I ist für die Internalisierung des Lektinmoleküls in die Zelle verantwortlich, die A-Kette ist durch seine hochspezifische N-Glykosidase Aktivität ein potenter Ribosomeninaktivator (Endo et al., 1988), weswegen ML-I zu der Typ-II-Familie der Ribosom-inaktivierenden Proteine (RIP) gezählt wird (Stirpe et al., 1992). Die biologischen Wirkungen von ML-I kann in immunmodulierende und direkt zytotoxische Effekte unterteilt werden. Dabei ist die wachstumshemmende Wirkung hauptsächlich auf eine Induktion der Apoptose zurückzuführen (Büssing et al., 1996), die über die Proteinsynthese-hemmende Wirkung der A-Kette vermittelt wird (Hostanska et al., 1996). Für die immunmodulierende Wirkung von ML-I, die dosisabhängig zu einer Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin(IL)-1, IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF)- α führt, scheint die zuckerbindende B-Kette maßgeblich beteiligt zu sein (Hajto et al., 1990). Für das maligne Melanom konnte *in vitro* der anti-proliferative Effekt von ML-I durch eine Induktion der Apoptose bestätigt werden (Thies et al., 2005).

2.3. Der Proteasomen Inhibitor Bortezomib

Bortezomib (Velcade[®]) gehört zu der Gruppe der Proteasomen-Inhibitoren, welche reversibel die physiologische Wirkung des 26S Proteasoms hemmen. Das 26S Proteasom degradiert ausschließlich Proteine, die zuvor mit einer Ubiquitin-Kette kovalent verbunden worden waren. Diese Ubiquitinierung erfordert drei Enzyme, *ubiquitin-activating enzyme* (E1), *ubiquitin-conjugating enzyme* (E2) und *ubiquitin ligase* (E3) (Jesenberger et al., 2002). Proteine, die durch diesen *Ubiquitin-Proteasome Pathway* (UPP) abgebaut werden, sind für wichtige intrazelluläre Prozesse wie Zelldifferenzierung, Zellzykluskontrolle und Antigenpräsentation verantwortlich (Zavrski et al., 2005). In mehreren Studien konnte bereits eine antiproliferative Wirkung von Bortezomib auf unterschiedliche Tumorentitäten wie Ovarialkarzinom (Frankel et al., 2000), nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom (Ling et al., 2003), Plattenepithelkarzinom (Sunwoo et al., 2001), Prostatakarzinom (Williams

et al., 2003) und Pankreaskarzinom (Nawrocki et al., 2002) gezeigt werden. Außerdem wurde Bortezomib als erster Vertreter der Proteasomen Inhibitoren im Mai 2003 von der *US Food and Drug Administration* (FDA) zur Behandlung des therpierefraktären multiplen Myeloms zugelassen (Rajkumar et al., 2005).

Etliche Effekte von Bortezomib scheinen allerdings primär durch die Hemmung des NF κ B Signalwegs vermittelt zu sein. NF κ B, ein Heterodimer, das hauptsächlich aus den Untereinheiten p50 und p65 besteht, ist ein Transkriptionsfaktor, der Zellwachstum, Expression von Zytokinen und Apoptose reguliert (Karin, 1999). Unter normalen Bedingungen ist NF κ B im Zytoplasma an seinen Inhibitor I κ B α gebunden (Karin, 1999), der NF κ B daran hindert, in den Zellkern zu translozieren. Auf zellulären Stress hin, der zum Beispiel durch Zytokine oder Chemotherapie ausgelöst werden kann, wird I κ B α durch den I κ B Kinase Komplex (IKK) phosphoryliert, durch eine E3 Ubiquitin Ligase ubiquitiniert (Karin et al., 2000) und schließlich durch das 26S Proteasom abgebaut (vergleiche Abbildung 2.1.). Das nun freie NF κ B transloziert in den Zellkern und steuert die Transkription einer Vielzahl von Zielgenen, die zum großen Teil für die Kontrolle der Apoptose verantwortlich sind. In den meisten Zellen und vor allem in Tumorzellen fördert die NF κ B Aktivierung die Zellproliferation (Huang et al., 2000), steuert die Expression von Adhäsionsmolekülen und schützt vor allem die Zelle vor Apoptose durch die Induktion von verschiedenen Überlebensgenen (Jesenberger et al., 2002). Durch Bortezomib kann nun der proteasomale Abbau von I κ B α verringert und somit der gesamte NF κ B Signalweg gehemmt werden. Dies führt in Tumorzellen zu einem Anstieg der Apoptoserate und sensibilisiert die Zellen für Apoptose induzierende Chemotherapeutika (Orlowski et al., 2002).

In neueren Studien konnte gezeigt werden, dass humane Melanomzellen, vor allem solche mit einem hohem Metastasierungspotential, eine starke Aktivierung des NF κ B Signalwegs aufweisen und dass NF κ B eine wichtige Rolle für das Tumorwachstum, die Angiogenese und die Metastasierung des malignen Melanoms spielt (Huang et al., 2000). Dies weist darauf hin, dass NF κ B ein wichtiges Ziel zukünftiger Therapieansätze für das maligne Melanom sein könnte.

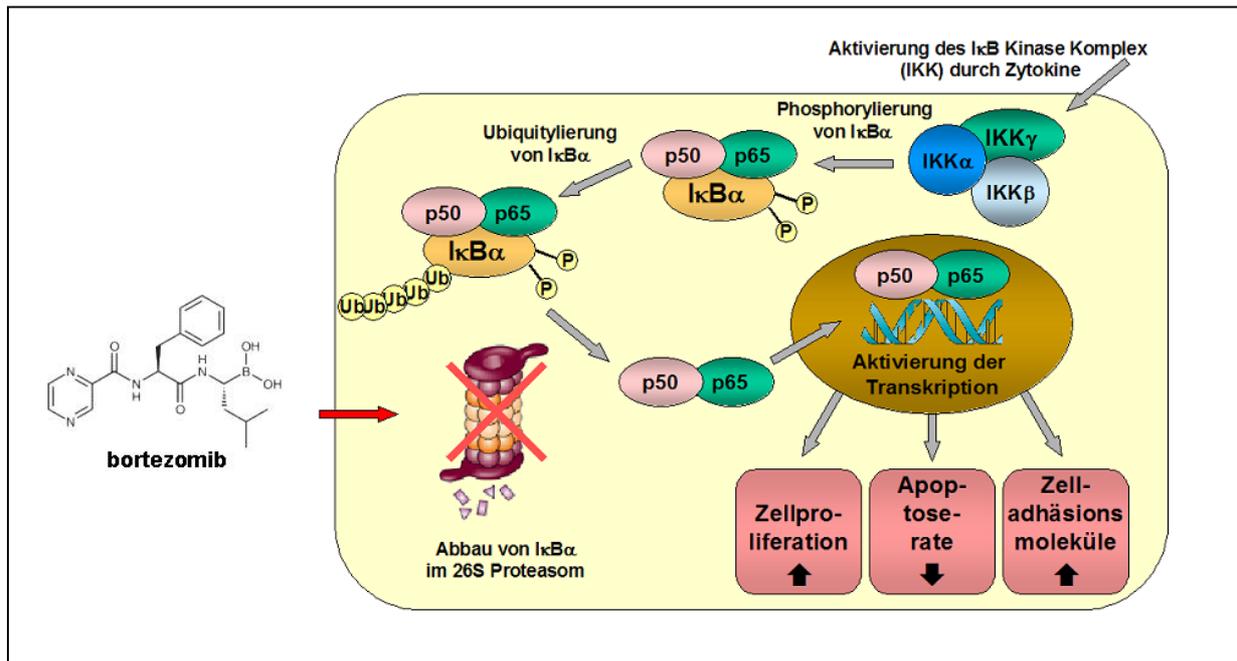


Abbildung 2.1.: Der Effekt von Bortezomib auf den NFκB Signalweg. Durch die Hemmung des 26S Proteasoms, verhindert Bortezomib den Abbau des NFκB Inhibitors IκBα und damit die Translokation von NFκB in den Zellkern (Modifiziert nach Adams et al., 2004)

III. Material

1. Die Melanomzelllinien

Es wurden drei verschiedene humane kutane Melanomzelllinien verwendet. Die Zelllinien MV3, etabliert aus einer Lymphknotenmetastase (Edward 2001) wurde freundlicherweise von Frau Prof. Dr. I. 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 FemX-1, etabliert aus einer Lymphknotenmetastase (Fostad et al., 1988), wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. O. Fostad (Abteilung für Tumorbioogie, Universitätskrankenhaus Oslo, Norwegen) zur Verfügung gestellt.

2. Die antiproliferativen Substanzen

Der synthetische PPAR- γ Agonist Rosiglitazone wurde freundlicherweise von GlaxoSmithKline, München, Deutschland zur Verfügung gestellt. Rosiglitazone wurden in 100% Ethanol gelöst und mit 10% Ethanol weiter verdünnt. Das Mistellektin ML-I wurde nach dem Protokoll von Eifler (Eifler et al., 1993) gewonnen und von Prof. Dr. U. Pfüller (Institut für Phytochemie, Universität Witten/Herdecke, Deutschland) bezogen. ML-I wurde in PBS weiter verdünnt. Bortezomib (Velcade[®]) wurde käuflich von Millenium Pharmaceuticals (Cambridge, England) über die Krankenhausapotheke erworben. Bortezomib wurde in PBS sowohl gelöst als auch weiter verdünnt.

IV. Methoden

1. Zellproliferationsteste

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 wurden 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) im Brutschrank 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 drei Zelllinien über mehrere Wochen in Zellkulturflaschen vermehrt und ein Suspensionspool von jeder der drei 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 je 1,5 ml verteilt. Die Aliquots wurden über Nacht auf -80°C gekühlt und abschließend in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. 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[®] Dulbecco's Phosphat-Buffered Saline, Invitrogen, Carlsbad, USA) 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 10 000 und dem entsprechenden Verdünnungsfaktor multiplizieren (Vergleiche Abbildung 4.1.)

$$\frac{\text{Gezählte Zellzahl (8 Grossquadrate zu je } 1 \text{ mm}^3) \times 10\,000 \times \text{Verdünnungsfaktor (=10)}}{\text{Anzahl der Grossquadrate (=8)}} = \text{Zellzahl / ml}$$

Abbildung 4.1.: Zellzählung. Formel für die Zellzahlberechnung mittels Zählkammer nach Neubauer

1.4. Erstellen von Eichkurven

Da in den folgenden Zellproliferationsassays der Einfluss von unterschiedlichen Stoffen mit antiproliferativer Wirkung 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 96 Stunden gewährleistet. Ein optimales Wachstumsverhalten ist dann gegeben, wenn sich die Zellen im exponentiellen Wachstum befinden. 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 einer 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 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 des Zellwachstums durch die Zugabe von Ethanol berücksichtigt werden. Abschließend wurden die Mikrotiterplatten für weitere 48 Stunden inkubiert. Zur Ermittlung der Zelldichte wurde insgesamt 96 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/ml

entspricht. Von dieser Konzentration wurden jeweils 50 μ l 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

Zum Aussäen der einzelnen Melanomzellreihen auf die Mikrotiterplatten wurde jeweils diejenige Zellkonzentration gewählt, die ein optimales Wachstum für die Versuchsdauer von 96 Stunden gewährleistete. Die jeweiligen Zellzahlen/ml sind in Tabelle 4.1. zusammengefasst.

Zelllinie	MV3	G361	FemX-1
Zellzahl/ml	14 000	16 000	14 000

Tabelle 4.1.: Zusammenfassende Darstellung der Zellzahlen/ml, die ein optimales Wachstum der jeweiligen Zelllinien über die Versuchsdauer von 96 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 drei Melanomzelllinien und jede der unterschiedlichen Zusätze durchgeführt. So lagen am Ende für jeden einzelnen Versuch insgesamt mindestens 12 Messwerte vor. Zuerst wurde auf jede Mikrotiterplatte in jeweils vier Näpfe 70 μ l des Kulturmediums pipettiert. Diese vier Näpfe dienten später dem ELISA-Reader als Leerwert. Als nächstes wurden, die übrigen Näpfe mit jeweils 70 μ l der Zellsuspension gefüllt. Die Zellkonzentration der Zellsuspension richtete sich nach der jeweiligen Eichkurve der entsprechenden Melanomzellreihe (Siehe Tabelle 4.1.). Des Weiteren dienten auf jeder Mikrotiterplatte jeweils vier Näpfe als Kontrollen. Die Werte dieser Kontrolle dienten später bei der Auswertung der Zellproliferationsassays als 100% Wert, zu denen die übrigen Werte in Relation gesetzt wurden. Zu den Kontroll-Näpfen wurde das Lösungsmittel des jeweiligen Stoffes bzw. Stoffgemisches gegeben, um mögliche antiproliferative Effekte des

Lösungsmittels auszuschließen. Anschließend wurden die Mikrotiterplatten im Brutschrank für 48 Stunden unter Standardbedingungen inkubiert, um ein optimales Anwachsen der Zellen am Boden der Näpfe zu gewährleisten. Nach dieser Anwachsphase sollten die unterschiedlichen Stoffe bzw. Stoff-Kombinationen in gelöster Form den einzelnen Näpfen zugesetzt werden. Um die Einflüsse der drei verwendeten antiproliferativen Stoffe allein oder in unterschiedlichen Kombinationen zu untersuchen, wurden die Versuchsreihen in Einzelsubstanzen, Zweifachkombinationen und Dreifachkombination unterteilt (vergleiche Tabelle 4.2.)

Einzelsubstanzen	Zweifachkombinationen	Dreifachkombination
Bortezomib	Bortezomib + Rosiglitazone	Bortezomib + Rosiglitazone + ML-I
Rosiglitazone	Bortezomib + ML-I	
ML-I	ML-I + Rosiglitazone	

Tabelle 4.2.: Einteilung der Versuchsreihen in Einzelsubstanzen, Zweifachkombinationen und Dreifachkombination.

Jede dieser Substanzen wurde in sieben unterschiedlichen Konzentrationen (1×10^{-1} – 1×10^{-7} mg/ml) auf die Melanomzellen pipettiert und die Mikrotiterplatten wurden für weitere 48 Stunden im Brutschrank unter Standardbedingungen inkubiert. 96 Stunden nach dem Aussäen, erfolgte die Auswertung der Zellproliferationsassays mit Hilfe des Cell Proliferation Kit II (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). 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 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) verwendet, wobei p-Werte < 0,05 als statistisch signifikant bewertet wurden. Insgesamt wurden drei unterschiedliche statistische Darstellungen gewählt, um die Wirkung der unterschiedlichen Zusätze

darzustellen.

1.6.1. Balkendiagramme

Um die Wirkung eines Stoffes bzw. einer Stoffkombination auf eine bestimmte Zelllinie anschaulich darzustellen wurde das Balkendiagramm gewählt. Dazu wurden die gemittelten ELISA-Reader Werte jeder Konzentration in Prozent zum gemittelten Kontrollwert gesetzt und in Form von Balken 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. Zusätzlich wurde die Standardabweichung graphisch dargestellt.

1.6.2. Dosis-Wirkungs-Kurven und EC₅₀ Werte

Um die Beziehung zwischen der Wirkung eines Stoffes auf eine Zelllinie und der Stoffkonzentration graphisch darzustellen wurden Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt. Dazu wurden die Stoffkonzentrationen logarithmisch auf der X-Achse aufgetragen. Auf der Y-Achse sollte die Wirkung eines Stoffes in Prozent der maximalen Wirkung dargestellt werden. Dazu wurde der jeweilige Kontrollwert, d. h. die Zellproliferation ohne Zusatz eines Stoffes, gleich 0% gesetzt und die maximale Hemmung, die ein Stoff auf eine Zelllinie ausübte, gleich 100% gesetzt. Die restlichen Y-Werte wurden entsprechend berechnet. Die so entstandenen Dosis-Wirkungs-Kurven wurden durch vier Werte bestimmt: Die Basislinie (Hier: 0%), die maximale Wirkung (Hier: 100%), die Steigung der Kurve und der EC₅₀-Wert (Effective Concentration). Der EC₅₀ Wert, gibt die jeweilige Stoffkonzentration an, bei der eine Hemmung erreicht wird, die genau in der Mitte zwischen der Basislinie und der maximalen Hemmung liegt (Hier: 50% der maximalen Hemmung). Da der EC₅₀-Wert für jeden Stoff bzw. für jede Stoffkombination lediglich diejenige Konzentration angibt, bei der 50% der maximalen Hemmung auf eine bestimmte Zelllinie erreicht wird, muss er immer im Zusammenhang mit der erreichten maximalen Hemmung interpretiert werden.

1.6.3. Gesamtwirkung

Um die gesamte Hemmung, die ein Stoff oder eine Stoffkombination auf eine bestimmte Zelllinie aufweist, zu berechnen, wurden analog zu den Balkendiagrammen (Vergleiche 1.6.1.) Kurven erstellt mit der jeweiligen Konzentration auf der X-Achse und der entsprechenden Zellproliferation in Prozent zur Kontrolle auf der Y-Achse. Die Fläche unter diesen Kurven entspricht nun der gesuchten Gesamthemmung die ein Stoff bzw. eine Stoffkombination auf eine Zelllinie ausübt. Aus den errechneten Flächen unter den Kurven wurde anschließend für jede der drei Zelllinie derjenige Zusatz, welcher die geringste Hemmung des Zellwachstums aufwies gleich 100% gesetzt und die Zusätze in Verhältnis zu dem 100% Wert gesetzt. Um statistische Unterschiede zwischen den einzelnen Zusätzen darzustellen, wurde für jede Zelllinie ein Balkendiagramm erstellt und die einzelnen Zusätze mit Hilfe eines One-Way ANOVA Tests und darauf folgendem Tukey-Test verglichen. Für alle Ergebnisse wurde zusätzlich die Standardabweichung bestimmt und graphisch dargestellt.

2. Nachweis einer Apoptose Induktion durch Bortezomib

Eine mögliche Induktion von Apoptose durch Bortezomib in den Melanomzellen wurde exemplarisch an der Zelllinie MV3 untersucht. Dabei sollte eine Apoptoseinduktion sowohl durch die für Apoptose typischen Veränderungen der Kernmorphologie, als auch durch den Nachweis auf molekularer Ebene nachgewiesen werden.

2.1. Apoptose Nachweis anhand von morphologischen Kriterien

Der programmierte Zelltod umfasst eine Reihe von morphologischen Veränderungen, die beim Abbau der Zelle auftreten, die von einer Kernkondensation über eine Kernfragmentierung bis zur Entstehung von charakteristischen Apoptose Körperchen reichen. Um eine mögliche Apoptose Induktion zu untersuchen wurden zuerst Zytospins von MV3 Zellen die mit Bortezomib behandelt wurden angefertigt und anschließend eine Kernfärbung nach Feulgen durchgeführt.

2.1.1. Herstellung von Zytospin Präparaten

Die MV3 Zellen wurden wie oben beschrieben trypsinisiert und gezählt. Anschließend wurden die Zellen in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml auf 6-Napf-Platten (Greiner, Frickenhausen, Germany) ausgesät und für 24 h im Brutschrank kultiviert, um ein optimales Anhaften der Zellen an den Boden der 6-Napf-Platten zu gewährleisten. Anschließend wurde frisches Kulturmedium mit einer Bortezomib-Konzentration von 0,01 mg/ml appliziert und die Zellen wurden für weitere 24 Stunden inkubiert. Zu den Kontrollzellen wurde analog Kulturmedium ohne Bortezomib gegeben. Nach der Inkubationszeit wurden aus den behandelten und den Kontrollzellen Zytospins erstellt. Hierfür wurden die Zellen nach Zugabe von Trypsin-EDTA (Gibco® Trypsin-EDTA, Invitrogen, Carlsbad, USA) bei 37°C und 5% CO₂ für fünf Minuten inkubiert, so dass sich die Zellen vom Boden lösten. Zum Stoppen der Trypsinwirkung, und um eine Schädigung der Zellen zu vermeiden, wurde danach Kulturmedium zu den Zellen hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen mit PBS (Gibco® Dulbecco's Phosphat-Buffered Saline, Invitrogen, Carlsbad, USA) gespült und für zehn Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Nach Abgießen des Überstandes wurden die Zellen in 600 µl PBS resuspendiert und von dieser Suspension 200 µl in eine Zytospinvorrichtung gegeben und für drei Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und an den so entstandenen Zytospins eine Feulgen-Färbung (Romeis, 1989) durchgeführt.

2.1.2. Feulgen Färbung

Die Zellen wurden in 4% Paraformaldehyd für 5 Minuten auf den Objektträger fixiert und anschließend fünf Minuten in Phosphatpuffer gespült. Danach wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 1 Minute in 1 N HCl gespült und eine Hydrolyse in 1 N HCl bei 60°C für 8 Minuten durchgeführt. Im Anschluss erfolgte wieder eine Spülung der Zellen in 1 N HCl bei Raumtemperatur für 1 Minute. Die Zellen wurden danach in Schiff's Reagenz (Merck, Darmstadt, Deutschland) überführt und für 45 Minuten belassen. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen dreimal für jeweils 2 Minuten in Bisulfit-Lösung (3 x 200 ml bestehend aus 540 ml Aqua dest., 30 ml 1 N HCl, 30 ml

10% Kaliummetabisulfit) gespült, anschließend gründlich in Aqua dest. gespült, dehydriert und mit Eukitt (Kindler GmbH & Co, Freiburg, Deutschland) eingedeckt (Romeis, 1989). Anschließend wurden die Kerne auf für Apoptose typische, morphologische Veränderungen unter einem Photomikroskop (Axioplan 2, Zeiss, Oberkochen, Deutschland) bei 40-facher Vergrößerung betrachtet.

2.2. Apoptose Nachweis durch Bestimmung von DNS Fragmenten

Innerhalb des Prozesses der Apoptose werden endogene Endonukleasen aktiviert, welche die Doppelstrang DNS spalten und so Mono- bzw. Oligonucleosome erzeugen. Diese histone-assoziierten DNS Fragmente wurden qualitativ und quantitativ mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) nachgewiesen.

2.2.1. Proben Vorbereitung

MV3 Zellen wurden wie oben beschrieben trypsinisiert und gezählt. 500 µl Zellsuspension (Zellkonzentration von 1×10^5 Zellen/ml) wurden in ein Eppendorf Gefäß überführt. 500 µl Kulturmedium mit einer Bortezomib Konzentration von 0,1 mg/ml bzw. 0,01 mg/ml wurde appliziert und die Zellen wurden für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 200 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 1500 x g wurde das Zellpellet mit 500 µl Incubation buffer resuspendiert und bei 25°C für 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 20 000 x g für 10 Minuten und 400 µl des gewonnenen Überstandes wurde vorsichtig abpipettiert. Der Überstand wurde im Folgendem als zytoplasmatische Fraktion verwendet.

2.2.2. Bestimmung von DNS Fragmenten mit ELISA

100 µl Coating Solution wurden in jeden Napf der Mikrotiterplatte pipettiert, die Näpfe wurden mit Folie luftdicht abgeschlossen und 1 Stunde bei Raumtemperatur

inkubiert. Nach Entfernen der Coating Solution wurde 200 μ l Incubation Buffer in jeden Napf pipettiert, die Näpfe wurden mit Folie luftdicht abgeschlossen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Näpfe mit Washing Solution wurde in jeweils 2 Näpfe 100 μ l der zytoplasmatischen Fraktion der beiden mit unterschiedlichen Bortezomib Konzentrationen behandelten Zellen pipettiert. Für die Bestimmung des Leerwertes wurde in 2 Näpfe lediglich Incubation Buffer pipettiert. Anschließend wurden die Näpfe mit Folie luftdicht abgeschlossen und für 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Washing Solution wurde in jeden Napf bis auf die für die Leerwerte, 100 μ l Coating Solution appliziert, mit Folie luftdicht abgeschlossen und für weitere 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Washing Solution wurde in jeden Napf 100 μ l Substrate Solution gegeben und die Mikrotiterplatte auf einem Plattenschüttler für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte in einem ELISA-Reader bei 405 nm gemessen. Von den gemittelten Extinktionen wurde jeweils der gemittelte Leerwert abgezogen und die Extinktionen gegen die Bortezomib Konzentrationen graphisch aufgetragen.

3. Nachweis der NF κ B Inhibition

Für den Nachweis, ob Bortezomib seine Wirkung über eine verminderte Aktivierung und Translokation von NF κ B in den Kern vermittelt, wurde exemplarisch die Melanomzelllinie MV3 betrachtet, wobei der Nachweis in zwei unabhängigen Versuchen erfolgte. Zusätzlich wurden zwei unterschiedliche primäre Antikörper verwendet, einmal gegen die p50 Untereinheit und einmal gegen die p65 Untereinheit, des klassischen NF κ B Heterodimers.

3.1. Western Blot

3.1.1. Isolierung der Proteine aus den Melanomzellen

Für die Isolierung der zytoplasmatischen und nukleären Proteine aus den MV3 Zellen wurde ein modifiziertes Extraktionsprotokoll verwendet, welches ursprünglich von

Dignam et al. (1989) beschrieben wurde. Zunächst wurde für die Zelllinie MV3 Zellkulturflaschen (Nunclon[®], Nunc, Roskilde, Denmark) angelegt und diese so lange inkubiert bis ungefähr 90% des Flaschenbodens mit Zellen bedeckt waren. Danach wurde das alte Kulturmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit 15 ml PBS gespült und frisches Kulturmedium zugegeben, welches für die Kontrollzellen kein Bortezomib enthielt und für die behandelten Zellen eine Bortezomib Konzentration 1×10^{-3} mg/ml enthielt. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS 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 µl 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 µl 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.

3.1.2. Konzentrationsbestimmungen von Proteinen in Lösung

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% Phosphorsäure 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 dest., 15 ml 95% Ethanol, 30 ml 88% Phosphorsäure 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 µg/ml bis 180 µg/ml hergestellt. Für die Verdünnung diente Aqua dest.. 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 Leerwert diente Aqua dest.. Die zu messenden Proteinlösungen wurden in einem Volumen von 100 µl 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.

3.1.3. SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteinlösungen erfolgte durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1979; Ornstein-Davis, 1964) mit Hilfe der 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 dest.

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 dest.

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 40 µg aufgetragen. Dazu wurden die Proteinlösungen mit reduzierendem Probenpuffer (3,55 ml Aqua dest., 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 µl 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 µl des Full Range Rainbow[®] Molecular Weight Marker, (Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) verwendet. Für die Elektrophorese diente ein Tris/Glycine/SDS Puffer (pH 8,3) als Laufpuffer (Bio-Rad, München, Deutschland).

3.1.4. Elektrophoretischer Transfer von Proteinen

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 (48 mM 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.

3.1.5. Immunologischer 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 den in Blocking Buffer 1:200 verdünnten primären Antikörpern NF κ B p50 und NF κ B p65 (beide: monoklonal-Maus 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 (polyklonal Schwein anti-Maus Immunglobulin/Meerrettichperoxidase, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) geschüttelt (90 min, RT). Nach erneutem fünfmaligem Waschen mit Puffer (TBS/0,05 % Tween) erfolgte der Nachweis der Enzymreaktion.

3.1.6. Antikörpernachweis durch Chemilumineszens

Der Ort der Bindung der gekoppelten Meerrettichperoxidase 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.

3.1.7. Quantifizierung der Proteine

Um Unterschiede zwischen den unbehandelten und den mit Bortezomib behandelten Zellen aufzuzeigen wurde die Quantifizierungssoftware Quantity One[®] (Bio-Rad, Hercules, USA) eingesetzt. Dabei wurde sowohl für p50 als auch für p65 jeweils die zytoplasmatischen und die nukleären Proteine separat betrachtet. Dazu wurde zunächst der entwickelte Röntgenfilm eingescannt und anschließend die Begrenzung der einzelnen Banden umfahren. Das von der Software berechnete Volumen ergibt

sich aus dem Produkt der Summe der Intensitäten der Pixel innerhalb der Begrenzung einer Bande und der Fläche einer Bande. Aus den errechneten Zahlenwerten lies sich sowohl für p50 als auch für p65 errechnen um wie viel Prozent der NFκB Proteingehalt sowohl im Zytoplasma als auch im Kern durch eine Behandlung mit Bortezomib verringert wurde.

3.2. Immunzytochemie

Für den immunzytochemischen Nachweis der verminderten Aktivierung und Translokation von NFκB in den Kern durch eine Behandlung mit Bortezomib wurde exemplarisch die Zelllinie MV3 betrachtet. Wie sich anhand der Ergebnisse der Western Blots zeigte, wies der primäre Antikörper gegen die p65 Untereinheit von NFκB eine höhere Spezifität auf, so dass nur er für die Immunzytochemischen Färbungen verwendet wurde. Zunächst wurden MV3 Zellen, auf 2-Kammer-Objektträger, Falcon® Culture Slide (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA) in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml ausgesät. Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden (37°C und 5% CO₂) wurde das alte Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und frisches Kulturmedium dazu gegeben, welches für die Kontrollzellen kein Bortezomib enthielt und für die behandelten Zellen eine Bortezomib Konzentration 1×10^{-3} mg/ml enthielt. Nach einer inkubationzeit von 4 h wurden die Zellen mit PBS gespült und mit 4% Paraformaldehyd für 30 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Zellen drei mal 5 Minuten mit 0,1% Triton X-100 in TBS-Puffer (Trizma Base, NaCl, HCl, pH 7,6) gespült, um eine Permeabilität der Zellkernmembran zu erreichen. Nachdem die unspezifischen Bindungen mit normalem Kaninchen-Serum (Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:10 für 30 Minuten bei Raumtemperatur blockiert wurden, wurden die Zellen mit dem primären Antikörper NFκB p65 (monoklonal-Maus 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 (Kaninchen anti-Maus, Dako, Glostrup, Dänemark) in einer Verdünnung von 1:200. Für die Verdünnung des Kaninchen-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 µl Neufuchsin-Stammlösung (5 g 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 (Biomedex Corporation, Foster City, USA) beschichtet und danach mit Permanent Mounting Media (Biomedex, Foster City, USA) mit einem Deckglas versehen. Um die Spezifität des immunzytochemischen Nachweises zu gewährleisten wurden Negativkontrollen angefertigt, bei denen 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.

V. Ergebnisse

1. Ergebnisse der Zellproliferationsassays

1.1. Einzelsubstanzen

1.1.1. Balkendiagramme

Um die unterschiedliche Wirkung der Einzelsubstanzen im Vergleich untereinander auf das Wachstum der drei Melanomzelllinien anschaulich darzustellen, wurde für jede Zelllinie ein Balkendiagramm erstellt. In den Balkendiagrammen wurde graphisch angezeigt, ab wann eine statistisch signifikante Hemmung auftrat (vergleiche Abbildung 5.1.)

Bortezomib hemmte das Zellwachstum aller drei Melanomzelllinien signifikant bereits ab einer Konzentration von 1×10^{-4} mg/ml, MV3 auf 13%, FemX-1 auf 1% und G361 auf 7% der Kontrolle. ML-I hemmte ebenfalls das Zellwachstum aller Zelllinien signifikant bereits ab einer Konzentration von 1×10^{-4} mg/ml, MV3 auf 28%, FemX-1 auf 14% und G361 auf 16% der Kontrolle. Bei Rosiglitazone zeigte sich eine weniger einheitliche Hemmung des Zellwachstums. Bei der Zelllinie MV3 hemmte Rosiglitazone bereits bei Konzentrationen von 1×10^{-7} bis 1×10^{-3} mg/ml signifikant das Zellwachstum auf 53-68% der Kontrolle, in höheren Konzentrationen aber nicht mehr in signifikanter Weise. Bei FemX-1 hemmte Rosiglitazone das Zellwachstum ebenfalls bereits ab Konzentrationen von 1×10^{-7} bis 1×10^{-3} mg/ml signifikant auf 46-55% der Kontrolle, in höheren Konzentrationen jedoch nicht mehr in signifikanter Weise. Bei G361 hemmte Rosiglitazone das Zellwachstum in Konzentrationen von 1×10^{-7} bis 1×10^{-5} mg/ml signifikant auf 36-55% der Kontrolle, jedoch in höheren Konzentrationen nicht mehr in signifikanter Weise.

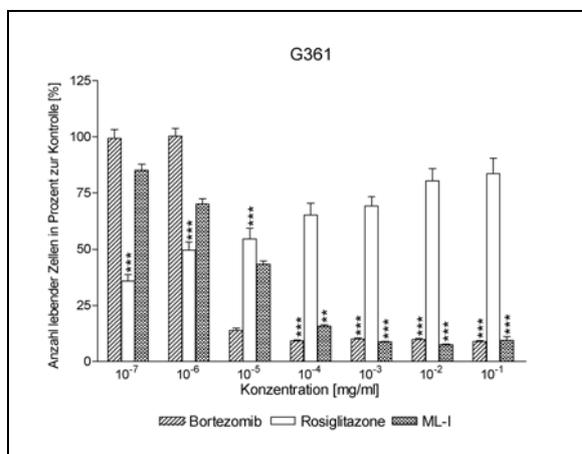
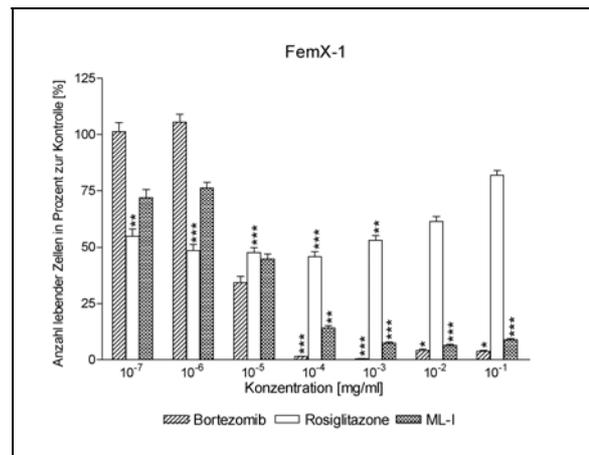
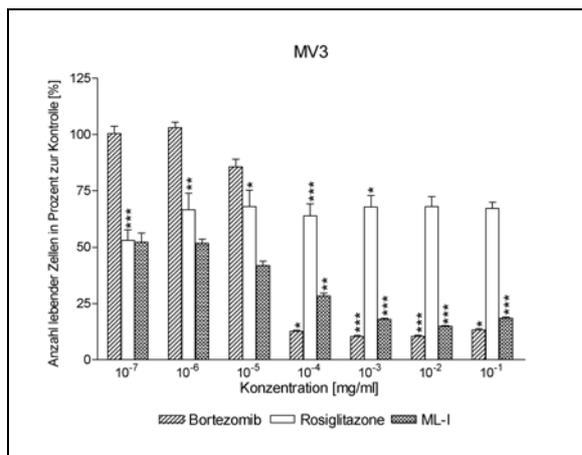


Abbildung 5.1.: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen wachstumshemmenden Wirkung von Bortezomib, Rosiglitazone und ML-I in ansteigender Konzentration auf die drei Melanomzelllinien MV3, FemX-1 und G361. Dargestellt ist das Zellwachstum in Prozent zur unbehandelten Kontrolle. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001)

1.1.2. Dosis-Wirkungs-Kurven und EC₅₀ Werte

Für jede Zelllinie wurden die Dosis-Wirkungs-Kurven der Einzelsubstanzen erstellt, indem die maximale Hemmung gleich 100% und die Kontrolle gleich 0% gesetzt wurde und die übrigen Werte entsprechend dazu berechnet wurden (Vergleiche Abbildung 5.2.-5.4.)

Für die Zelllinie MV3 zeigt Abbildung 5.2., dass sowohl für Bortezomib als auch für ML-I die Dosis-Wirkungs-Kurve den typisch sigmoidalen Verlauf aufwies, so dass sich daraus jeweils die EC₅₀-Werte berechnen ließen, d. h. diejenigen Konzentrationen bei der die Hälfte der maximalen Hemmung erreicht wurde. Die EC₅₀-Werte mit der dazugehörigen maximalen Hemmung sind in Tabelle 5.1. wiedergegeben. Für Rosiglitazone lies sich, aufgrund des atypischen Hemmungsverhalten, mit anfänglich starker und mit steigender Konzentration abnehmender Hemmung des Zellwachstums, keine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellen

und somit auch kein EC_{50} -Wert berechnen. Wie aus Tabelle 5.1. ersichtlich, ist für Bortezomib und ML-I die maximale Hemmung mit einer Hemmung des Zellwachstums auf 10% bzw. 15% der Kontrolle annähernd gleich, wobei aber für ML-I der EC_{50} -Wert ungefähr 100 mal niedriger ist, was für ein deutlich früheres Ansprechen der Zelllinie MV3 auf eine ML-I Therapie spricht.

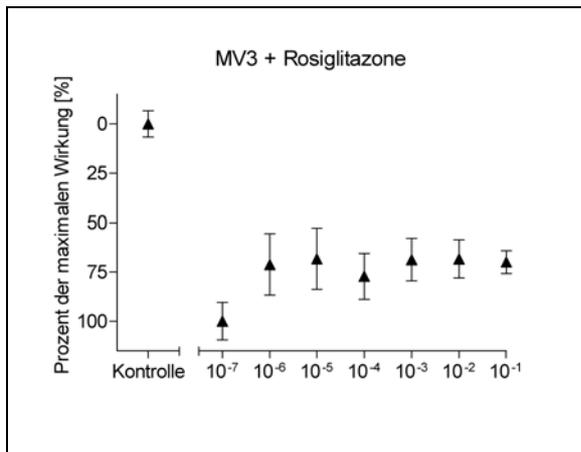
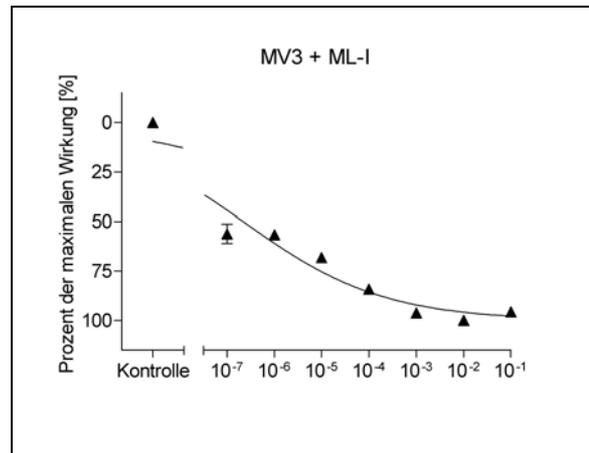
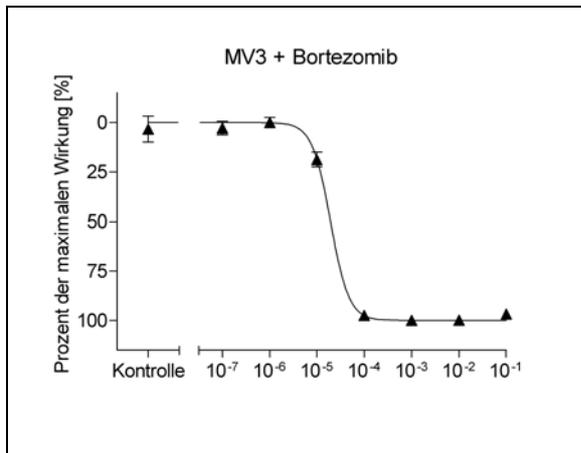
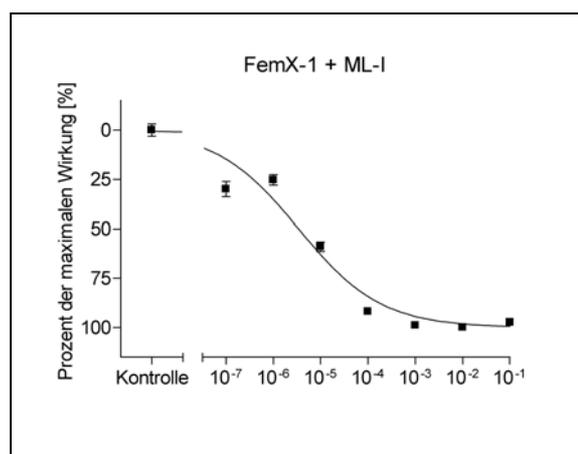
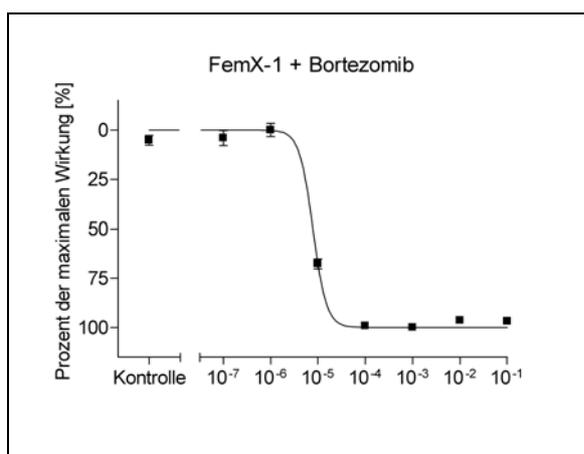


Abbildung 5.2.: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen Dosis-Wirkungs-Kurven von Bortezomib, Rosiglitazone und ML-I auf die Zelllinie MV3. Dargestellt ist in ansteigender Konzentration die jeweilige Wirkung auf das Zellwachstum in Prozent zur maximalen Wirkung.

	EC ₅₀ -Wert [mg/ml]	Maximale Hemmung
MV3 + Bortezomib	1,93 x 10 ⁻⁵	10% bei 1 x 10 ⁻³ mg/ml
MV3 + ML-I	2,19 x 10 ⁻⁷	15% bei 1 x 10 ⁻² mg/ml
MV3 + Rosiglitazone	∅	53% bei 1 x 10 ⁻⁷ mg/ml

Tabelle 5.1.: Zusammenfassende Darstellung der EC₅₀-Werte der Einzelsubstanzen auf die Zelllinie MV3. Zusätzlich ist die maximale Hemmung angegeben und bei welcher Konzentration sie erreicht wird.

Für die Zelllinie FemX-1 zeigten die Dosis-Wirkungs-Kurven von Bortezomib und ML-I wieder den typisch sigmoidalen Verlauf (Vergleiche Abbildung 5.3.). Die errechneten EC₅₀-Werte sind in Tabelle 5.2. wiedergegeben. Für Rosiglitazone lies sich erneut aufgrund des atypischen Hemmungsverhalten mit anfänglicher zunehmender und mit ansteigender Konzentration abnehmender Hemmung des Zellwachstums keine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellen und auch kein EC₅₀-Wert berechnen. Wie aus Tabelle 5.2. ersichtlich, ist für Bortezomib und ML-I die maximale Hemmung mit einer Hemmung des Zellwachstums auf 0,4% bzw. 6% der Kontrolle, sowie die EC₅₀ Werte annähernd gleich, was für eine fast gleiche Wirkung auf die Zelllinie FemX-1 spricht.



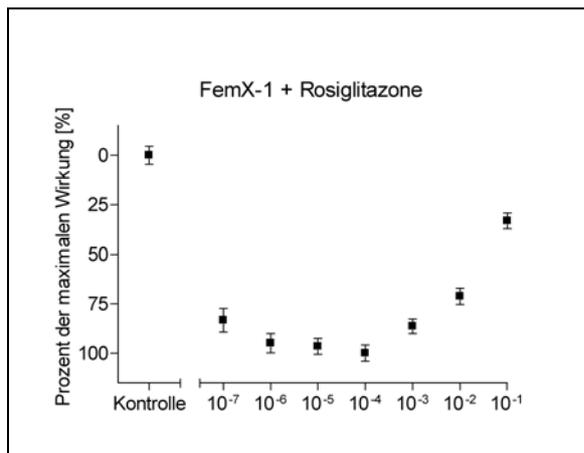


Abbildung 5.3.: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen Dosis-Wirkungs-Kurven von Bortezomib, Rosiglitazone und ML-I auf die Zelllinie FemX-1. Dargestellt ist in ansteigender Konzentration die jeweilige Wirkung auf das Zellwachstum in Prozent zur maximalen Wirkung.

	EC ₅₀ -Wert [mg/ml]	Maximale Hemmung
FemX-1 + Bortezomib	7,81 x 10 ⁻⁶	0,4% bei 1 x 10 ⁻³ mg/ml
FemX-1 + ML-I	3,41 x 10 ⁻⁶	6% bei 1 x 10 ⁻² mg/ml
FemX-1 + Rosiglitazone	∅	46% bei 1 x 10 ⁻⁴ mg/ml

Tabelle 5.2.: Zusammenfassende Darstellung der EC₅₀-Werte der Einzelsubstanzen auf die Zelllinie FemX-1. Zusätzlich ist die maximale Hemmung angegeben und bei welcher Konzentration sie erreicht wird.

Für die Zelllinie G361 zeigten die Dosis-Wirkungs-Kurven von Bortezomib und ML-I erneut den typisch sigmoidalen Verlauf (Vergleiche Abbildung 5.4.) Die errechneten EC₅₀-Werte sind in Tabelle 5.3. wiedergegeben. Für Rosiglitazone lies sich erneut aufgrund des atypischen Hemmungsverhalten mit anfänglicher zunehmender und mit ansteigender Konzentration abnehmender Hemmung des Zellwachstums keine Dosis-Wirkungs-Kurve erstellen und auch kein EC₅₀-Wert berechnen. Wie aus Tabelle 5.3. ersichtlich, ist für Bortezomib und ML-I die maximale Hemmung mit einer Hemmung des Zellwachstums auf 9% bzw. 8% der Kontrolle, sowie die EC₅₀ Werte annähernd gleich, was für eine fast gleiche Wirkung auf die Zelllinie G361 spricht.

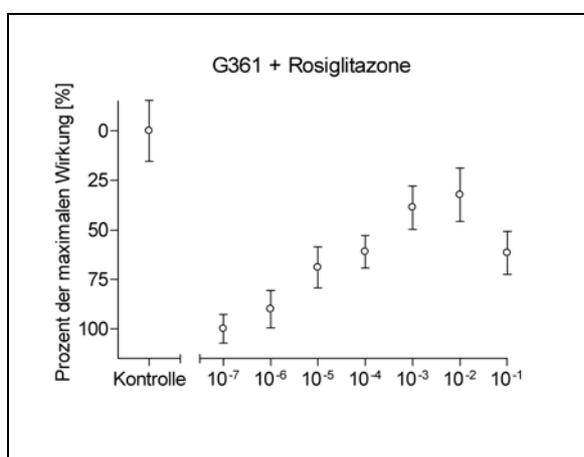
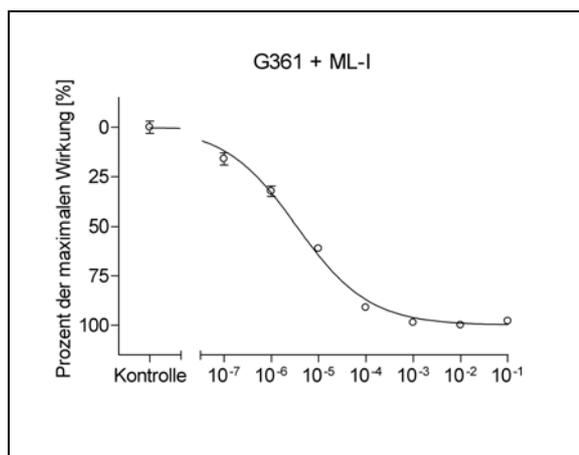
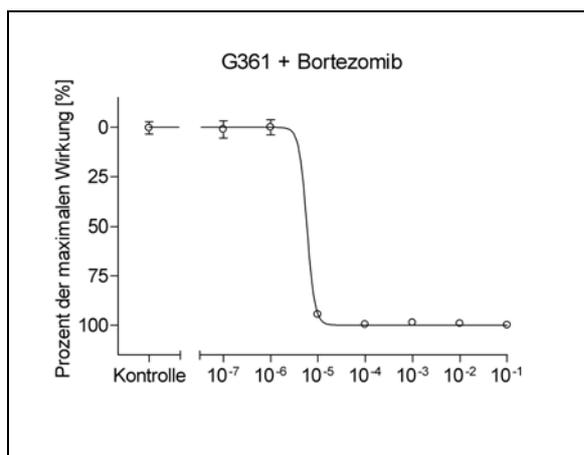


Abbildung 5.4.: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen Dosis-Wirkungs-Kurven von Bortezomib, Rosiglitazone und ML-I auf die Zelllinie G361. Dargestellt ist in ansteigender Konzentration die jeweilige Wirkung auf das Zellwachstum in Prozent zur maximalen Wirkung.

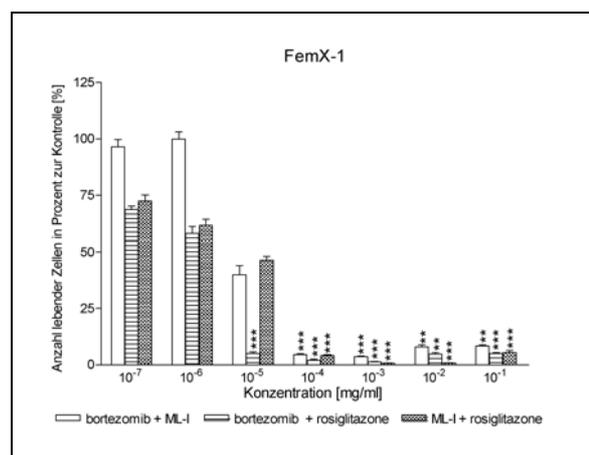
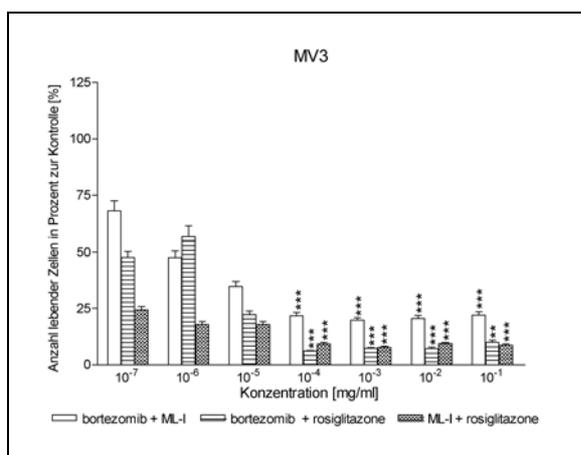
	EC ₅₀ -Wert [mg/ml]	Maximale Hemmung
G361 + Bortezomib	5,83 x 10 ⁻⁶	9% bei 1 x 10 ⁻⁴ mg/ml
G361 + ML-I	3,42 x 10 ⁻⁶	8% bei 1 x 10 ⁻² mg/ml
G361 + Rosiglitazone	∅	36% bei 1 x 10 ⁻⁷ mg/ml

Tabelle 5.3.: Zusammenfassende Darstellung der EC₅₀-Werte der Einzelsubstanzen auf die Zelllinie G361. Zusätzlich ist die maximale Hemmung angegeben und bei welcher Konzentration sie erreicht wird.

1.2. Zweifachkombinationen

1.2.1. Balkendiagramme

Um die unterschiedliche Wirkung der Zweifachkombinationen auf das Wachstum der drei Melanomzelllinien anschaulich darzustellen, wurde für jede Melanomzelllinie ein Balkendiagramm erstellt. In den Balkendiagrammen wurde graphisch angezeigt, ab wann eine statistisch signifikante Hemmung auftrat (vergleiche Abbildung 5.5.). Die Kombination von Bortezomib und ML-I hemmte bereits ab einer Konzentration von 1×10^{-5} mg/ml das Zellwachstum der Zelllinie G361 signifikant auf 7% der Kontrolle, ab 1×10^{-4} mg/ml signifikant das Wachstum von MV3 auf 22% und von FemX-1 auf 5% der Kontrolle. Die Kombination von Bortezomib und Rosiglitazone hemmte bereits ab einer Konzentration von 1×10^{-5} mg/ml signifikant das Zellwachstum von FemX-1 auf 5% der Kontrolle, ab einer Konzentration von 1×10^{-4} mg/ml signifikant das Zellwachstum von MV3 auf 6% und von G361 auf 12% der Kontrolle. Die Kombination von ML-I und Rosiglitazone hemmte das Zellwachstum aller drei Zelllinien signifikant ab einer Konzentration von 1×10^{-4} mg/ml, MV3 auf 9%, FemX-1 auf 4% und G361 auf 2% der Kontrolle.



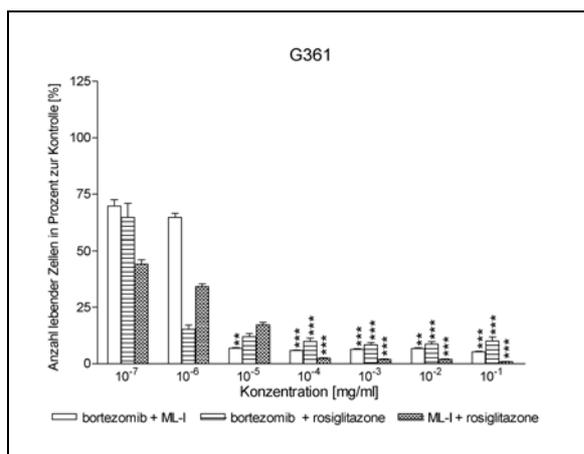


Abbildung 5.5.: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen wachstumshemmenden Wirkung der Zweifachkombinationen von Bortezomib, Rosiglitazone und ML-I in ansteigender Konzentration auf die drei Melanomzelllinien MV3, FemX-1 und G361. Dargestellt ist das Zellwachstum in Prozent zur unbehandelten Kontrolle. (* p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001)

1.2.2. Dosis-Wirkungs-Kurven und EC₅₀-Werte

Für jede Zelllinie wurden für jede der drei Zweifachkombinationen analog zu den Einzelsubstanzen Dosis-Wirkungs-Kurven erstellt. Für die Zelllinie MV3 zeigt Abbildung 5.6., dass für jede der drei Zweifachkombinationen die Dosis-Wirkungs-Kurve den typisch sigmoidalen Verlauf aufwies, so dass sich daraus die EC₅₀-Werte berechnen ließen. Die EC₅₀-Werte mit der dazugehörigen maximalen Hemmung sind in Tabelle 5.4. wiedergegeben. Wie aus Tabelle 5.4. ersichtlich, ist der EC₅₀-Wert für die Kombination von Bortezomib mit entweder ML-I oder Rosiglitazone mit $2,6 \times 10^{-7}$ bzw. $2,2 \times 10^{-7}$ mg/ml annähernd gleich, wobei jedoch die maximale Hemmung bei der Kombination mit Rosiglitazone bereits bei einer Konzentration von 1×10^{-4} mg/ml mit einer Hemmung des Zellwachstums auf 6% der Kontrolle erreicht wird. Bei der Kombination von Bortezomib mit ML-I wird die maximale Hemmung erst bei einer Konzentration von 1×10^{-3} mg/ml erreicht, mit einer Hemmung des Zellwachstums auf 20% der Kontrolle. Der EC₅₀-Wert für die Kombination von ML-I mit Rosiglitazone ist mit $1,3 \times 10^{-8}$ mg/ml im Vergleich zu den beiden anderen Kombinationen ungefähr 10 fach niedriger, wobei auch hier die maximale Hemmung erst bei einer Konzentration von 1×10^{-3} mg/ml erreicht wird, mit einer Hemmung des Zellwachstums auf 8% der Kontrolle.

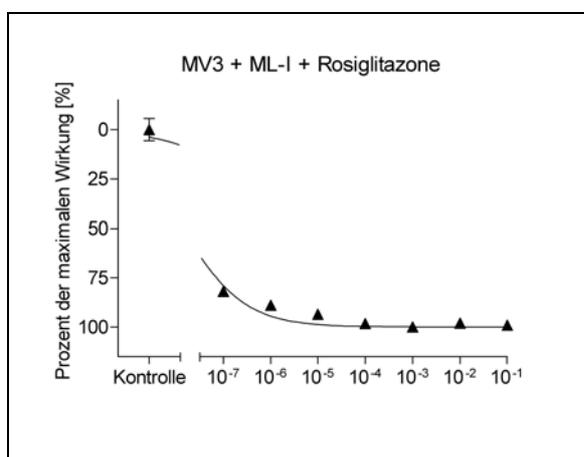
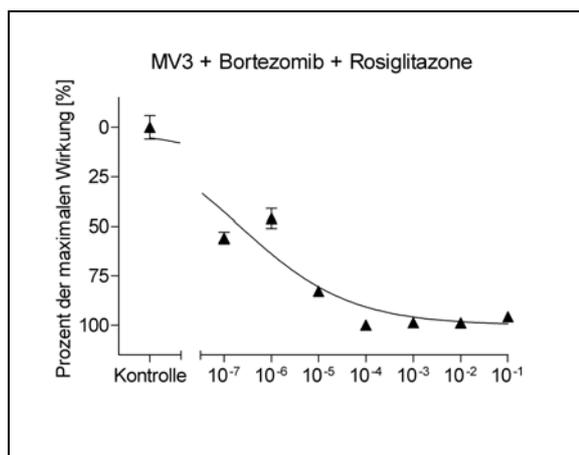
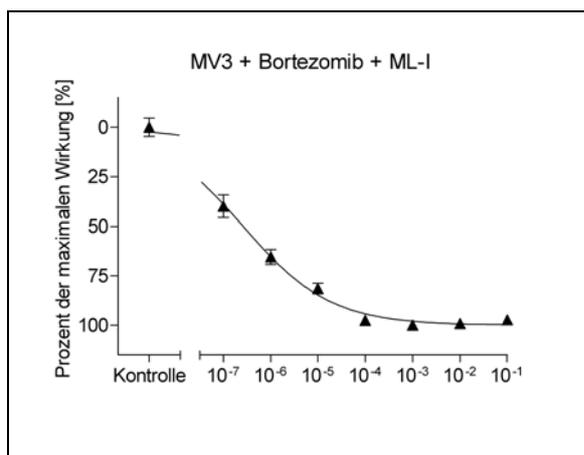


Abbildung 5.6.: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen Dosis-Wirkungs-Kurven der Zweifachkombinationen von Bortezomib, Rosiglitazone und ML-I auf die Zelllinie MV3. Dargestellt ist in ansteigender Konzentration die jeweilige Wirkung auf das Zellwachstum in Prozent zur maximalen Wirkung.

	EC ₅₀ -Wert [mg/ml]	Maximale Hemmung
MV3 + Bortezomib + ML-I	2,6 x 10 ⁻⁷	20% bei 1 x 10 ⁻³ mg/ml
MV3 + Bortezomib + Rosiglitazone	2,2 x 10 ⁻⁷	6% bei 1 x 10 ⁻⁴ mg/ml
MV3 + ML-I + Rosiglitazone	1,3 x 10 ⁻⁸	8% bei 1 x 10 ⁻³ mg/ml

Tabelle 5.4.: Zusammenfassende Darstellung der EC₅₀-Werte der Zweifachkombinationen auf die Zelllinie MV3. Zusätzlich ist die maximale Hemmung angegeben und bei welcher Konzentration sie erreicht wird.

Die Dosis-Wirkungskurven der Zweifachkombinationen für die Zelllinie FemX-1 sind in Abbildung 5.7. wiedergeben. Sie wiesen alle den typisch sigmoidalen Verlauf auf, so dass sich daraus die EC₅₀-Werte berechnen ließen, die zusammen mit der dazu

gehörigen Werten der maximalen Hemmung in Tabelle 5.5. wiedergegeben sind. Wie aus Tabelle 5.5. ersichtlich, ist die maximale Hemmung für alle drei Zweifachkombinationen mit 1-4% der Kontrolle bei einer Konzentration von 1×10^{-3} mg/ml annähernd gleich. Der EC_{50} -Wert jedoch ist für die Kombination von Bortezomib und Rosiglitazone mit $7,1 \times 10^{-7}$ mg/ml am niedrigsten, gefolgt von der Kombination von Bortezomib und ML-I mit $8,2 \times 10^{-6}$ mg/ml und der Kombination von ML-I und Rosiglitazone mit $2,1 \times 10^{-5}$ mg/ml.

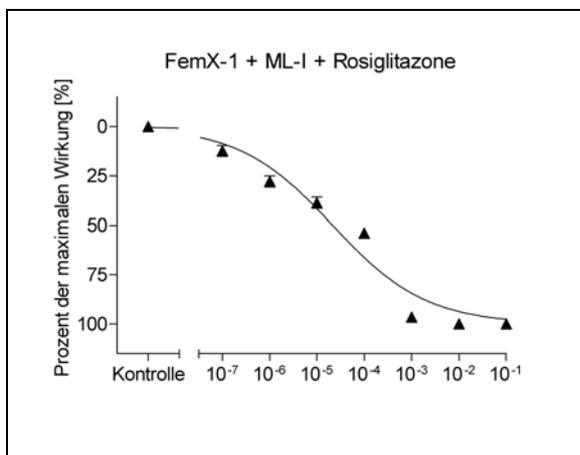
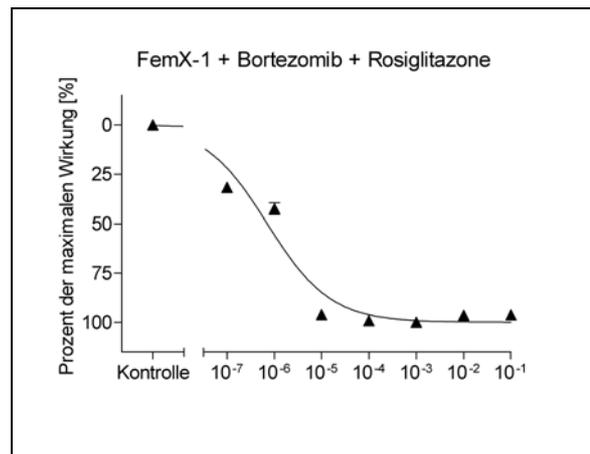
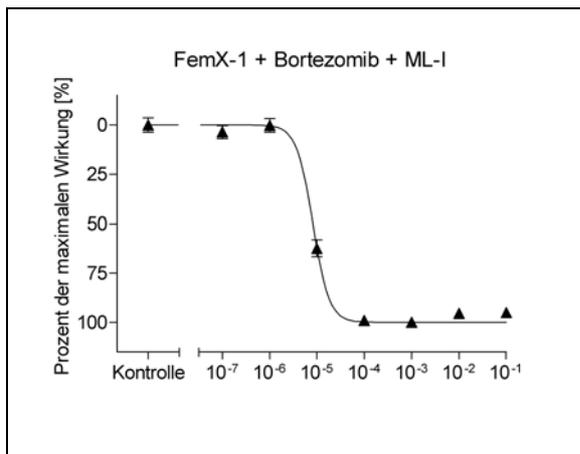
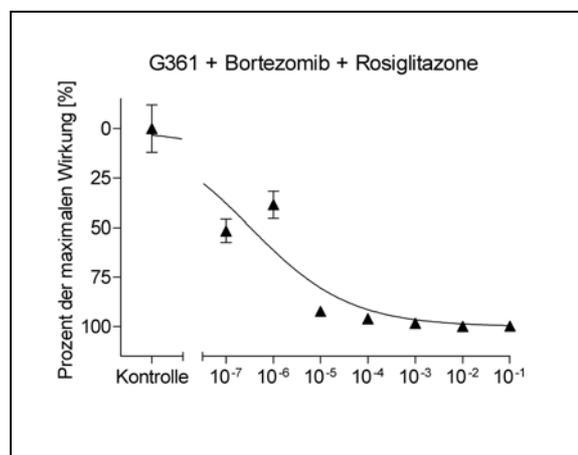
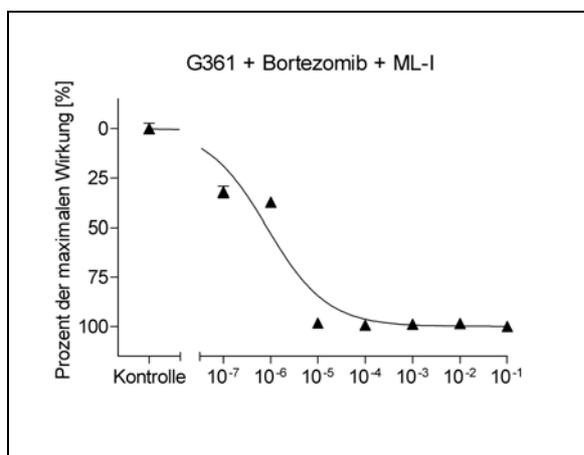


Abbildung 5.7.: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen Dosis-Wirkungs-Kurven der Zweifachkombinationen von Bortezomib, Rosiglitazone und ML-I auf die Zelllinie FemX-1. Dargestellt ist in ansteigender Konzentration die jeweilige Wirkung auf das Zellwachstum in Prozent zur maximalen Wirkung.

	EC ₅₀ -Wert [mg/ml]	Maximale Hemmung
FemX-1 + Bortezomib + ML-I	8,2 x 10 ⁻⁶	4% bei 1 x 10 ⁻³ mg/ml
FemX-1 + Bortezomib + Rosiglitazone	7,1 x 10 ⁻⁷	1% bei 1 x 10 ⁻³ mg/ml
FemX-1 + ML-I + Rosiglitazone	2,1 x 10 ⁻⁵	1% bei 1 x 10 ⁻³ mg/ml

Tabelle 5.5.: Zusammenfassende Darstellung der EC₅₀-Werte der Zweifachkombinationen auf die Zelllinie FemX-1. Zusätzlich ist die maximale Hemmung angegeben und bei welcher Konzentration sie erreicht wird.

Für die Zelllinie G361 sind die Dosis-Wirkungskurven der Zweifachkombinationen in Abbildung 5.8. wiedergeben. Sie wiesen alle den typisch sigmoidalen Verlauf auf, so dass sich daraus die EC₅₀-Werte berechnen ließen, die zusammen mit der dazugehörigen maximalen Hemmung in Tabelle 5.6. wiedergegeben sind. Wie aus Tabelle 5.6. ersichtlich, ist der EC₅₀-Wert für die Kombination von Bortezomib mit entweder ML-I oder Rosiglitazone mit 8,4 x 10⁻⁷ bzw. 3,3 x 10⁻⁷ mg/ml annähernd gleich, wobei jedoch die maximale Hemmung bei der Kombination mit Rosiglitazone bereits bei einer Konzentration von 1 x 10⁻² mg/ml mit einer Hemmung des Zellwachstums auf 8% der Kontrolle erreicht wird. Bei der Kombination von Bortezomib mit ML-I wird die maximale Hemmung erst bei einer Konzentration von 1 x 10⁻¹ mg/ml erreicht, mit einer Hemmung des Zellwachstums auf 5% der Kontrolle. Der EC₅₀-Wert für die Kombination von ML-I und Rosiglitazone ist mit 9,7 x 10⁻⁸ mg/ml im Vergleich zu den beiden anderen Kombinationen ungefähr 10 fach niedriger, wobei auch hier die maximale Hemmung erst bei einer Konzentration von 1 x 10⁻¹ mg/ml erreicht wird, mit einer Hemmung des Zellwachstums auf 1% der Kontrolle.



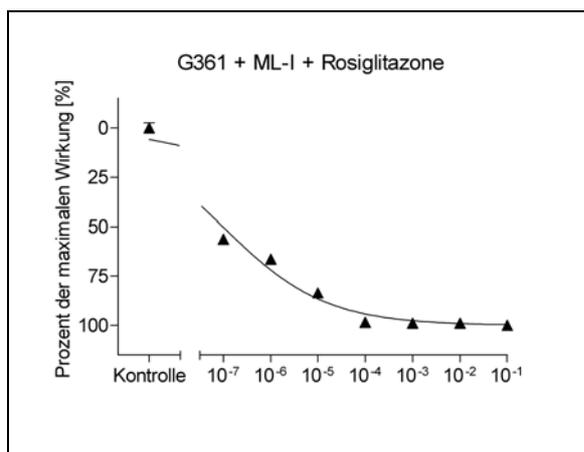


Abbildung 5.8.: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen Dosis-Wirkungs-Kurven der Zweifachkombinationen von Bortezomib, Rosiglitazone und ML-I auf die Zelllinie G361. Dargestellt ist in ansteigender Konzentration die jeweilige Wirkung auf das Zellwachstum in Prozent zur maximalen Wirkung.

	EC ₅₀ -Wert [mg/ml]	Maximale Hemmung
G361 + Bortezomib + ML-I	$8,4 \times 10^{-7}$	5% bei 1×10^{-1} mg/ml
G361 + Bortezomib + Rosiglitazone	$3,3 \times 10^{-7}$	8% bei 1×10^{-2} mg/ml
G361 + ML-I + Rosiglitazone	$9,7 \times 10^{-8}$	1% bei 1×10^{-1} mg/ml

Tabelle 5.6.: Zusammenfassende Darstellung der EC₅₀-Werte der Zweifachkombinationen auf die Zelllinie G361. Zusätzlich ist die maximale Hemmung angegeben und bei welcher Konzentration sie erreicht wird.

1.3. Dreifachkombination

1.3.1. Balkendiagramme

Die Wirkung der Dreifachkombination aus Bortezomib, Rosiglitazone und ML-I auf die drei Zelllinien ist in Abbildung 5.9. in Form eines Balkendiagramms wiedergegeben. Eine signifikante Hemmung des Zellwachstums trat bei der Zelllinie G361 bereits ab einer Konzentration von 1×10^{-5} mg/ml (Bortezomib, Rosiglitazone und ML-I) auf, mit einer Hemmung auf 14% der Kontrolle. Bei den Zelllinien MV3 und FemX-1 trat eine signifikante Hemmung ab einer Konzentration von 1×10^{-4} mg/ml (Bortezomib, Rosiglitazone und ML-I) auf, mit einer Hemmung des Zellwachstums

bei MV3 auf 21% und bei FemX-1 auf 5% der Kontrolle.

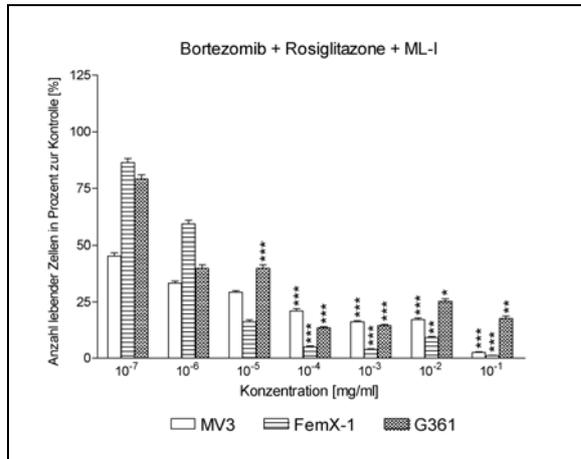


Abbildung 5.9.: Zusammenfassende Darstellung der wachstumshemmenden Wirkung der Dreifachkombination aus Bortezomib, Rosiglitazone und ML-I in ansteigender Konzentration auf die drei Melanomzelllinien MV3, FemX-1 und G361. Dargestellt ist das Zellwachstum in Prozent zur unbehandelten Kontrolle. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$)

1.3.2. Dosis-Wirkungskurven und EC_{50} -Werte

Für alle drei Zelllinien sind die Dosis-Wirkungs-Kurven der Dreifachkombination in Abbildung 5.10. wiedergegeben. Sie weisen alle den typisch sigmoidalen Verlauf auf, so dass sich daraus die EC_{50} -Werte berechnen ließen, die zusammen mit den dazugehörigen maximalen Hemmung in Tabelle 5.7. wiedergegeben sind. Wie aus Tabelle 5.7. ersichtlich, liegen die EC_{50} -Werte der Trippeltherapie auf die Zelllinien MV3 und G361 mit $1,3 \times 10^{-7}$ bzw. $3,7 \times 10^{-7}$ mg/ml (Bortezomib, Rosiglitazone und ML-I) annähernd im gleichen Bereich, wobei die maximale Hemmung bei der Zelllinie G361 bereits bei einer Konzentration von 1×10^{-4} mg/ml (Bortezomib, Rosiglitazone und ML-I) mit einer Hemmung des Zellwachstums auf 14% der Kontrolle erreicht wird. Bei der Zelllinie MV3 wird die maximale Hemmung erst bei einer Konzentration von 1×10^{-1} mg/ml (Bortezomib, Rosiglitazone und ML-I) erreicht, mit einer Hemmung auf 3% der Kontrolle. Bei der Zelllinie FemX-1 ist der EC_{50} -Wert mit $1,4 \times 10^{-6}$ mg/ml (Bortezomib, Rosiglitazone und ML-I) ungefähr 10 fach höher wie bei den anderen beiden Zelllinien und die maximale Hemmung mit einer Hemmung des Zellwachstums auf 1% der Kontrolle, wird erst bei einer Konzentration von 1×10^{-1} mg/ml (Bortezomib, Rosiglitazone und ML-I) erreicht.

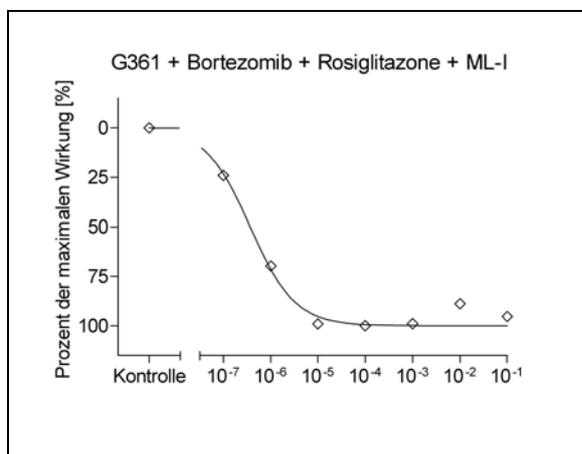
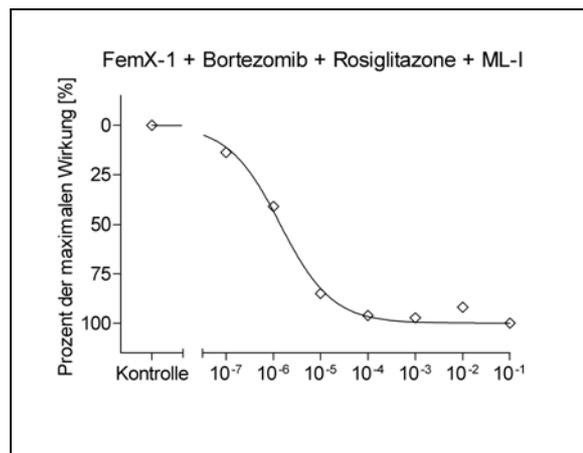
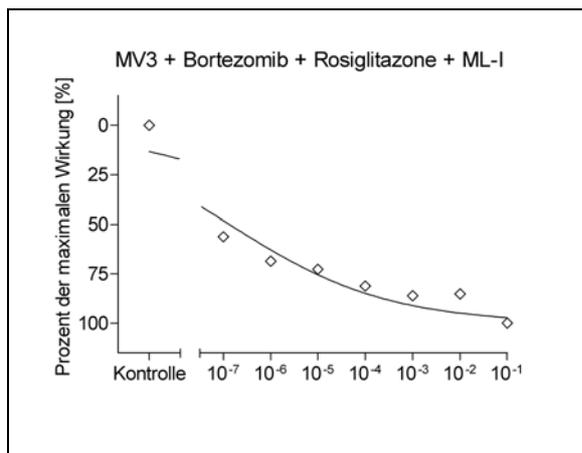


Abbildung 5.10.: Zusammenfassende Darstellung der unterschiedlichen Dosis-Wirkungs-Kurven der Dreifachkombinationsbehandlungen aus Bortezomib, Rosiglitazone und ML-I auf die Zelllinien MV3, FemX-1 und G361. Dargestellt ist in ansteigender Konzentration die jeweilige Wirkung auf das Zellwachstum in Prozent zur maximalen Wirkung.

	EC ₅₀ -Wert [mg/ml]	Maximale Hemmung
MV3 + Bortezomib + Rosiglitazone + ML-I	1,3 x 10 ⁻⁷	3% bei 1 x 10 ⁻¹ mg/ml
FemX-1 + Bortezomib + Rosiglitazone + ML-I	1,4 x 10 ⁻⁶	1% bei 1 x 10 ⁻¹ mg/ml
G361 + Bortezomib + Rosiglitazone + ML-I	3,7 x 10 ⁻⁷	14% bei 1 x 10 ⁻⁴ mg/ml

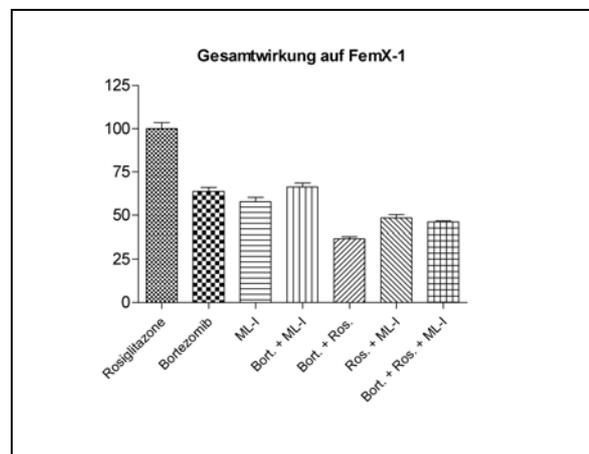
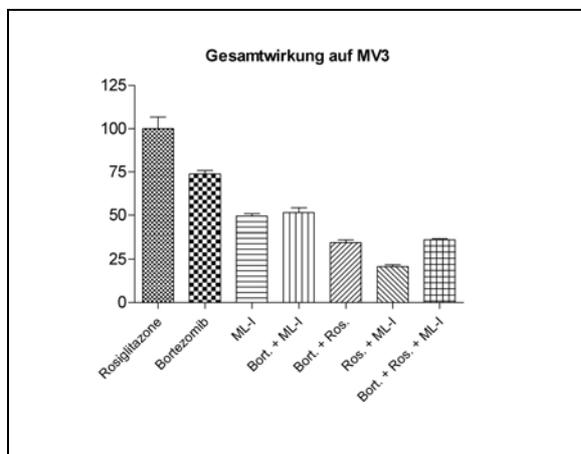
Tabelle 5.7.: Zusammenfassende Darstellung der EC₅₀-Werte der Dreifachkombination auf die Zelllinien MV3, FemX-1 und G361. Zusätzlich ist die maximale Hemmung angegeben und bei welcher Konzentration sie erreicht wird.

1.4. Vergleich der Gesamthemmung der verschiedenen Zusätze

Für jede Zelllinie wurde ein Balkendiagramm erstellt, in dem alle unterschiedlichen Zusätze verglichen wurden, wobei derjenige Zusatz mit der geringsten Hemmung des Zellwachstums gleich 100% und die übrigen Zusätze in Relation zu dem 100% Wert gesetzt wurden.

Beim Vergleich der Einzelsubstanzen ergab sich, dass Rosiglitazone das Zellwachstum aller drei Zelllinien signifikant am geringsten hemmte (alle $p < 0,001$). Bortezomib und ML-I unterschieden sich bei den Zelllinien FemX-1 und G361 nicht signifikant und hemmten das Zellwachstum bei FemX-1 um 36-42% und bei G361 um 43-45% stärker wie Rosiglitazone. Bei der Zelllinie MV3 hemmte von den Einzelsubstanzen ML-I das Zellwachstum signifikant am stärksten und zwar 50% stärker wie Rosiglitazone und 24% stärker wie Bortezomib ($p < 0,001$). Bei den Zweifachkombinationen ließ sich feststellen, dass die kombinierte Gabe von Rosiglitazone mit entweder Bortezomib oder mit ML-I das Zellwachstum aller drei Zelllinien am effektivsten hemmte: Die Kombination von Rosiglitazone und Bortezomib hemmte das Zellwachstum bei MV3 um 65%, bei FemX-1 um 63% und bei G361 um 71% signifikant stärker wie Rosiglitazone als Einzelsubstanz, bzw. bei MV3 um 39%, bei FemX-1 um 27% und bei G361 um 28% signifikant stärker wie Bortezomib als Einzelsubstanz (alle $p < 0,001$). Die Kombination von Rosiglitazone und ML-I hemmte das Zellwachstum bei MV3 um 79%, bei FemX-1 um 51% und bei G361 um 77% signifikant stärker wie Rosiglitazone als Einzelsubstanz (alle $p < 0,001$), bzw. bei MV3 um 29% ($p < 0,001$), bei FemX-1 um 9% ($p < 0,05$) und bei G361 um 32% ($p < 0,001$) signifikant stärker wie ML-I als Einzelsubstanz. Die Kombination von Bortezomib und ML-I zeigte keine durchgängige Wirkungssteigerung im Vergleich zu den Einzelsubstanzen. Bei der Zelllinie MV3 zeigte sich zwar eine um 22% signifikant stärkere Hemmung im Vergleich zu Bortezomib als Einzelsubstanz ($p < 0,001$), aber keine signifikant stärkere Hemmung im Vergleich zu ML-I als Einzelsubstanz ($p > 0,05$). Bei der Zelllinie FemX-1 zeigte die Zweifachkombination im Vergleich zu den Einzelsubstanzen keine signifikante Wirkungssteigerung ($p > 0,05$). Bei der Zelllinie G361 zeigte sich wiederum eine um 19% signifikant stärkere Hemmung im Vergleich zu Bortezomib als Einzelsubstanz und eine um 17% signifikant stärkere Hemmung im Vergleich zu ML-I als Einzelsubstanz (beide $p < 0,001$). Beim Vergleich der Zweifachkombinationen

untereinander zeigte sich, dass bei den Zelllinien MV3 und G361 die Kombination von Rosiglitazone und ML-I das Zellwachstum am stärksten hemmte, bei MV3 um 31% ($p < 0,001$) und bei G361 um 15% ($p < 0,01$) signifikant stärker wie die Zweifachkombination von Bortezomib und ML-I, bzw. bei MV3 um 14% und bei G361 um 6% stärker wie die Zweifachkombination von Rosiglitazone und Bortezomib (beide $p < 0,05$). Bei der Zelllinie FemX-1 stellte sich die Kombination von Rosiglitazone und Bortezomib als am wirkungsvollsten heraus. Das Zellwachstum wurde dabei um 29% stärker wie durch die Zweifachkombination von Bortezomib und ML-I ($p < 0,001$), bzw. um 12% signifikant stärker wie durch die Zweifachkombination Rosiglitazone und ML-I gehemmt ($p < 0,01$). Die Dreifachkombination aus Rosiglitazone, Bortezomib und ML-I zeigte sich bei keiner der Zelllinien wirkungsvoller wie die jeweils beste Zweifachkombination. Die Kombination von Rosiglitazone und ML-I hemmt jeweils das Zellwachstum bei MV3 um 15% ($p < 0,01$) und bei G361 um 23% ($p < 0,001$) signifikant stärker wie die Dreifachkombination, bei der Zelllinie FemX-1 hemmte die Kombination von Bortezomib und Rosiglitazone das Zellwachstum um 9% signifikant stärker wie die Dreifachkombination ($p < 0,05$).



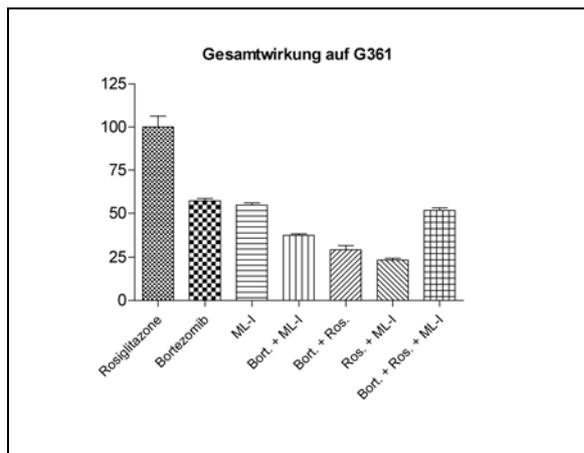


Abbildung 5.11.: Zusammenfassende Darstellung der Gesamtwirkung der einzelnen Zusätze auf die Zelllinien MV3, FemX-1 und G361. Der Zusatz mit der geringsten Gesamthemmung wurde gleich 100% und die übrigen Zusätze in Relation dazu gesetzt.

2. Ergebnisse des Nachweises der Apoptoseinduktion

Eine mögliche Induktion von Apoptose durch eine Behandlung mit Bortezomib wurde exemplarisch an der Zelllinie MV3 durchgeführt. Zum einen sollte eine Apoptoseinduktion anhand von morphologischen Kriterien nachgewiesen, zum anderen sollten auf molekularer Ebene DNS Fragmente nachgewiesen werden, die bei Apoptose entstehen.

2.1. Nachweis einer Apoptose Induktion anhand morphologischer Kriterien

Direkt nach der Zugabe von Bortezomib zu den MV3 Zellen konnte lichtmikroskopisch ein Abrunden der Zellen beobachtet werden, was auf das Beginnen einer Apoptose schließen ließ. Auf den Zytospins der behandelten Zellen, ließ sich nach der Feulgen Färbung, die für das Endstadium der Apoptose typischen Apoptose-Körperchen nachweisen. In Abbildung 5.12. sind Beispiele für Apoptose-Körperchen dargestellt. Bei den unbehandelten Kontrollzellen, lies sich keine anfängliche Schrumpfung der Zellen beobachten. Darüber hinaus waren auf den gefärbten Zytospins keine Apoptose-Körperchen zu finden (Abbildung 5.13.).

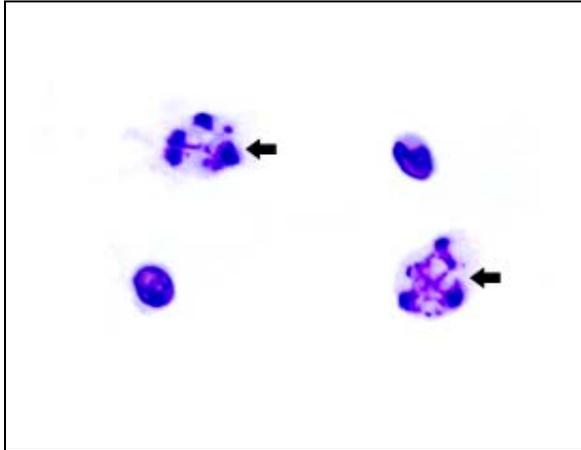


Abbildung 5.12.: Feulgen Färbung von MV3 Zellen, die mit 0,01 mg/m Bortezomib für 24 Stunden behandelt wurden. Die für das Endstadium der Apoptose typischen Apoptose-Körperchen sind deutlich erkennbar (schwarze Pfeile)

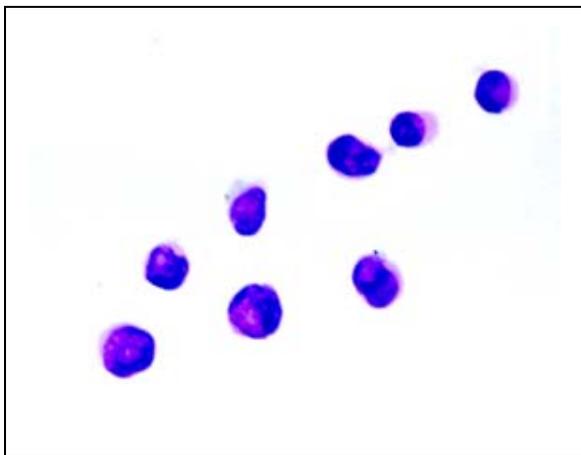


Abbildung 5.13.: Feulgen Färbung der unbehandelten Kontrollzellen. Keine Apoptose Körperchen waren zu finden.

2.2. Ergebnisse des molekularen Tests

Mit Hilfe des Cell Death Detection ELISA (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) sollten die zytoplasmatischen histone-assoziierten DNS Fragmente qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden, die typischerweise innerhalb des Prozesses der Apoptose durch aktivierte endogene Endonukleasen entstehen. Wie aus Abbildung 5.14. ersichtlich ist, induzierte Bortezomib dosisabhängig eine Apoptose in den MV3 Zellen.

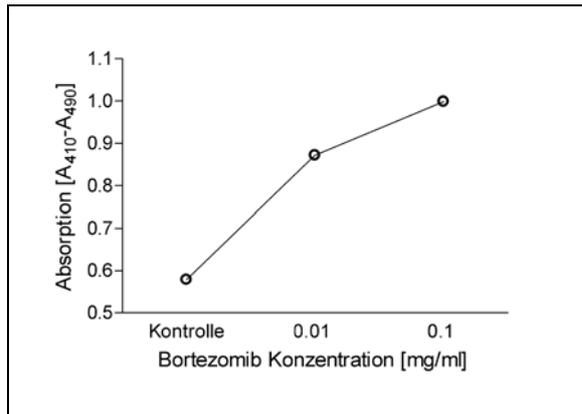


Abbildung 5.14.: Dosisabhängige Apoptose Induktion durch Bortezomib in MV3 Zellen. Eine Apoptose Induktion wurde anhand von zytoplasmatischen Histone-Assoziierten DNS Fragmenten mit Hilfe eines ELISA quantitativ gemessen.

3. Ergebnisse des NF κ B Nachweises

Um die Frage zu klären, auf welchem Weg Bortezomib in den MV3 Zellen eine Apoptose induzierte, wurde untersucht ob Bortezomib die Aktivierung und die Translokation in den Kern des nukleären Faktors (NF) κ B vermindert. Dies sollte mit Hilfe von quantitativen Western Blots und Immunzytochemischen Färbungen nachgewiesen werden.

3.1. NF κ B Nachweis durch Western Blot

Die Ergebnisse der Western Blots und der jeweiligen Quantifizierungen der zytoplasmatischen und nukleären Proteine für die beiden NF κ B Untereinheiten p50 und p65 sind in Abbildung 5.15. und 5.16. dargestellt. Wie aus den Abbildungen 5.15. und 5.16. ersichtlich ist, bestand ein statistischer Unterschied zwischen den unbehandelten und den mit 1×10^{-3} mg/ml Bortezomib für 24 Stunden behandelten MV3 Zellen sowohl für die zytoplasmatischen als auch für die nukleären Proteine. Für die p50 Untereinheit von NF κ B (Abbildung 5.15.) war der Gehalt sowohl an zytoplasmatischem als auch an nukleärem Protein für die behandelten Zellen um 48% geringer wie bei den unbehandelten Zellen. Für die p65 Untereinheit von NF κ B (Abbildung 5.16.) war für die behandelten Zellen der Gehalt an zytoplasmatischem um 33% und an nukleärem Protein um 35% geringer wie für die unbehandelten Zellen. Dies bestätigte, dass Bortezomib die Aktivierung und Translokation in den Kern von NF κ B deutlich vermindert und somit eine Induktion von Apoptose verstärkt.

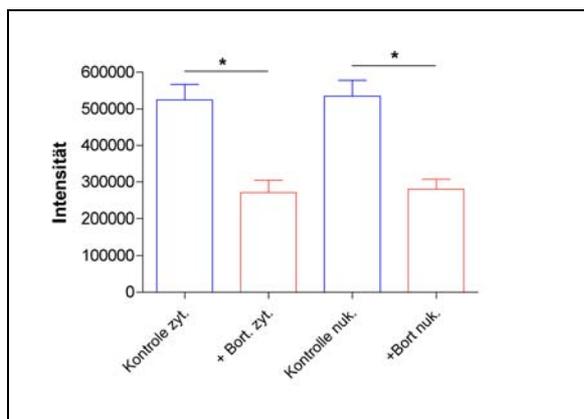
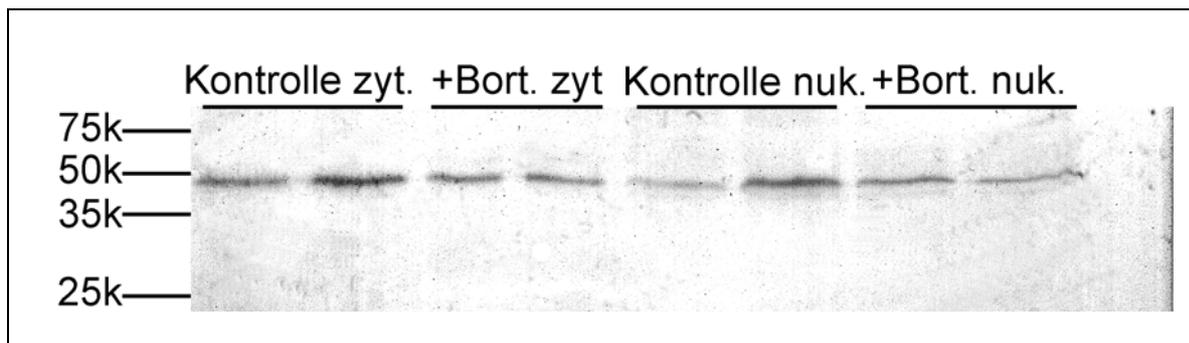


Abbildung 5.15.: Quantifizierung des zytoplasmatischen und nukleären Proteingehalt der NFκB Untereinheit p50 in unbehandelten und in mit 1×10^{-3} mg/ml Bortezomib für 24 Stunden behandelten MV3 Zellen. Die Quantifizierung zeigt statistische Unterschiede zwischen dem zytoplasmatischen und nukleärem Proteingehalt zwischen den unbehandelten und den behandelten MV3 Zellen. * $p < 0.05$.

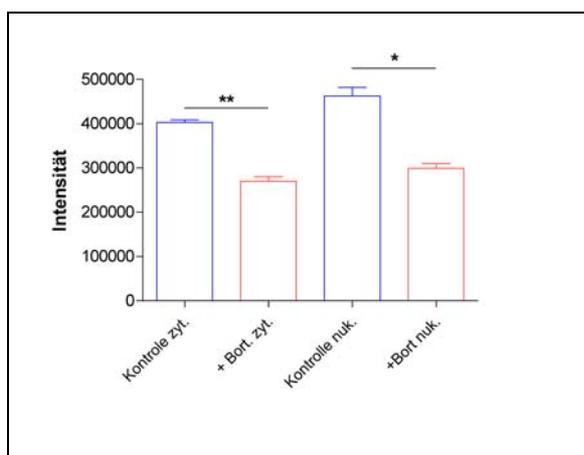
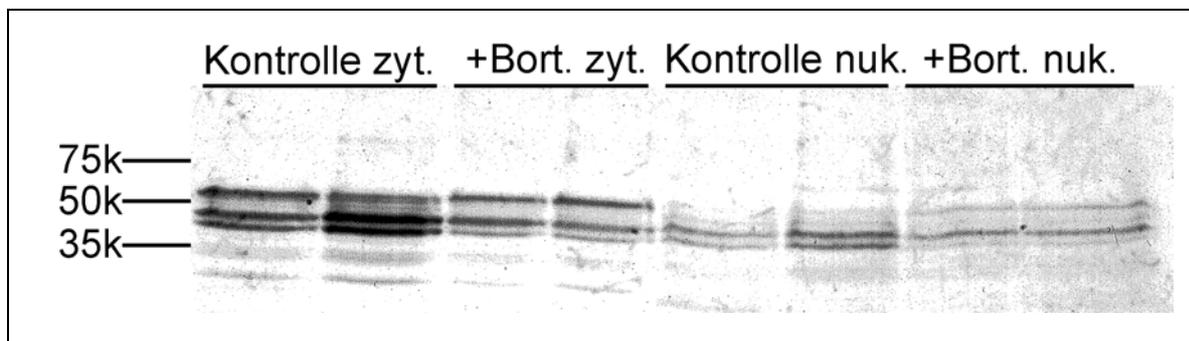


Abbildung 5.16.: Quantifizierung des zytoplasmatischen und nukleären Proteingehalt der NFκB Untereinheit p65 in unbehandelten und in mit 1×10^{-3} mg/ml Bortezomib für 24 Stunden behandelten MV3 Zellen. Die Quantifizierung zeigt statistische Unterschiede zwischen dem zytoplasmatischen und nukleärem Proteingehalt zwischen den unbehandelten und den behandelten MV3 Zellen. * $p < 0.05$, ** $p < 0,01$.

3.2. NFκB Nachweis mit immunzytochemischen Färbungen

Das Ergebnis der immunzytochemischen Färbungen der NFκB Untereinheit p65 an unbehandelten und mit 1×10^{-3} mg/ml Bortezomib für 4 Stunden behandelten MV3 Zellen ist in Abbildung 5.17. dargestellt. Wie aus Abbildung 5.17. (b) ersichtlich ist, zeigte sich bei den unbehandelten Zellen eine deutlich Färbung der NFκB Untereinheit p65, sowohl im Zytoplasma als auch im Kern, was für eine deutlich Aktivierung von NFκB sprach. In den mit Bortezomib behandelten Zellen (vergleiche Abbildung 5.17. (a)), zeigte sich eine schwächer ausgeprägte Anfärbung des Zytoplasmas und vor allem fast vollständig ungefärbte Zellkerne. Dies zeigte deutlich die durch Bortezomib gehemmt Aktivierung und Translokation von NFκB in den Kern.

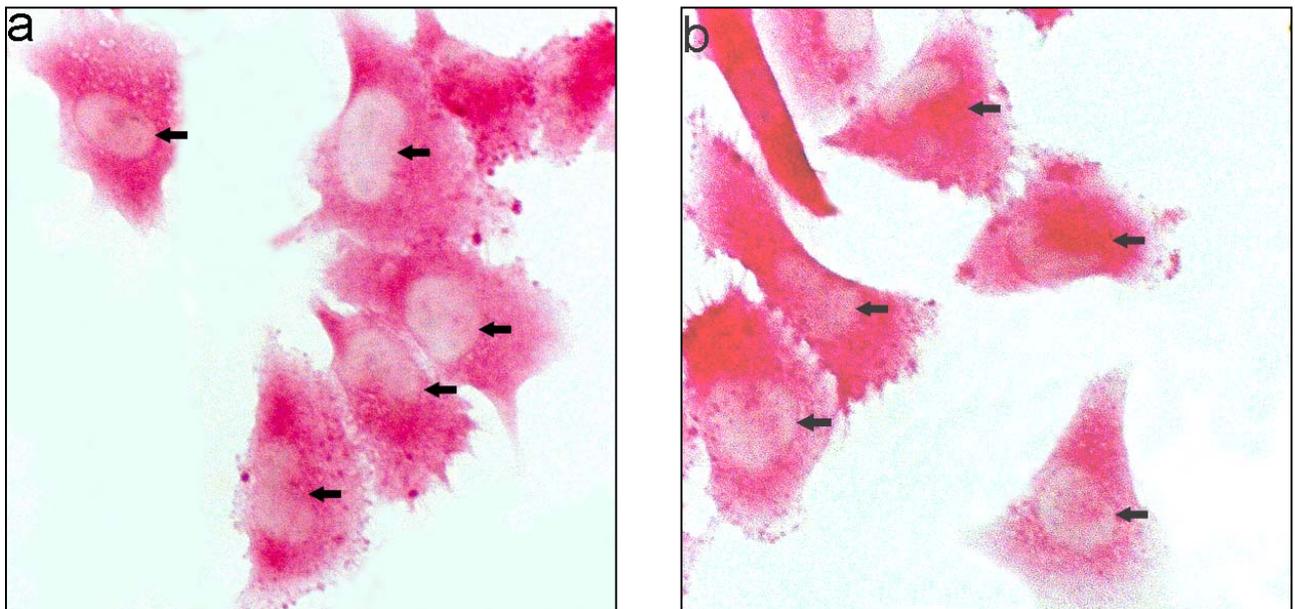


Abbildung 5.17.: Immunzytochemische Färbung der NFκB Untereinheit p65 in unbehandelten (b) und mit 1×10^{-3} mg/ml für 4 Stunden behandelten (a) MV3 Zellen. Die mit Bortezomib behandelten Zellen zeigte eine schwächere Anfärbung des Zytoplasmas und vor allem fast vollständig ungefärbte Zellkerne (Pfeile an der Kernmembran), was die durch Bortezomib gehemmte Aktivierung und Translokation von NFκB in den Kern zeigt.

VI. Diskussion

Die Melanominzidenz nimmt weltweit dramatisch zu (Garbe & Blum, 2001) und liegt zurzeit bei etwa 10–12 Fälle pro 100 000 Einwohner und Jahr. Aufgrund seiner frühen Tendenz zur Metastasierung und seiner ausgeprägten Resistenz gegenüber systemischer Chemotherapie ist das maligne Melanom für etwa 90% der Todesfälle von Hautkrebspatienten verantwortlich. Als Goldstandard gilt nach wie vor eine Monochemotherapie mit Dacarbazin (DTIC) mit objektiven Remissionen in 5,3-28,6% der Fälle (Chiarion Sileni et al., 2001). In keiner bisherigen klinischen Studie führte eine Kombination verschiedener Chemotherapeutika (Polychemotherapie) bzw. Chemotherapeutika mit Zytokinen (Polychemoimmuntherapie) zu einer Verlängerung der Gesamtüberlebensrate (Atzpodien et al., 2002; Eton et al., 2002; Ridolfi et al., 2002), obgleich die Toxizität im Vergleich zur Monochemotherapie signifikant erhöht ist. Neue Ansätze in der Therapie des malignen Melanoms sind daher von größter Dringlichkeit.

Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher zu untersuchen, ob die Kombination von unterschiedlichen Substanzen mit bereits nachgewiesener antiproliferativer Wirkung auf das maligne Melanom, einen im Vergleich zu dem Einsatz der jeweiligen Einzelsubstanzen erhöhten wachstumshemmenden Effekt aufweist. Die dabei verwendeten Substanzen waren der PPAR- γ Agonist Rosiglitazone, das Mistellektin I (ML-I) und der Proteasomen Inhibitor Bortezomib, für die alle drei bereits eine antiproliferative Wirkung auf das Melanom nachgewiesen wurden (Freudlsperger et al., 2006; Thies et al., 2005; Amiri et al., 2004). Die antiproliferativen Substanzen wurden dafür jeweils als Einzelsubstanz, in drei verschiedenen Zweifachkombinationen oder in einer Dreifachkombination in jeweils drei unterschiedlichen humanen Melanomzelllinien (MV3, FemX-1, G361) untersucht. Des Weiteren sollte der genaue Wirkmechanismus des Proteasomen Inhibitors Bortezomib auf die Melanomzellen untersucht werden, insbesondere sein Einfluss auf den NF κ B Signalweg und auf die Apoptose.

Die vorliegende Arbeit belegt, dass eine Zweifachkombination aus Rosiglitazone entweder mit ML-I oder mit Bortezomib im Vergleich zu den übrigen Zusätzen den höchsten antiproliferativen Effekt auf die Melanomzellen besaß. Rosiglitazone wird wie Troglitazone, Ciglitazone oder Pioglitazone zu den Glitazonen gerechnet, einer

Gruppe von synthetischen Liganden des PPAR- γ , die zur Behandlung des Typ-II-Diabetes eingesetzt werden. Für die Glitazone allein konnte bereits in mehreren experimentellen Studien eine antiproliferative Wirkung auf unterschiedliche humane Tumore nachgewiesen werden (Koeffler, 2003), zu denen auch das maligne Melanom zählt (Freudlsperger et al., 2006). Überraschenderweise zeigte Rosiglitazone als Einzelsubstanz ein atypisches Hemmungsverhalten auf alle drei Melanomzelllinien, mit anfänglich starker und mit steigender Konzentration abnehmender Hemmung des Zellwachstums. Diese Beobachtung wurde bereits von Freudlsperger et al. (2006) beschrieben, wo bei vier unterschiedlichen Glitazonen eine Abnahme der antiproliferativen Wirkung bzw. sogar eine leichte, wenn auch nicht signifikante Steigerung des Zellwachstums von sechs unterschiedlichen Melanomzelllinien in genau diesem Konzentrationsbereich (0,0015 - 0,015 mM) beobachtet wurde. In höheren Dosierungen, die in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht eingesetzt wurden, zeigte sich jedoch wieder eine deutliche Abnahme des Zellwachstums. Lucarelli et al. (2002) konnte nachweisen, dass Troglitazone in einer geringen Konzentration von 0,005 mM bei humanen Osteosarkom Zellen durch eine von PPAR- γ unabhängigen Wirkmechanismus, über eine Aktivierung des Phosphatidylinositol-3Kinase/Akt Signalwegs eine Hemmung der Apoptose induzierte und damit das Tumorzellwachstum schützte, was ebenfalls die These unterstützt, dass die antiproliferative Wirkung der Glitazone als Einzelsubstanzen erst in höheren Dosierungen erreicht wird. Dies wurde weiterhin in bereits durchgeführten Phase-II-Studien bestätigt: So zeigte die Behandlung von Liposarkom Patienten mit lediglich 4 mg Rosiglitazone pro Tag (Debrock et al., 2003) keine klinische Besserung, was auch hier an der zu geringen Dosis liegen könnte, zumal die maximale Tagesdosis Rosiglitazone bei der Behandlung des Typ-II-Diabetes bei 8 mg pro Tag liegt. Daher wurde bereits versucht, die Effektivität einer Glitazone Therapie durch die Kombination mit anderen antiproliferativen Substanzen zu erhöhen. So versuchten bereits Shen et al. (2004) die antitumor Wirkung von Troglitazone durch die Kombination mit 9-cis-Retinoid Säure, einem spezifischer Agonist des Retinoid-X-Rezeptors, zu verstärken, was aber auf Tumorzellen des hepatozellulären Karzinoms nicht den erwünschten Erfolg zeigte. Weitaus viel versprechender erscheint die Kombination von Glitazone mit Taxanen. So konnten Copland et al. (2006) durch die Kombination von RS5444, einen neuen, hochaffinen PPAR- γ Agonisten, mit Paclitaxel einen deutlich gesteigerten antiproliferativen Effekt auf anaplastische

Schilddrüsenkarzinomzellen *in vitro* und *in vivo* erreichen. Eine weitere deutliche Wirkungssteigerung der Glitazone wurde durch eine Kombination mit Lovastatin erreicht. Durch die Kombination von Troglitazone und Lovastatin wurde ein deutlich gesteigerter antiproliferativer Effekt auf unterschiedliche Tumorzelllinien von Bronchial-, Gehirn-, Uterus-, und Zervixkarzinom erreicht (Yao et al., 2006).

Die vorliegende Arbeit bekräftigt diese Ergebnisse und unterstreicht den Nutzen einer Kombination von PPAR- γ Agonisten mit weiteren antiproliferativen Stoffen. So zeigte sich für die Zelllinien MV3 und G361 die Zweifachkombination von Rosiglitazone mit ML-I als die wirkungsvollste. Bereits ab einer Konzentration von 1×10^{-4} mg/ml wurde das Zellwachstum von MV3 auf 9% und von G361 auf nur 2% der Kontrolle gehemmt (beide $p < 0,001$). Keine der jeweiligen getesteten Einzelsubstanzen oder der übrigen Zweifach- und Dreifachkombinationen konnte das Zellwachstum signifikant stärker hemmen. Der genaue Wirkmechanismus dieses synergistischen Effekts einer Kombination von Rosiglitazone und ML-I bleibt weiter zu untersuchen. Copland und Mitarbeiter erklärten den synergistischen Effekt der Kombination des PPAR- γ Agonisten RS5444 mit Paclitaxel durch einen deutlichen Anstieg der Paclitaxel induzierten Apoptoserate in den anaplastischen Schilddrüsenkarzinomzellen, obwohl die alleinige Gabe von RS5444 keine Apoptose induzierte, sondern viel mehr zu einem Anhalten des Zellzyklus in der G_0 - G_1 führte (Copland et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit, könnte auf ähnliche Weise die Effektivität der Kombination von Rosiglitazone mit ML-I erklärt werden. In Melanomzellen führt Rosiglitazone zu keiner Induktion der Apoptose (Freudlsperger et al., 2006), so dass auch hier die Kombination mit einer Apoptose induzierenden Substanz Erfolg zu versprechen scheint. Die wachstumshemmende Wirkung von ML-I, eines der biologisch wirksamsten Inhaltsstoffe der Mistelextrakte beruht hauptsächlich auf einer Induktion der Apoptose (Büssing et al., 1996), die über die Proteinsynthese-hemmende Wirkung der A-Kette vermittelt wird (Hostanska et al., 1996). So wurde auch für die antiproliferative Wirkung von ML-I auf humane Melanomzellen eine Apoptose Induktion verantwortlich gemacht (Thies et al., 2005).

Bei der Zelllinie FemX-1 zeigte die Zweifachkombination aus Rosiglitazone mit Bortezomib den höchsten antiproliferativen Effekt. Dabei wurde das Zellwachstum von FemX-1 bereits ab einer Konzentration von 1×10^{-5} mg/ml auf 5% der Kontrolle ($p < 0,001$) gehemmt und keine der getesteten Einzelsubstanzen oder der übrigen

Zwei- und Dreifachkombination zeigte eine signifikant stärker Hemmung des Zellwachstums. Bortezomib gehört zu der Klasse der Proteasomen Inhibitoren, welche reversibel die Funktion des 26S Proteasoms hemmen, und für die eine antiproliferative Wirkung auf unterschiedliche Tumorentitäten gezeigt wurde (Frankel et al., 2000; Ling et al., 2003; Sunwoo et al., 2001; Williams et al., 2003). Auch für das maligne Melanom konnte die antiproliferative Wirkung von Bortezomib als Einzelsubstanz *in vitro* und *in vivo* bereits beschrieben werden (Amiri et al., 2004), die in der vorliegenden Arbeit auch bestätigt werden konnte. Jedoch in einer bereits durchgeführten Phase-II-Studie, bei der die Effektivität einer Bortezomib Einzeltherapie bei 27 Patienten mit metastasiertem Melanom untersucht wurde, konnte keine klinische Wirksamkeit festgestellt werden, so dass Bortezomib als Einzelsubstanz für Melanom Patienten nicht relevant ist (Markovic et al., 2005). In mehreren Studien wurde bereits untersucht, ob durch die Kombination von Proteasomen Inhibitoren mit weiteren antiproliferativ wirkenden Substanzen die wachstumshemmende Wirkung auf unterschiedliche Tumorzellen verstärkt werden kann. So konnten Duechler et al. (2005) eine deutliche höhere antiproliferative Wirkung auf humane chronische B-Zell Leukämie Zellen durch die Kombination von Bortezomib mit den Purinanaloga Cladribin (2CdA) und Fludarabin (FA) erzielen. Dieser Effekt wurde durch eine erhöhte Apoptose in den B-Leukämie-Zellen erreicht, die durch eine signifikante Abnahme der XIAP Expression, einem Vertreter der Inhibitor of apoptosis proteins (IAPs) Familie, vermittelt wurde. Ebenso konnten Mitsiades et al. (2003) einen deutlich erhöhten antiproliferativen Effekt auf Myelomzellen durch die Kombination von Bortezomib mit sowohl Doxorubicin als auch mit Melphalan, zwei konventionellen Zytostatika, nachweisen. Weitere Ansätze zur Behandlung des malignen Melanoms lieferten Amiri und Mitarbeiter, die durch die Kombination von Bortezomib mit Temozolomid, einem oralen Alkylans, in einem murinen Tiermodell eine komplette Remission der palpablen Melanome erreichen konnten, die in einigen Mäusen sogar über 200 Tage anhielt (Amiri et al., 2004). Die Wirkungssteigerung der Kombination von Rosiglitazone mit Bortezomib könnte, analog zu der Kombination von Rosiglitazone und ML-I, dadurch erklärt werden, dass Rosiglitazone wie bereits oben erwähnt auf die Melanomzellen antiproliferativ wirkt ohne eine Apoptose zu induzieren und Bortezomib seine antiproliferative Wirkung in den meisten Tumorzellen durch eine Apoptoseinduktion entfaltet (Orlowski et al., 2002).

Die Kombination von ML-I mit Bortezomib zeigte sich bei keiner der drei Zelllinien als die effektivste Zweifachkombination und auch im Vergleich zu den Einzelsubstanzen zeigte sich keine durchgängige Wirkungssteigerung in allen drei Zelllinien. Wesche und Mitarbeiter konnten bereits nachweisen, dass durch die Kombination mit dem Proteasomen Inhibitor Lactacystin, der cytotoxische Effekt des Lektins Ricin, das große Ähnlichkeiten zu ML-I aufweist und ebenfalls zu der Typ-II-Familie der Ribosom-inaktivierenden Proteine (RIP) gezählt wird (Stirpe et al., 1992), deutlich gesteigert wurde (Wesche et al., 1999). Diese Wirkungssteigerung wurde dadurch erklärt, dass durch Lactacystin der proteasomale Abbau der zytotoxischen A-Kette von Ricin gehemmt wurde. In der Studie von Wesche konnte so die Toxizität von Ricin auf etwa das Dreifache gesteigert werden. Obwohl in der vorliegenden Arbeit die Wirkungssteigerung der Kombination von Bortezomib und ML-I nicht in diesem Maße bestätigt werden konnte, so wird die teilweise beobachtete verstärkte Wachstumshemmung wahrscheinlich auf diesem Mechanismus beruhen, dass der proteasomale Abbau der zytotoxischen A-Kette von ML-I durch Bortezomib gehemmt wird.

Wie bereits erwähnt ist die antiproliferative Wirkung von Bortezomib in den meisten Tumorzellen auf eine Induktion der Apoptose zurückzuführen. Dabei scheint vor allem die durch Bortezomib vermittelte Hemmung des NF κ B Signalwegs eine entscheidende Rolle zu spielen. Daher war das zweite Ziel der vorliegenden Arbeit zu untersuchen, ob die antiproliferative Wirkung von Bortezomib als Einzelsubstanz auch tatsächlich über eine Induktion der Apoptose erzielt wurde und welchen Einfluss Bortezomib auf den NF κ B Signalweg in den Melanomzellen zeigte. Das NF κ B Protein ist ein aus zwei Untereinheiten, in den meisten Fällen p65 und p50, zusammengesetztes Heterodimer, das unter physiologischen Bedingungen durch die Bindung an seinen Inhibitor I κ B im Zytoplasma gehalten wird (Karin et al., 1999). Auf zellulären Stress wie Zytokine, Chemotherapie oder Bestrahlung hin, wird I κ B erst phosphoryliert, dann ubiquitiniert und schließlich im 26S Proteasom degradiert, so dass das nun freie NF κ B in den Zellkern translozieren kann und dort die Transkription bestimmter Gene aktiviert (Karin et al., 2000). In den meisten Zellen und vor allem in Tumorzellen fördert die NF κ B Aktivierung die Zellproliferation (Huang, 2000), steuert die Expression von Adhäsionsmolekülen und schützt vor allem die Zellen vor Apoptose durch die Induktion von verschiedenen

survival/Überlebens Genen (Jesenberger et al., 2002). Zu diesen gehören cellular inhibitors of apoptosis (c-IAP1 und c-IAP2) (Chu et al., 1997), caspase-8-c-Flip (Flice inhibitory protein) (Sayers et al., 2003), TNF receptor-associated factors (TRAF1 und TRAF2) und Mitglieder der Bcl-2 Familie (Bcl-x_L) (Wang et al., 1998). Huang und Mitarbeiter konnten bereits zeigen, dass der NFκB Signalweg in malignen Melanomzellen, vor allem in solchen mit einem hohen Metastasierungspotential, eine hohe Aktivität aufweist und damit eine wichtige Rolle für das Tumorwachstum, die Angiogenese und die Metastasierung des malignen Melanoms spielt (Huang et al., 2000).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die NFκB Expression in Melanomzellen durch Bortezomib deutlich vermindert werden kann. Dies wurde sowohl anhand von immunzytochemischen Färbungen als auch durch quantitative Western Blots nachgewiesen. In den immunzytochemischen Färbungen mit einem monoklonalem Antikörper gegen die p65 Untereinheit von NFκB zeigte sich nach einer vierstündigen Behandlung mit 1×10^{-2} mg/ml Bortezomib eine Abnahme der NFκB Expression im Zytoplasma und vor allem eine fast vollständige Abnahme im Zellkern, was für eine deutliche Hemmung der NFκB Translokation in den Zellkern sprach. Die Ergebnisse der quantitativen Western Blots bestätigten diese Beobachtungen: Nach einer 20 stündigen Inkubation der Zellen mit 1×10^{-3} mg/ml Bortezomib war für die p50 Untereinheit von NFκB der Gehalt sowohl an zytoplasmatischem als auch an nukleärem Protein um 48% geringer wie bei den unbehandelten Zellen. Für die p65 Untereinheit von NFκB war für die behandelten Zellen der Gehalt an zytoplasmatischem Protein um 33% und an nukleärem Protein um 35% geringer wie für die unbehandelten Zellen. Dies bestätigte, dass Bortezomib die Aktivierung und Translokation in den Zellkern von NFκB deutlich verminderte. Eine durch Bortezomib vermittelte Hemmung des NFκB Signalwegs konnte bereits in weiteren Tumorzellen nachgewiesen werden. So wurde eine deutlich Abnahme der NFκB Aktivierung durch Bortezomib in kolorektalen Tumorzellen (Cusack et al., 2001), in Myelomzellen (Hideshima et al., 2002) und in Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf- und Halsbereichs (Sunwoo et al., 2001) beschrieben. Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob diese Hemmung des NFκB Signalwegs zu einer Induktion der Apoptose in den Melanomzellen führte. Zum einen konnte in mit Bortezomib behandelten Melanomzellen eine deutliche Zunahme von morphologischen Veränderungen der Zellkerne beobachtet werden, die spezifisch für

das Ablaufen der Apoptose sind. Zum anderen konnten auf molekularer Ebene histone-assoziierten DNS Fragmente qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden, die typischerweise innerhalb des Prozesses der Apoptose durch aktivierte endogene Endonukleasen entstehen. Somit konnte der Apoptose induzierende Effekt von Bortezomib auf Melanomzellen bestätigt werden, welcher sehr wahrscheinlich auf eine Abnahme der NF κ B Aktivierung zurückzuführen ist. Welche weiteren anti-apoptotischen Faktoren durch eine NF κ B Aktivierung in den Melanomzellen expremiert werden und somit durch Bortezomib suppremiert werden können, bleibt jedoch Gegenstand von weiterführenden Studien.

Insgesamt ließ sich in der vorliegenden Arbeit feststellen, dass die Zweifachkombinationen von Rosiglitazone mit sowohl ML-I als auch mit Bortezomib einen deutlich gesteigerten antiproliferativen Effekt auf humane Melanomzellen aufwiesen, im Vergleich zu ihrer Verwendung als Einzelsubstanzen oder in Form einer Dreifachkombination. Bei beiden Zweifachkombinationen ließ sich diese enorme Wirkungssteigerung dadurch erklären, dass jeweils Substanzen kombiniert wurden die zum einen auch einzeln eine antiproliferative Wirkung auf das Melanom besitzen, zum anderen diese Wirkung aber durch unterschiedliche molekulare Mechanismen erzielen und sich somit synergistisch ergänzen. Im Hinblick auf die ansonsten ungenügenden Therapiemöglichkeiten beim metastasierten Melanom, könnte diese Studie ein viel versprechender Ansatz für weiterführende Studien sein.

VII. Zusammenfassung

Die Prognose nach eingetretener Metastasierung ist beim kutanen malignen Melanom trotz Polychemotherapie infaust, so dass ein großes Interesse für neue Therapieansätze besteht. Für den PPAR- γ Agonist Rosiglitazone, das Mistellektin I (ML-I) und den Proteasomen Inhibitor Bortezomib als Einzelsubstanzen konnte bereits *in vitro* eine antiproliferative Wirkung auf humane Melanomzellen nachgewiesen werden. Ziel dieser Arbeit war es daher eine mögliche Wirkungssteigerung durch die Kombination dieser drei Substanzen in Form von Zwei- oder Dreifachkombinationen an drei unterschiedlichen humanen Melanomzelllinien anhand von Zellproliferationstesten zu untersuchen. Dabei stellte sich heraus, dass eine Zweifachkombination von Rosiglitazone mit entweder ML-I oder mit Bortezomib eine signifikant stärkere antiproliferative Wirkung auf alle drei Melanomzelllinien im Vergleich zu den Einzelsubstanzen oder den übrigen Zwei- und Dreifachkombinationen besaß. Diese Steigerung des antiproliferativen Effekts beider Zweifachkombinationen wurde durch die unterschiedlichen molekularen Wirkungsmechanismen versucht zu erklären. Während ML-I und Bortezomib nachweislich eine Apoptose induzierten, war der antiproliferative Effekt von Rosiglitazone unabhängig von einer Apoptoseinduktion. Der genaue Wirkmechanismus des gesteigerten Effekts der Kombinationstherapien jedoch muss in weiterführenden Studien geklärt werden.

Des Weiteren sollte der genaue Wirkmechanismus von Bortezomib als Einzelsubstanz untersucht werden. Dabei konnte anhand von sowohl zellmorphologischen Veränderungen als auch mittels molekularbiologischer Methoden gezeigt werden, dass Bortezomib bei den Melanomzellen zu einer gesteigerten Induktion der Apoptose führte. Darüber hinaus wurde anhand von quantitativer Western Blot Analysen nachgewiesen, dass Bortezomib in den Melanomzellen zu einer deutlichen Abnahme des zytoplasmatischen und nukleären NF κ B Protein Gehalts führte, was für die gesteigerte Apoptoserate verantwortlich gemacht wurde. Ob diese gesteigerte wachstumshemmende Wirkung einer Zweifachkombination aus Rosiglitazone mit ML-I oder Bortezomib ein möglicher Ansatz für neue Therapieoptionen in der Behandlung des malignen Melanoms sein könnte, muss in weiterführenden Tiermodellen überprüft werden.

VIII. Literaturverzeichnis

Adams J (2004) The Proteasome: A suitable antineoplastic target. *Nat Rev Cancer* 4:349-360.

Alarcon de la Lastra C, Sanchez-Fidalgo S, Villegas I, Motilva V (2004) New pharmacological perspectives and therapeutic potential of PPAR-gamma agonists. *Curr Pharm Des* 10:3505-3524

Amiri KI, Horton LW, LaFleur BJ, Sosman JA, Richmond A (2004) Augmenting chemosensitivity of malignant melanoma tumors via proteasome inhibition: implication for bortezomib (VELCADE, PS-341) as a therapeutic agent for malignant melanoma. *Cancer Res* 64:4912-4918

Atzpodien J, Neuber K, Kamanabrou D, Fluck M, Brocker EB, Neumann C, Runger TM, Schuler G, von den Driesch P, Muller I, Paul E, Patzelt T, Reitz M (2002) Combination chemotherapy with or without s.c. IL-2 and IFN-alpha: results of a prospectively randomized trial of the Cooperative Advanced Malignant Melanoma Chemoimmunotherapy Group (ACIMM). *Br J Cancer* 86:179-184

Augustin M, Bock PR, Hanisch J, Karasmann M, Schneider B (2005) Safety and efficacy of the long-term adjuvant treatment of primary intermediate- to high-risk malignant melanoma (UICC/AJCC stage II and III) with a standardized fermented European mistletoe (*Viscum album* L.) extract. Results from a multicenter, comparative, epidemiological cohort study in Germany and Switzerland. *Arzneimittelforschung* 55:38-49

Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ, Atkins MB, Cascinelli N, Coit DG, Fleming ID, Gershenwald JE, Houghton A Jr, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MF, Morton DL, Reintgen DS, Ross MI, Sober A, Thompson JA, Thompson JF (2001) Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 19:3635-3648

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254

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

Büssing A, Suzart K, Bergmann J, Pfuller U, Schietzel M, Schweizer K (1996) Induction of apoptosis in human lymphocytes treated with *Viscum album* L. is mediated by the mistletoe lectins. *Cancer Lett* 99:59-72

Burstein HJ, Demetri GD, Mueller E, Sarraf P, Spiegelman BM, Winer EP (2003) Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: a phase II study. *Breast Cancer Res Treat* 79:391-397

Chiarion Sileni V, Nortilli R, Aversa SM, Paccagnella A, Medici M, Corti L, Favaretto AG, Cetto GL, Monfardini S (2001) Phase II randomized study of dacarbazine, carmustine, cisplatin and tamoxifen versus dacarbazine alone in advanced melanoma patients. *Melanoma Res* 11:189-196

Chu ZL, McKinsey TA, Liu L, Gentry JJ, Malim MH, Ballard DW (1997) Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:10057-10062

Copland JA, Marlow LA, Kurakata S, Fujiwara K, Wong AK, Kreinest PA, Williams SF, Haugen BR, Klopper JP, Smallridge RC (2006) Novel high-affinity PPAR γ agonist alone and in combination with paclitaxel inhibits human anaplastic thyroid carcinoma tumor growth via p21WAF1/CIP1. *Oncogene* 25:2304-2317

Cusack JC Jr, Liu R, Houston M, Abendroth K, Elliott PJ, Adams J, Baldwin AS Jr. (2001) Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition. *Cancer Res* 61:3535-3540

Debrock G, Vanhentenrijk V, Sciot 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

Desmond RA, Soong SJ. (2003) Epidemiology of malignant melanoma. *Surg Clin North Am* 83:1-29

Dietrich JB, Ribereau-Gayon G, Jung ML, Franz H, Beck JP, Anton R (1992) Identity of the N-terminal sequences of the three A chains of mistletoe (*Viscum album* L.) lectins: homology with ricin-like plant toxins and single-chain ribosome-inhibiting proteins. *Anticancer Drugs* 3:507-511

Dignam JD, Martin PL, Shastry BS, Roeder RG (1983) Eukaryotic gene transcription with purified components. *Methods Enzymol* 101:582-598

Duechler M, Linke A, Cebula B, Shehata M, Schwarzmeier JD, Robak T, Smolewski P (2005) In vitro cytotoxic effect of proteasome inhibitor bortezomib in combination with purine nucleoside analogues on chronic lymphocytic leukaemia cells. *Eur J Haematol* 74:407-417

Eifler R, Pfüller K, Göckeritz W, Pfüller U (1993) Improved procedures for isolation and standardization of mistletoe lectins and their subunits: lectin pattern of the European mistletoe. In: Baus J, Kundu M, Chakrabari P, Bog-hansen TC (eds) *Lectins: Biology, Biochemistry, Clinical Biochemistry*, Wiley, New Delhi, pp. 144-15

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

Endo Y, Tsurugi K, Franz H (1988) The site of action of the A-chain of mistletoe lectin I on eukaryotic ribosomes. The RNA N-glycosidase activity of the protein. *FEBS Lett* 231:378-380

Eton O, Legha SS, Bedikian AY, Lee JJ, Buzaid AC, Hodges C, Ring SE, Papadopoulos NE, Plager C, East MJ, Zhan F, Benjamin RS (2002) Sequential biochemotherapy versus chemotherapy for metastatic melanoma: results from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 20:2045-2052

Farrow B, Evers BM (2003) Activation of PPARgamma increases PTEN expression in pancreatic cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 301:50-53

Frankel A, Man S, Elliott P, Adams J, Kerbel RS (2000) Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341. *Clin Cancer Res* 6:3719-3728

Freudlsperger C, Moll I, Schumacher U, Thies A (2006) Anti-proliferative effect of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists on human malignant melanoma cells in vitro. *Anticancer Drugs* 17:325-332

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

Frankel A, Man S, Elliott P, Adams J, Kerbel RS (2000) Lack of multicellular drug resistance observed in human ovarian and prostate carcinoma treated with the proteasome inhibitor PS-341. *Clin Cancer Res* 9:3719-3728

Garbe C, Blum A (2001) Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol* 5:280-290

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

Hajto T, Hostanska K, Frei K, Rordorf C, Gabius HJ (1990) Increased secretion of tumor necrosis factors alpha, interleukin 1, and interleukin 6 by human mononuclear cells exposed to beta-galactoside-specific lectin from clinically applied mistletoe

extract. *Cancer Res* 11:3322-3326

Han S, Roman J (2006) Rosiglitazone suppresses human lung carcinoma cell growth through PPARgamma-dependent and PPARgamma-independent signal pathways. *Mol Cancer Ther* 2: 430-437

Hideshima T, Chauhan D, Richardson P, Mitsiades C, Mitsiades N, Hayashi T, Munshi N, Dang L, Castro A, Palombella V, Adams J, Anderson KC (2002) NF-kappa B as a therapeutic target in multiple myeloma. *J Biol Chem* 19:16639-16647

Hostanska K, Hajto T, Weber K, Fischer J, Lentzen H, Sutterlin B, Saller R (1996) A natural immunity-activating plant lectin, *Viscum album* agglutinin-I, induces apoptosis in human lymphocytes, monocytes, monocytic THP-1 cells and murine thymocytes. *Nat Immun* 6:295-311

Huang S, DeGuzman A, Bucana CD, Fidler IJ (2000) Nuclear factor-kappaB activity correlates with growth, angiogenesis, and metastasis of human melanoma cells in nude mice. *Clin Cancer Res* 6:2573-2581

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

Jesenberger V, Jentsch S (2002) Deadly encounter: ubiquitin meets apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:112-21

Karin M (1999) How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene* 49:6867-6874

Karin M, Ben-Neriah Y (2000) Phosphorylation meets ubiquitination: the control of NF-[kappa]B activity. *Annu Rev Immunol* 18:621-663

Keelan JA, Sato TA, Marvin KW, Lander J, Gilmour RS, Mitchell MD (1999) 15-Deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2), a ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma, induces apoptosis in JEG3 choriocarcinoma cells. *Biochem*

Biophys Res Commun 3:579-855

Kitamura S, Miyazaki Y, Shinomura Y, Kondo S, Kanayama S, Matsuzawa Y (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces growth arrest and differentiation markers of human colon cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 1:75-80

Koeffler HP (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and cancers. *Clin Cancer Res* 1:1-9

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* 227:680-685

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

Ling YH, Liebes L, Jiang JD, Holland JF, Elliott PJ, Adams J, Muggia FM, Perez-Soler R (2003) Mechanisms of proteasome inhibitor PS-341-induced G(2)-M-phase arrest and apoptosis in human non-small cell lung cancer cell lines. *Clin Cancer Res* 9:1145-1154

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

Markovic SN, Geyer SM, Dawkins F, Sharfman W, Albertini M, Maples W, Fracasso PM, Fitch T, Lorusso P, Adjei AA, Erlichman C (2005) A phase II study of bortezomib in the treatment of metastatic malignant melanoma. *Cancer* 103:2584-2589

Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG, Poulaki V, Tai YT, Chauhan D, Fanourakis G, Gu X, Bailey C, Joseph M, Libermann TA, Schlossman R, Munshi NC, Hideshima T, Anderson KC (2002) The proteasome inhibitor PS-341 potentiates sensitivity of multiple myeloma cells to conventional chemotherapeutic agents: therapeutic applications. *Blood* 6:2377-2380

Mössner R, Schulz U, Krüger U, Middel P, Schinner S, Füzesi L, Neumann C, Reich K (2002) Agonist of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ inhibits cell growth in malignant melanoma. *J Invest Dermatol* 119:576-582

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

Murphy GJ, Holder JC (2000) PPAR-gamma agonists: therapeutic role in diabetes, inflammation and cancer. *Trends Pharmacol Sci* 12:469-474

Nawrocki ST, Bruns CJ, Harbison MT, Bold RJ, Gotsch BS, Abbruzzese JL, Elliott P, Adams J, McConkey DJ (2002) Effects of the proteasome inhibitor PS-341 on apoptosis and angiogenesis in orthotopic human pancreatic tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 14:1243-1253

Orlowski RZ, Baldwin AS Jr (2002) NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med* 8:385-389

Ornstein, L (1964) Electrophoresis. Background and Theory. *Ann N Y Acad Sci* 121:321-349

Patel RK, Mohan C (2005) PI3K/AKT signaling and systemic autoimmunity. *Immunol Res* 1:47-55

Rajkumar SV, Richardson PG, Hideshima T, Anderson KC (2005) Proteasome inhibition as a novel therapeutic target in human cancer. *J Clin Oncol* 3:630-639

Ridolfi R, Chiarion-Sileni V, Guida M, Romanini A, Labianca R, Freschi A, Lo Re G, Nortilli R, Brugnara S, Vitali P, Nanni O; Italian Melanoma Intergroup (2002) Cisplatin, dacarbazine with or without subcutaneous interleukin-2, and interferon alpha-2b in advanced melanoma outpatients: results from an Italian multicenter phase III randomized clinical trial. *J Clin Oncol* 6:1600-1607

Romeis B (1989) Feulgen Färbung. In: Böck P (ed) *Mikroskopische Techniken*, Urban&Schwarzenberg, München, pp. 352-353.

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

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

Sayers TJ, Brooks AD, Koh CY, Ma W, Seki N, Raziuddin A, Blazar BR, Zhang X, Elliott PJ, Murphy WJ (2003) The proteasome inhibitor PS-341 sensitizes neoplastic cells to TRAIL-mediated apoptosis by reducing levels of c-FLIP. *Blood* 1:303-310

Shen YC, Hsu C, Chen JY, Cheng AL (2004) Lack of efficacy of troglitazone at clinically achievable concentrations, with or without 9-cis retinoic acid or cytotoxic agents, for hepatocellular carcinoma cell lines. *Br J Cancer* 8:1561-1565

Smalley KS, Haass NK, Brafford PA, Lioni M, Flaherty KT, Herlyn M (2006) Multiple signalling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases. *Mol Cancer Ther* 5:1136-1144

Spiegelman BM (1998) PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes* 4:507-514

Stirpe F, Barbieri L, Battelli MG, Soria M, Lappi DA (1992) Ribosome-inactivating

proteins from plants: present status and future prospects. *Biotechnology (NY)* 10: 405-412

Sun W, Schuchter LM (2001) Metastatic melanoma. *Curr Treat Options Oncol* 2:193-202

Sunwoo JB, Chen Z, Dong G, Yeh N, Crowl Bancroft C, Sausville E, Adams J, Elliott P, Van Waes C (2001) Novel proteasome inhibitor PS-341 inhibits activation of nuclear factor-kappa B, cell survival, tumor growth, and angiogenesis in squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 7:1419-1428

Thies A, Nugel D, Pfuller U, Moll I, Schumacher U (2005) Influence of mistletoe lectins and cytokines induced by them on cell proliferation of human melanoma cells in vitro. *Toxicology* 207:105-116

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

Wang CY, Mayo MW, Korneluk RG, Goeddel DV, Baldwin AS Jr (1998) NF-kappaB antiapoptosis: induction of TRAF1 and TRAF2 and c-IAP1 and c-IAP2 to suppress caspase-8 activation. *Science* 283:1680-1683

Wesche J, Rapak A, Olsnes S: Dependence of ricin toxicity on translocation of the toxin A-chain from the endoplasmic reticulum to the cytosol (1999) *J Biol Chem* 274:34443-34449

Williams S, Pettaway C, Song R, Papandreou C, Logothetis C, McConkey DJ (2003) Differential effects of the proteasome inhibitor bortezomib on apoptosis and angiogenesis in human prostate tumor xenografts. *Mol Cancer Ther* 9:835-843

Yao CJ, Lai GM, Chan CF, Cheng AL, Yang YY, Chuang SE (2006) Dramatic synergistic anticancer effect of clinically achievable doses of lovastatin and

troglitazone. *Int J Cancer* 3:773-779

Zavrski I, Jakob C, Schmid P, Krebbel H, Kaiser M, Fleissner C, Rosche M, Possinger K, Sezer O (2005) Proteasome: an emerging target for cancer therapy. *Anticancer Drugs* 16:475-481

IX. Danksagung

X. Lebenslauf

XI. Publikationsverzeichnis

Originalarbeiten:

Freudlsperger C, Thies A, Pfüller U, Schumacher U (2007) The proteasome inhibitor bortezomib augments anti-proliferative effects of mistletoe lectin-I and the PPAR-gamma agonist rosiglitazone in human melanoma cells. *Anticancer Res.* 27:207-13.

Abstracts zu Vorträgen und Postern:

Freudlsperger C, Thies A, Schumacher U (2005) The influence of the proteasome inhibitor bortezomib (Velcade®) on intracytoplasmic proteins acting as antiproliferative proteins on malignant melanoma. 22. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg.

XII. 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.

Christian Freudlsperger