

# **UVA-Strahlung bei der Pathogenese des malignen Melanoms**

## **Dissertation**

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität Tübingen  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von  
Anna-Katharina von Thaler  
aus Ebersdorf

Tübingen  
2012

Tag der mündlichen Qualifikation:

12.03.2013

Dekan:

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. Mark Berneburg

2. Berichterstatter:

Prof. Dr. Olaf Rieß

A. ZUSAMMENFASSUNG .....	3
B. EINLEITUNG .....	4
1. UV-STRAHLUNG ERZEUGT DNA-SCHÄDEN .....	5
2. OXIDATIVER STRESS UND MITOCHONDRIEN .....	7
3. TIERMODELLE IN DER MELANOMFORSCHUNG .....	8
4. DIE UVB- STRAHLUNG.....	11
5. DIE UVA- STRAHLUNG.....	12
6. DER WARBURG-EFFEKT.....	14
6.1 Der Glucose-Stoffwechsel in gesunden ausdifferenzierten Zellen.....	14
6.2 Der Glucose-Stoffwechsel von Tumorzellen .....	15
7. DIE ROLLE DER TRANSKETOLASE-LIKE-1 BEI TUMOREN .....	17
C. MATERIAL UND METHODEN.....	21
1. GERÄTE .....	21
2. MATERIALIEN.....	22
2.1 Kits .....	22
2.2 Enzyme .....	22
2.3 Primer .....	22
2.4 Antikörper.....	23
2.5 Puffer .....	23
2.5.1 Gelelektrophorese .....	23
2.5.2 Zellisolation.....	23
2.5.3 Zellkultur .....	24
2.5.4 Transketolase .....	24
2.5.5 Atmungsmessung.....	24
2.5.6 Seneszenz.....	25
2.6 Chemikalien .....	25
2.7 Gebrauchswaren.....	28
3. ZELLINIEN .....	29
4. ZELLKULTUR.....	29
4.1 Anzucht und Kulturbedingungen.....	29
4.1.1 Kultivierung von Melanomzellen.....	29
4.1.2 Kultivierung von Melanozyten .....	30
4.1.3 Beschichten von Kulturflaschen mit Poly-L-Lysin .....	30
4.1.4 Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer .....	30
4.1.5 UVA-Bestrahlung von Zellen .....	31
4.1.6 Behandlung von Zellen während der UVA-Bestrahlung.....	32
4.2 Kryokonservierung.....	32
4.3 Isolation von Melanozyten .....	32
5. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....	33
5.1 DNA Isolation .....	33
5.2 RNA Isolation .....	33
5.3 cDNA Synthese mittels RT-PCR .....	34
5.4 PCR .....	34
5.2.1 PCR- Ansatz.....	34
5.2.2 PCR-Programm .....	35
5.5 Real Time PCR .....	35
5.3.1 Real Time PCR Ansätze.....	36
5.3.2 Real Time PCR Programme.....	36
5.6 Agarosegelelektrophorese.....	37
6. STOFFWECHSELUNTERSUCHUNGEN.....	38
6.1 Glucose-Messung in Zellkulturmedium.....	38
6.2 Laktat-Messung in Zellkulturmedium .....	38
6.3 Transketolase-Aktivität .....	39
6.4 Immunofärbung von Transketolase-like 1 .....	39
6.5 Atmungsmessung .....	40
7. INVASIONSASSAY .....	41
8. SENESZENZ.....	41
9. HAUTÄQUIVALENZMODELL .....	42

## Inhaltsverzeichnis

---

10. STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	42
11. EINGESETZTE SOFTWARE UND INTERNET-DIENSTE.....	43
11.1 Office-Anwendungen, Literaturverwaltung und Sequenzauswertung .....	43
11.2 Literaturrecherche.....	43
D. ERGEBNISSE.....	44
1. EFFEKT VON UVA AUF DIE PHYSIOLOGIE VON MELANOMZELLEN .....	44
1.1 Einfluss von UVA auf die Mitochondrien .....	44
1.2 Der Einfluss von UVA auf die Seneszenz .....	46
1.3 Hinweise zeigen einen erhöhten Warburg-Effekt durch UVA.....	48
1.4 Der Einfluss von UVA auf die Transketolase.....	53
1.5 Die Invasivität von Melanomzellen als Folge des Warburg-Effekts.....	62
2. DER EFFEKT VON UVA AUF EIN HUMANES HAUTÄQUIVALENZMODELL .....	68
2.1 Die mitochondriale Common Deletion im Hautäquivalenzmodell.....	68
2.2 Der Warburg-Effekt im Hautäquivalenzmodell .....	69
2.3 Die Aktivität der Transketolase im Hautäquivalenzmodell.....	73
E. DISKUSSION .....	75
1. EFFEKT VON UVA AUF DIE PHYSIOLOGIE VON MELANOMZELLEN .....	75
1.1 Einfluss von UVA auf die Mitochondrien .....	75
1.2 Hinweise zeigen einen erhöhten Warburg-Effekt durch UVA.....	76
1.3 Der Effekt von UVA auf die Transketolase .....	78
1.4 Die Invasivität von Melanomzellen als Folge des Warburg-Effekts.....	80
1.5 Schlussfolgerung - in vitro Daten.....	84
2. HAUTÄQUIVALENZMODELL .....	87
2.1 Die mitochondriale Common Deletion im Hautäquivalenzmodell.....	87
2.2 Der Warburg-Effekt im Hautäquivalenzmodell .....	87
2.3 Die Aktivität der Transketolase im Hautäquivalenzmodell.....	89
2.4 Schlussfolgerung - Hautäquivalentmodell .....	90
F. ABKÜRZUNGEN .....	92
G. LITERATURVERZEICHNIS.....	95
H. ANHANG .....	117
1. ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL.....	117
1.1 Effekt von UVA auf die Physiologie von Melanomzellen .....	117
2.1 Der Effekt von UVA auf ein humanes Hautäquivalenzmodell .....	117
3.1 Diskussion.....	117
3. LEBENS LAUF .....	118
2. DANKSAGUNG.....	119

## A. Zusammenfassung

Der schwarze Hautkrebs, das Melanom, ist ein maligner Tumor mit hoher Mortalität und ständig zunehmenden Vorkommen. Dabei steht das maligne Melanom im Zusammenhang mit ultravioletter Strahlung (UV), wobei die Rolle des langwelligen UVA sowohl bei der Melanomentstehung als auch bei der Pathogenese schon seit längerem kontrovers diskutiert wird. In dieser Dissertation wurde der Effekt von UVA auf Melanomzellen verschiedener Wachstumsphasen und auf ein dreidimensionales Hautäquivalent untersucht. Dabei wurden die Proben mit einer relativ geringen, aber chronischen Dosis von UVA bestrahlt. Es ist bekannt, dass UVA indirekt über reaktive Sauerstoffspezies (ROS) wirkt und unter anderem Mutationen in der mitochondrialen DNA verursacht, welche in dieser Arbeit ebenfalls nachgewiesen wurden. Bei Bestrahlungsexperimenten wurde besonderes Augenmerk auf den sogenannten Warburg-Effekt gelegt, welcher einen veränderten Glucosestoffwechsel von Tumorzellen zum Merkmal hat. Der Glucosestoffwechsel zeichnet sich dabei durch eine Laktatproduktion aus, die unter aeroben Bedingungen stattfindet. Es zeigte sich, dass UVA den Warburg-Effekt im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen erhöht. Es wurde postuliert, dass die Transketolase-like-1 als Schlüsselenzym des Pentosephosphat-Wegs eine bedeutende Rolle im Warburg-Effekt spielt. Dies konnte im Falle von UVA und malignen Melanom *in vitro* nicht bestätigt werden, jedoch wurde durch UVA die allgemeine Transketolasen-Aktivität und damit die Aktivität des Pentosephosphat-Wegs erhöht. Es zeigten sich Hinweise, dass UVA indirekt über ROS und eine erhöhte pAkt-Expression auf den Warburg-Effekt wirkt, welches über ein saures Mikromileu durch den erhöhten Laktatgehalt die Invasivität der Melanomzellen steigert. Interessanterweise konnte der Warburg-Effekt durch das Antioxidans Vitamin E bzw. durch Sonnenschutzcreme gesenkt werden. Zusammenfassend leistet diese Arbeit einen Beitrag zum Verständnis von chronischer UVA-Belastung bei der Invasivität des malignen Melanoms und deutet einen schützenden Effekt von Sonnencreme und Antioxidantien für Melanompatienten an.

## B. Einleitung

In den letzten Jahrzehnten stieg die Zahl von Hautkrebspatienten in Europa und in den USA dramatisch an (Ferguson 2005; Ferlay, Shin et al. 2010; Andrade, Brites et al. 2012). Dabei ist die gefährlichste Form mit einer sehr hohen Letalitätsrate das maligne Melanom, welches erstmals 1812 von Rene Laënnac beschrieben wurde (Denkler and Johnson 1999). Seitdem wurde eine steigende Inzidenz weltweit beobachtet. So werden in den USA jedes Jahr ca. 60.000 Fälle mit Melanomen aufgezeichnet, das sind 20 Fälle je 100.000 Einwohner (Jemal, Murray et al. 2005). Die höchste Melanominzidenz in Europa findet sich mit bis zu 29 Fällen je 100.000 Einwohner pro Jahr in Skandinavien (Birch-Johansen, Hvilsom et al. 2008). Dagegen wird in Italien von 11 Fällen je 100.000 Einwohnern berichtet; ähnliche Inzidenzraten werden jährlich in Schottland und Deutschland registriert (MacKie, Bray et al. 2007; Crocetti, Guzzinati et al. 2008).

Die genaue Pathogenese des malignen Melanoms ist noch nicht ganz geklärt. Genetische Prädisposition, die sich in verschiedenen empfindlichen Genen oder in einer komplexen Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp manifestiert, spielen jedoch eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des malignen Melanoms (Tucker and Goldstein 2003). So konnten insbesondere die Gene *CDKN2A* und *CDK4* in Familien mit hohem Risiko identifiziert werden (Hussussian, Struewing et al. 1994; Kamb, Shattuck-Eidens et al. 1994; Zuo, Weger et al. 1996). Die Anzahl der Nevi hängt ebenfalls mit dem Risiko zusammen an Melanom zu erkranken (Tucker, Halpern et al. 1997). Während man besonders für das Plattenepithelkarzinom und zum Teil auch für das Basalzellkarzinom einen direkten Effekt von ultravioletter Strahlung (UV) bei der Entstehung dieser Tumoren akzeptiert, wurde dieser Fakt für einige Zeit kontrovers in Bezug auf das maligne Melanom diskutiert. Mittlerweile gibt es jedoch klare Hinweise dafür, dass UV eine entscheidende Rolle in der Melanomentstehung spielt. Ein Hinweis ist, dass die Inzidenz von Melanomen in Populationen mit sehr heller Haut höher ist (Norris 1820). Die einzelnen Hauttypen hängen von der Produktion zweier Typen photoprotektiven Melanins ab. Menschen in Skandinavien besitzen mehr Phäomelanin und weniger Eumelanin, welches gegen das maligne Melanom schützt (Tadokoro, Kobayashi et al. 2003; Wood, Berwick et al. 2006). Melanin ist ein wichtiges Chromophor in der Haut, das in der Lage ist UV-Strahlen und sichtbares Licht zu absorbieren. Melanin ist zusätzlich in der Lage molekularen Sauerstoff und Hydroxylradikale abzufangen und so die DNA vor Bildung von Pyrimidindimeren zu schützen (Hussein 2005). Des Weiteren gibt es epidemiologische Hinweise, dass UV-Strahlung der Grund für die Melanomentstehung auf Grund von frühkindlichen Sonnenbrand sein kann (Fears, Bird et al. 2002; Tucker and Goldstein 2003).

Innerhalb des Spektrums von UV-Strahlung ist das des UVB-Strahlungs als Ursache, insbesondere für nichtmaligne Hautkrebsarten gut dokumentiert. Studien mit transgenen Mäusen mit dem hepatozyten Wachstumsfaktor/Scatterfaktor (HGF/SF) unterstützen die Rolle einer einmaligen hohen UVB-Dosis in der Pathologie von Melanomen (Noonan, Otsuka et al. 2000; Noonan, Recio et al. 2001). Der Effekt von UVA ist dagegen noch immer unklar, obwohl es einige Hinweise gibt, die zeigen, dass auch UVA eine Rolle in der Entstehung des malignen Melanoms spielen könnte.

### 1. UV-Strahlung erzeugt DNA-Schäden

Das die Erdoberfläche erreichende Sonnenlicht ist ein Gemisch aus elektromagnetischer Strahlung, die teilweise aus UV-Strahlung und sichtbarem Licht zusammengesetzt ist (Abb.B-1). Das Spektrum der UV-Strahlung ist in das langwellige UVA (320-400 nm), kürzeres UVB (280-320 nm) und das kurzwellige UVC (< 280 nm) unterteilt (Hockberger 2002). UVC wird von der Atmosphäre absorbiert und erreicht die Erdoberfläche nicht. Deshalb konzentrieren sich Studien, die sich mit dem Effekt des UV auf die menschliche Haut beschäftigen auf UVA und UVB. Die Energie der UV-Strahlung wird von zellulären Proteinen und DNA absorbiert und kann dadurch mutagene DNA Läsionen hervorrufen (Tab. B-1). UVB wird auf Grund seiner Wellenlänge von der Epidermis absorbiert und kann somit in den Keratinozyten DNA-Schäden hervorrufen. Die häufigsten Arten von DNA-Schäden, die durch UVB entstehen, sind Cyclobutan Pyrimidin Dimere (CPDs), Pyrimidin-Pyrimidon (6-4) Photoprodukte (6-4PPs) und deren Valenz-Isomere (Setlow, Grist et al. 1993; Douki, Reynaud-Angelin et al. 2003; Besaratinia, Synold et al. 2004; Pfeifer, You et al. 2005). Diese Photoprodukte können zu C-T oder CC-TT Transitionen führen. Bereiche der DNA mit 5-Methylcytosin sind dabei häufig von UVB-induzierten Mutationen betroffen (Tommasi, Denissenko et al. 1997; Mitchell 2000; Lee and Pfeifer 2003). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass UVB die DNA erheblich degradieren kann. Dies geschieht wahrscheinlich durch die Bildung von oxidativen Stress in Zusammenhang mit dem P53-Signalweg (Horikawa-Miura, Matsuda et al. 2007; Jiang, Ke et al. 2007).



Abb. B- 1: Spektrum von UV-Strahlung, sichtbarem Licht und Infrarotlicht

Das Sonnenlicht ist allerdings reicher an UVA-Strahlen, die in der Lage sind tiefer in die Haut einzudringen. Zwar werden die Wellenlängen des UVA nicht direkt von der DNA absorbiert und können somit die DNA nicht direkt beeinflussen, sie agieren aber auf indirekte Weise indem sie reaktive Sauerstoffspezies (ROS) produzieren, was wiederum zu oxidativen Schäden (Kielbassa, Roza et al. 1997; Cadet, Sage et al. 2005) und Einzel- bzw. Doppelstrangbrüchen (SSBs und DSBs) führen kann (Wehner and Horneck 1995; Folkard, Prise et al. 2002). Des Weiteren kann UVA-Bestrahlung sekundäre Photoreaktionen der existierenden Photoprodukte hervorrufen oder durch indirekt Lichtreaktionen zu DNA-Schäden führen (Sinha and Hader 2002). Es konnte auch festgestellt werden, dass UVA die Photoprodukte 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosin (8oxoG) und CPDs in der menschlichen Haut verursacht (Mouret, Baudouin et al. 2006). Insgesamt bewirkt UVA mehr Mutationen an methylierten CpG Stellen im Genom von Säugetieren als UVB (Ikehata, Kudo et al. 2003).

**Tab. B- 1:** Durch UV-Strahlung entstehende DNA-Schäden

Stressquelle	UVB und UVC	UVA indirekt über ROS
entstehender DNA-Schaden	CPDs (Cyclobutan Pyrimidin Dimere) -TT-Dimere -TC/CT-Dimere -CC-Dimere	SSBs (Einzelstrangbrüche)
		DSBs (Doppelstrangbrüche)
	6-4PPs (Pyrimidin-Pyrimidon (6-4) Photoprodukte	8oxoG (8-oxo-7,8 dihydro-2' deoxyguanosin)
		8-oxo-Adenin
aus dem Schaden entstehende DNA-Mutation	C-T oder CC-TT Transitionen	T-G Transversionen
		Basenverlust

Die DNA von Tumorzellen ist auf Dauer höheren Dosen von oxidativen Stress ausgesetzt als die benachbarter Zellen (Toyokuni, Okamoto et al. 1995). ROS sind bei einer Vielzahl von wichtigen Phänomenen in der Medizin beteiligt, wobei in der Tumorbologie die DNA ein Hauptziel ist, da DNA-Schäden nachweislich zu Krebs führen können (Halliwell and Auruoma 1993). Zudem gibt es Hinweise dafür, dass ROS in allen Stadien der Krebsentstehung beteiligt sind (Marnett 2000). Auf Grund der potentiell schädlichen Wirkung von ROS haben Zellen verschiedene Mechanismen entwickelt um ihren intrazellulären und extrazellulären ROS-Gehalt zu beeinflussen. So nutzen Hautzellen die Enzyme Kupfer-Zink Superoxiddismutase (SOD), Mangan-SOD und Katalase, sowie DNA-Reparaturmechanismen um oxidative Schäden der DNA zu beheben. Die SOD setzt

Superoxidione in Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) um, während die Katalase Wasserstoffperoxid umwandelt (Sasaki, Akamatsu et al. 1997; Leccia, Richard et al. 1998; Poswig, Wenk et al. 1999). Dadurch erhalten diese Enzyme die Redoxbalance in den Zellen aufrecht. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass UVA- und UVB-Bestrahlung *in vitro* menschliche Hautzellen und *in vivo* murine Hautzellen beeinflusst, indem antioxidative Enzyme wie Katalasen oder Superoxiddismutasen aktiviert werden (Shindo, Witt et al. 1993; Okada, Takahashi et al. 1994; Leccia, Yaar et al. 2001). Einige Studien untersuchten antioxidante Enzyme in Hauttumorzellen und zeigten eine Störung des Redoxstatus in diesen Zellen (Rabilloud, Asselineau et al. 1990; Lehtola, Laurikainen et al. 1995; Picardo, Grammatico et al. 1996). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass ein leichtes Ungleichgewicht zur Anhäufung karzinogener Stoffwechselprodukte führt, da die Redoxbalance in menschlichen Melanomen und nichtmalignen Hauttumoren gestört ist (Sander, Chang et al. 2004).

## 2. Oxidativer Stress und Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen, deren Hauptfunktion die Bereitstellung von Energie in Form von Adenosintriphosphat (ATP) durch die Atmungskette ist. Dabei sind die Mitochondrien die Organellen, in denen die meisten ROS im Organismus produziert werden (Richter 1995; Papa 1996; Kang and Hamasaki 2003). Unvollständig reduzierter Sauerstoff (Superoxidradikale:  $\text{O}_2^-$ ) kann durch die SOD anschließend zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgewandelt werden, was zur Freisetzung von Hydroxylradikalen ( $\bullet\text{OH}$ ) führt (Kang and Hamasaki 2003). Obwohl Hydroxylradikale eine sehr kurze Halbwertszeit haben, sind sie die aggressivste Form von ROS, die mit dem Deoxyribose-Phosphat-Rückgrat der DNA oder direkt mit den DNA-Basen reagieren können. Zusätzlich zu den endogenen ROS, repräsentieren Umweltfaktoren wie UV, ionisierende Strahlung und sichtbares Licht wichtige exogene Quellen von ROS, die auf die DNA des Zellkerns und der Mitochondrien wirken können. Die Mitochondrien-DNA (mtDNA) ist ein 16.559-Basenpaar (bp) großes, doppelsträngiges, zirkuläres Molekül. Da es keine schützenden Histone gibt, sind die Gene der mtDNA sehr anfällig für Mutationen. Die häufigste und am besten charakterisierte Mutation der mtDNA ist eine 4.977 bp große Deletion, die man „Common Deletion“ nennt. Sie wird mit dem allgemeinen Alterungsprozess, besonders UV-induzierte Alterung der Haut in Verbindung gebracht (Pang, Lee et al. 1994; Yang, Lee et al. 1994; Berneburg, Gattermann et al. 1997; Berneburg, Grether-Beck et al. 1999; Berneburg, Plettenberg et al. 2000). Die menschliche Haut ist vermutlich das Organ mit den meisten mtDNA-Schäden durch chronische UV-Belastung (Berneburg, Plettenberg et al. 2000; Koch, Wittern et al. 2001). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass UV-behandelte Fibroblasten Zeichen von vorzeitiger Alterung,

wie niedrigere Proliferationsfähigkeit und beschleunigte Telomerkürzungen aufweisen (Litwin 1972; Kawanishi and Oikawa 2004). UVA-induzierte ROS-Produktion ist dafür bekannt, im Prozess der Photoalterung involviert zu sein und kann die mitochondriale Common Deletion (CD) hervorrufen, so dass diese Mutation ebenso in der Photoalterung eine Rolle spielt (Berneburg, Grether-Beck et al. 1999; Scharffetter-Kochanek, Brenneisen et al. 2000). Das bedeutet, dass diese mtDNA-Mutation durch chronische UV-Bestrahlung der Haut erhöht wird und somit auch als Langzeitmarker für UV-Exposition der Haut für mehr als 1,5 Jahre dienen kann (Yang, Lee et al. 1994; Berneburg, Gattermann et al. 1997; Berneburg, Plettenberg et al. 2004). Obwohl schon seit 50 Jahren vermutet wird, dass Mitochondrien bei der Karzinogenese beteiligt sind (Warburg 1956), fehlt bisher ein direkter Hinweis für eine kausale Rolle der mtDNA bei diesem Prozess. Die meisten Daten zeigen zwar eine Assoziation von erhöhter mtDNA-Mutation verschiedener Tumore, es gibt aber nur wenige Hinweise für eine funktionale Rolle dieser Mutationen. Doch einige Publikationen zeigen eine positive Korrelation zwischen mitochondrialer ROS-Produktion und Tumordinvasion (Amuthan, Biswas et al. 2001). In nichtmalignen Hauttumoren wie Basalzellkarzinom und Epithelplattenkarzinom konnte kein Anstieg von mutierter mtDNA gefunden werden (Durham, Krishnan et al. 2003; Kamenisch, Wenz et al. 2007). Dies lässt sich dadurch erklären, dass Mutationen in Keratinozyten durch terminale Differenzierung der epidermalen Keratinozyten in Tumoren selektiert werden (Koch, Wittern et al. 2001; Berneburg, Plettenberg et al. 2004). Dagegen können mtDNA-Mutationen in Fibroblasten, die keinen solchen Selektionsdruck auf die mtDNA aufweisen, einige Monate *in vivo* verbleiben (Berneburg, Plettenberg et al. 2004). Da Melanozyten ebenfalls nicht stark proliferieren, ist eine Anhäufung von pro-oxidativen ROS in Melanozyten theoretisch auch möglich.

### 3. Tiermodelle in der Melanomforschung

Um die Daten aus *in vitro*- Experimenten auch *in vivo* nachvollziehen zu können, sind geeignete Tiermodelle erforderlich. Für Melanome wurden in der Vergangenheit schon verschiedene Tiermodelle beschrieben (Tab.B-2). So entwickelt beispielsweise das Sinclairschwein (<http://www.sinclairresearch.com>) spontan Melanome, die dem benignen Melanom des Menschen histopathologisch ähnlich sind. Aber so wie auch beim Camarguepferd, dessen benigne Melanome Ähnlichkeiten mit menschlichen malignen desmoplastischen Melanomen zeigt, entwickeln sie sich nicht unter UV-Bestrahlung (Fleury, Berard et al. 2000; Seltenhammer, Heere-Ress et al. 2004). Hingegen entwickelt die Angoraziege eine melanotische Präkanzerose ähnlich dem älteren Menschen als Antwort auf chronische Sonnenlichtexposition (McGovern, Mihm et al. 1973; Parsons and Musk 1982).

Geeigneter für Experimente sind jedoch Fische der Gattung *Xiphophorus* und die südamerikanische Beutelratte (*Monodelphis domestica*), die schon häufiger in der Forschung eingesetzt wurden. *Xiphophorus* entwickelt nicht nur spontan Melanome, sondern reagiert auch auf UV-Strahlung (Walter and Kazianis 2001). Des Weiteren kann eine Entwicklung der Krankheit vom Nevus bis zu Metastasen beobachtet werden. Doch unterscheidet sie sich stark vom Menschen, da sich die Melanome aus einer dermalen Melanophore entwickeln, die sich nicht mit dem menschlichen Melanozyten vergleichen lässt. Außerdem ist die Tumorphistologie sehr verschieden. Allerdings konnten mit Hilfe dieses Tiermodells homologe Gene identifiziert werden, die bei menschlichen Melanomen eine Rolle spielen. So z.B. die membrangebundene Rezeptortyrosinkinase (*Xmrk*), die dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor ähnelt und anormal im Fischmelanom exprimiert wird (Wellbrock, Gomez et al. 1997). Des Weiteren ist *Xiphophorus* für photobiologische Studien geeignet, die zeigen konnten, dass sowohl UVA als auch UVB Melanome verschlimmern können. Selbst sichtbares Licht zeigte mit der Effizienz von 10-30% des UVB einen Effekt (Setlow, Grist et al. 1993). Aber nur die Melanombildung als Antwort auf blaues Licht (405 nm) zeigte eine genetische Verbindung zum Homolog des *INK4 / ARF* (Cyclin-abhängige Kinase 4/ Adenosyl Ribosylierungsfaktor) (Nairn, Morizot et al. 1996). Dieses Homolog zum menschlichen Tumorsuppressor *INK4 / ARF* wurde in *Xiphophorus* gefunden (Kazianis, Coletta et al. 2000), wobei die große phylogenetische Distanz zwischen Fischen und Menschen keinen Vergleich von Melanomen in *Xiphophorus* und im Menschen erlaubt.

**Tab. B- 2:** Tiermodelle für kutane maligne Melanome (Berking 2005)

Spezies	Genetische Modifikation (Promotor/Gen)	Spontane Melanomentwicklung	Induktionsfaktor
Maus	WT	nein	DMBA
Meerschweinchen	WT	nein	DMBA
Syrischer Hamster	WT	ja	DMBA
Sinclair-Schwein	WT	ja	
Xiphophorus-Fisch	WT	ja	UVA
Südamerikanisches Beuteltier	WT	nein	UVA, UVB
Camargue-Pferd	WT	ja	
Angoraziege	WT	nein	UV
Maus-C57/BL7	Tyr-SV40 Tag	ja	
Maus-BALB/C	Mt1-Ret	ja	
Maus	Dct-Grm1	ja	
HGF/SF-Maus	Mt1-HGF	ja	UVB

Das erste Model für UV-induzierte Melanome war die südamerikanische Beutelratte *Monodelphis domestica*, bei der Melanome während einer chronischen UV-Bestrahlung induziert werden konnten und metastasierten (Kusewitt, Applegate et al. 1991). Die Tumore waren hierbei dermalen Ursprungs. Homologe zum Proto-Onkogen RAS (*Rat-sarcoma*), *INK4 /ARF* sowie *bFGF* (basischer Fibroblastenwachstumsfaktor) fanden sich in der Beutelratte (Sabourin, Freeman et al. 1992; Tafoya, Gale et al. 1997; Sherburn, Gale et al. 1998). Doch letztendlich eignet sich *Monodelphis domestica* nicht als Tiermodell für genetische und immunologische Untersuchungen, da es schwer zu züchten und zu halten ist.

Melanome konnten auch in Meerschweinchen und im syrischen Hamster beschrieben werden (Kusewitt and Ley 1996; Bardeesy, Wong et al. 2000). Diese Melanome konnten durch das chemische Karzinogen Dimethylbenz(a)anthrazen (DMBA) initiiert werden und bildeten auch Metastasen. Doch nur die Tumore des Meerschweinchens zeigten histopathologische Ähnlichkeiten zum menschlichen Melanom. Bei beiden Spezies konnten keine Melanome allein durch UV-Strahlung initiiert werden, wobei UV-Strahlung die Reaktion auf DMBA im Meerschweinchen verstärken konnte. DMBA kommt jedoch in der Natur nicht vor. Melanome in Mäusen zu induzieren gestaltet sich schwierig und sie zeigen zudem keine histopathologische Ähnlichkeit zum Menschen. Des Weiteren befinden sich die Melanozyten der Adulttiere in den Haarfollikeln. Nur in relativ haarlosen Regionen wie den Ohren und dem Schwanz, sind sie epidermal lokalisiert (Rosdahl and Szabo 1978). Die Mausmelanozyten sind sehr resistent gegenüber UV-Strahlung (Hirobe 1992). Ein Mausmodell, das eine Antwort auf UV-Strahlung zeigt, ist eine transgene Maus, bei der das SV40 T-Antigen unter der Kontrolle des Tyrosinasepromotors überexpressiert wird (Bradl, Klein-Szanto et al. 1991). Hohe Expression dieses Transgens führt zur schnellen Entwicklung von Melanomen, wogegen eine niedrige Expression zur Entwicklung des kutanen malignen Melanoms nach neonataler UV-Bestrahlung führt (Kelsall and Mintz 1998). Interessanterweise ist die Melanominduktion durch UV-Strahlung in Kombination mit chemischen Karzinogenen erfolgreicher als nur mit UV-Strahlung (Broome Powell, Gause et al. 1999; Strickland, Muller et al. 2000; Kligman and Elenitsas 2001). Um die Verbindung zwischen UV-Strahlung und der Rolle von Wachstumsfaktoren zu untersuchen, wurde menschliche Haut auf immundefiziente (SCID) Mäuse transplantiert und so ein Chimären-Modell entwickelt, dabei wurde *bFGF* mit UVB-Strahlung kombiniert und Melanozytenhyperplasien gefunden bis hin zu einem Fall von malignen Melanom (Berking and Herlyn 2001; Berking, Takemoto et al. 2001; Berking, Takemoto et al. 2002). In diesen Versuchen war die Haut von neugeborenen Mäusen empfindlicher als die Haut adulter Tiere, was sich mit der Epidemiologie beim Menschen vergleichen lässt. Ein besser geeignetes Modell ist allerdings eine transgene Maus, bei der der Hepatozytenwachstumsfaktor/ Scatterfaktor (HGF/SF) unter dem

Metallotionein (Mt1)-Gen-Promotor überexprimiert ist (Noonan, Otsuka et al. 2000). HGF/SF, der Ligand des Tyrosinkinase-Rezeptor c-Met ist ein multifunktionaler Regulator des Zellwachstums, der Zellbeweglichkeit und der Invasivität. Ein abweichender c-Met-Signalweg konnte mit menschlichen Krebserkrankungen, darunter auch Melanom, in Verbindung gebracht werden (Natali, Nicotra et al. 1993; Jeffers, Rong et al. 1996; Chin, Merlino et al. 1998). Dieses Modell hat mehrere Vorteile, so ist der Met-Signalweg in den HGF/SF-Mäusen chronisch aktiviert, was bei Menschen zum Melanom führt (Natali, Nicotra et al. 1993; Hendrix, Sefter et al. 1998). Des Weiteren sind die Melanozyten, so wie beim Menschen, außerhalb der Haarfollikel in der Epidermis lokalisiert (Otsuka, Takayama et al. 1998) und die Mäuse zeigen eine hohe UV-Empfindlichkeit. Die Melanome dieser Mäuse metastasieren und zeigen eine große Ähnlichkeit zum menschlichen Krebs. Aus diesen Gründen kann es als Tiermodell sehr nützlich sein um ein besseres Verständnis zu erhalten, wie UV-Strahlung das maligne Melanom im Menschen induzieren kann.

#### 4. Die UVB- Strahlung

Die spezifischen Wirkungen von UVB- und UVA-Strahlen auf das Melanomrisiko wird in der Forschung kontrovers diskutiert. Die meisten Studien konzentrieren sich auf UVB-Strahlen, wobei verschiedene Daten den Effekt von UVB auf die Entwicklung von Tumoren *in vitro* und *in vivo* zeigen konnten. So zeigte sich, dass Signaltransduktionswege in den Zellen beeinflusst werden, indem die mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) und die Transkriptionsfaktoren AP1 und NF $\kappa$ B aktiviert werden (Huang, Ma et al. 1997). Dabei wird die Proteinkinase C (PKC) in der Zellmembran ganz spezifisch durch ROS aktiviert. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass UV-Strahlen und ROS eine ligandenabhängige Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase (RTK) durch Autophosphorylierung hervorruft (Knebel, Rahmsdorf et al. 1996). In kultivierten Melanozyten erhöhte UVB die Expression der Tyrosinase durch Aktivierung von p38 des Transkriptionsfaktors Usf-1 (Galibert, Carreira et al. 2001). Ein wellenlängenabhängiger Effekt auf die MAPK-Antwort konnte in humanen T-Lymphomzellen nachgewiesen werden. Außerdem ging die Aktivierung von p38 und der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) mit einer UVB-Bestrahlung einher, während UVA die extrazelluläre signalabhängige Kinase (ERK) aktivierte (Kabuyama, Homma et al. 2001). Wobei diese Aktivierungen durch Antioxidantien unterdrückt werden konnte.

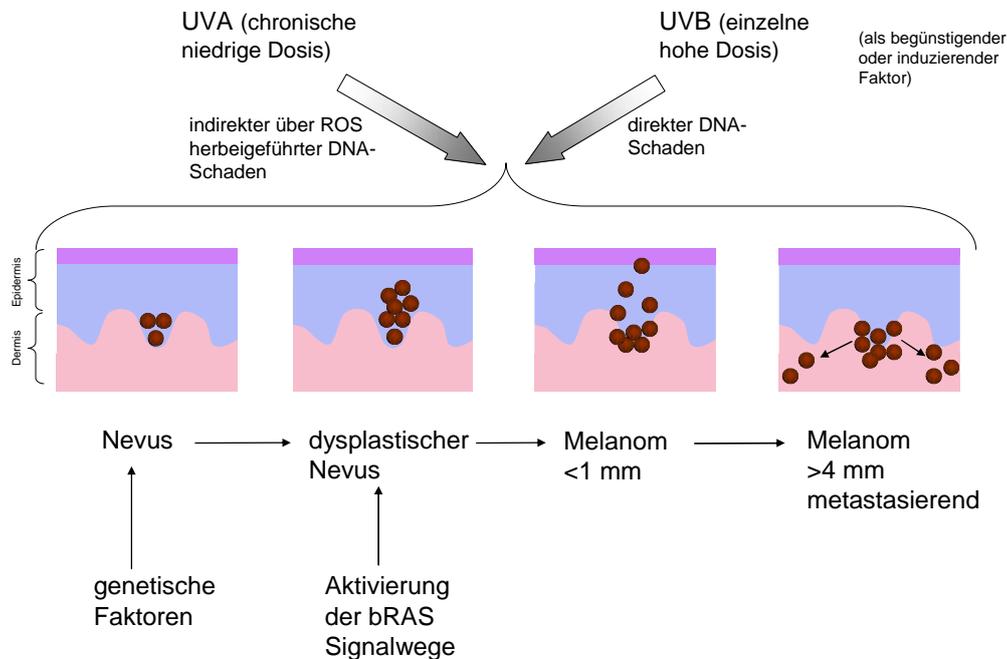
Eine chronische Bestrahlung mit UVB kann im Menschen melanozytische Läsionen, bis hin zu Melanomen hervorrufen (Atillasoy, Seykora et al. 1998). Die Melanozyten scheinen allerdings gegenüber physiologischen Dosen von UVB resistenter zu sein als Melanomzellen (Lai, Di Girolamo et al. 2007). Dabei scheint die Fähigkeit DNA-Schäden zu überstehen

einen relevanten Einfluss auf die Entwicklung von Melanozyten zum Melanom zu haben. Es konnte auch gezeigt werden, dass UVB in Kombination mit einer erhöhten Expression von verschiedenen Wachstumsfaktoren wie *bFGF*, Stammzellfaktor und Endothelin-3 an der malignen Transformation von Melanozyten beteiligt sein könnten (Berking, Takemoto et al. 2004). Eine klinische Studie allerdings konnte keinen Zusammenhang zwischen der UVB-induzierten Mutagensensibilität und Anfälligkeit am malignen Melanom zu erkranken, zeigen (Wang, Xiong et al. 2005). Studien mit der HGF/SF-Maus zeigten jedoch, dass es möglich ist Melanome durch eine einzelne UVB-Dosis zu induzieren (Noonan, Otsuka et al. 2000; Noonan, Recio et al. 2001; De Fabo, Noonan et al. 2004). Die Karzinogenese war altersabhängig, da die Melanome nur in neugeborenen Tieren initiiert werden konnte und nicht in Adulttieren. Diese Daten unterstützen epidemiologische Hinweise, wonach frühkindlicher Sonnenbrand ein signifikantes Risiko darstellt, während des Lebens maligne Melanome zu entwickeln. Die HGF/SF-Mäuse sind allerdings genetisch prädestiniert Melanome zu bekommen, was nicht allgemein auf Menschen zutrifft. Der Effekt von UVB wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gut untersucht und sein Einfluss auf die Entwicklung des malignen Melanoms ist allgemein anerkannt.

### 5. Die UVA- Strahlung

Im Gegensatz zur UVB-Strahlung, konnte die Rolle der UVA-Strahlung noch nicht ganz aufgeklärt werden. Ältere Studien schätzen die Bedeutung von UVA bei der Melanomentstehung höher ein. Die in diesen Studien benutzten Tiermodelle sind jedoch umstritten (Setlow, Grist et al. 1993; Ley 1997). Eine Studie bei HGF/SF-Albinomäusen zeigte keine Induktion von Melanomen durch eine einzelne hohe Dosis von UVA (Noonan, Recio et al. 2001). Des Weiteren konnte in einer kürzlich durchgeführten Studie in *Xiphophorus* Hybrid Fischmodell keine signifikante Induktion von Melanomen durch UVA gefunden werden (Mitchell, Fernandez et al. 2010). Doch erst kürzlich erschien eine Veröffentlichung, nach der pigmentierte neonatale HGF/SF-Mäuse durch eine einzelne physiologische Dosis von UVA Melanome entwickeln (Noonan, Zaidi et al. 2012). Die Induktion war jedoch geringer als nach UVB-Bestrahlung und scheint im Gegensatz zu UVB melaninabhängig zu sein. Es gibt weitere Hinweise, die einer Rolle von UVA bei der Pathogenese des malignen Melanoms große Bedeutung beimessen. Über 90% der UV-Emission des natürlichen Sonnenlichts, die die Erdoberfläche erreicht, ist UVA. Aber es wird nicht von Fensterglas absorbiert und kann auch Kleidung in größeren Mengen durchdringen als UVB (Parisi and Wong 2000). UVA besitzt eine längere Wellenlänge als UVB und ist in der Lage, tiefer in die Haut einzudringen und somit die Melanozyten zu erreichen.

Fibroblasten des chinesischen Hamsters zeigten nach Bestrahlung mit UVA bzw. UVB über mehrere Zellpassagen hinweg eine genomische Instabilität und verspätete Mutationen (Dahle and Kvam 2003). Dieser Effekt war nach UVA-Bestrahlung allerdings höher. In einem Review stellen Rünger und Kappes eine Hypothese auf, nach der UVA-induzierte DNA-Photoprodukte mutagener sind als durch UVB induzierte Photoprodukte, da die Reparaturantwort bei UVB effizienter sei (Runger and Kappes 2008). Demnach induziert UVA eine viel schwächere und kurzlebige p53-Aktivierung als UVB (Kappes, Luo et al. 2006). Diese weniger effiziente p53-Aktivierung macht es wahrscheinlicher, dass sich Mutationen anhäufen, da wenig Apoptose induziert wird. Des Weiteren konnte in einer anderen Studie in Melanozyten nach UV-Bestrahlung keine Erhöhung der p53-Expression oder irgendein Zeichen von Apoptose nachgewiesen werden (Rudolph, Tronnier et al. 1998). Es zeigte sich, dass UVA einen weniger effektiven inter-S-Phasenarrest in Mauskeratinozyten hervorruft als UVB (de Laat, Kroon et al. 1997). Ein weiteres *in vitro* Experiment zeigte, dass UVA eine Verspätung im Zellzyklus (G1 Arrest) bei menschlichen Melanozyten hervorruft (Kowalczuk, Priestner et al. 2006). Auf der anderen Seite konnte von van Schanke et al. keine umfangreiche Antwort von murinen Melanozyten auf UVA-Bestrahlung gefunden werden (van Schanke, Jongasma et al. 2005). Alle Daten entspringen Untersuchungen von epidermalen Melanozyten.



**Abb. B- 2: Die Rolle der UV-Strahlung bei der Melanogenese.** (von Thaler, Kamenisch et al. 2010)

Auch epidemiologische Daten geben einen Hinweis, dass UVA eine signifikante Rolle in der Induktion des Melanoms beim Menschen spielen könnte. So kann UVA vom Melanin der Melanozyten absorbiert werden und Melanome induzieren (Wenczl, Van der Schans et al. 1998). Afrikaner mit sehr dunkler Haut haben ein geringeres Risiko jede Art von Hautkrebs zu bekommen im Vergleich mit weißhäutigen Menschen. Allerdings gibt es bei ihnen mehr Fälle von malignen Melanom als von Epithelplattenkarzinom, während das Verhältnis bei weißhäutigen Menschen anders herum ist (Moan, Dahlback et al. 1999). Zusammen genommen geben diese Daten einen Hinweis für eine Rolle von UVA und UVB bei der Melanomentstehung (Abb. B- 2).

### **6. Der Warburg-Effekt**

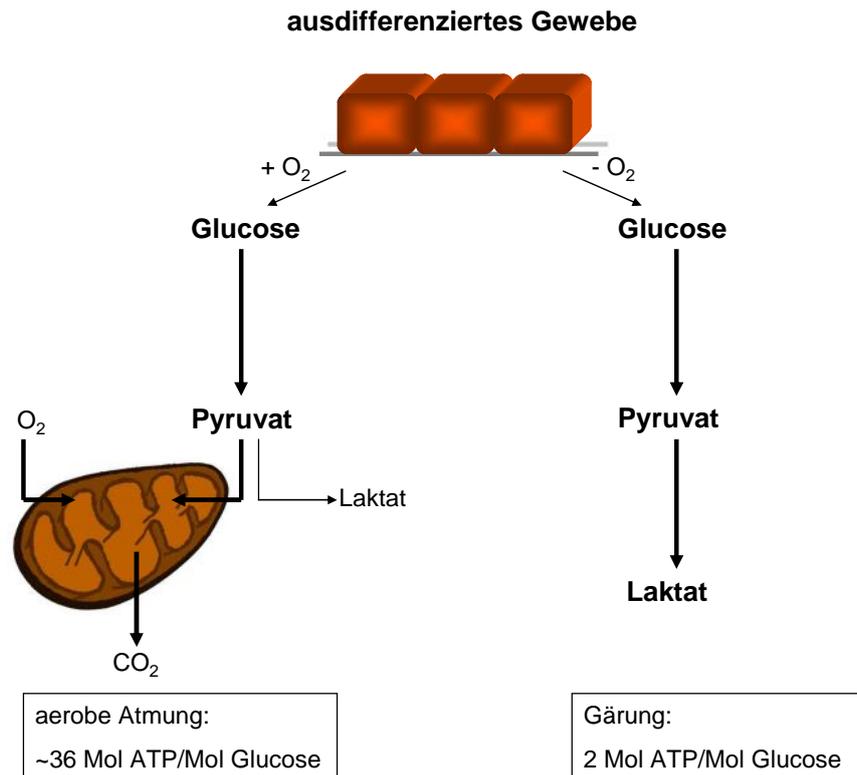
Otto Warburg (1883-1970) war ein deutscher Biochemiker, Arzt und Physiologe, der 1931 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin für „die Entdeckung der Natur und der Funktion des Atmungsferments“ erhielt. Warburg konzentrierte sich in seinen Forschungen auf die Glykolyse und zeigte bei all seinen untersuchten Tumorzellen eine Laktatproduktion aus Glucose auch unter aeroben Bedingungen (Warburg 1956). Dieser Effekt wurde später als der Warburg-Effekt bekannt (Racker 1972). Erst in den letzten Jahrzehnten des 20. Jahrhunderts gewannen Warburgs Arbeiten wieder mehr an Bedeutung als eine Verbindung zwischen Krebs und Stoffwechselprozesse hergestellt wurde.

#### ***6.1 Der Glucose-Stoffwechsel in gesunden ausdifferenzierten Zellen***

Unter aeroben Bedingungen sind die meisten tierischen Zellen in der Lage verschiedene Arten von Nahrungsstoffen, wie Lipide, Aminosäuren und Kohlenhydrate durch oxidative Prozesse vollständig abzubauen (Veratmung). Glucose wird im Cytoplasma durch die Glykolyse in Pyruvat umgewandelt, welches in der Mitochondrien-Matrix über den Citrat-Zyklus vollständig zu  $\text{CO}_2$  (Kohlendioxid) oxidiert wird. Die dabei gewonnenen Reduktionsäquivalente  $\text{NADH}+\text{H}^+$  (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid) können über die Atmungskette auf Sauerstoff übertragen werden, wobei chemische Energie in Form von ATP (Adenosin-triphosphat) entsteht (Koolman and Röhm 1998). Auf diese Weise gewinnt die Zelle für ein Mol Glucose ca. 36 Mol ATP.

In Abwesenheit von Sauerstoff fehlt der Elektronenakzeptor für die Atmungskette, so dass  $\text{NADH}+\text{H}^+$  nicht mehr reoxidiert werden kann. Die mitochondriale ATP-Synthese und fast der gesamte Stoffwechsel der Mitochondrien-Matrix kommen somit zum Erliegen. Da unter

anaeroben Bedingungen weder Fett- noch Aminosäure-Abbau zur Energiegewinnung beitragen kann, ist die Zelle allein auf die ATP-Bildung durch den Abbau von Glucose über die Glykolyse angewiesen. Um  $\text{NADH}+\text{H}^+$  zu reoxidieren, reduzieren Zellen in diesem Fall das Pyruvat zu Laktat und geben dieses an das Blut ab. Die ATP-Ausbeute bei diesen Gärungsprozessen ist mit 2 Mol ATP pro 1 Mol Glucose gering (Abb. B-3). Laktat wird beim Menschen in den Erythrocyten und unter Sauerstoff-Mangel im Muskel gebildet (Koolman and Röhm 1998)



**Abb. B- 3: Schematische Darstellung der Verstoffwechslung von Glucose in normalen Gewebe unter Anwesenheit und Abwesenheit von Sauerstoff (nach Vander Heiden, Cantley et al. 2009)**

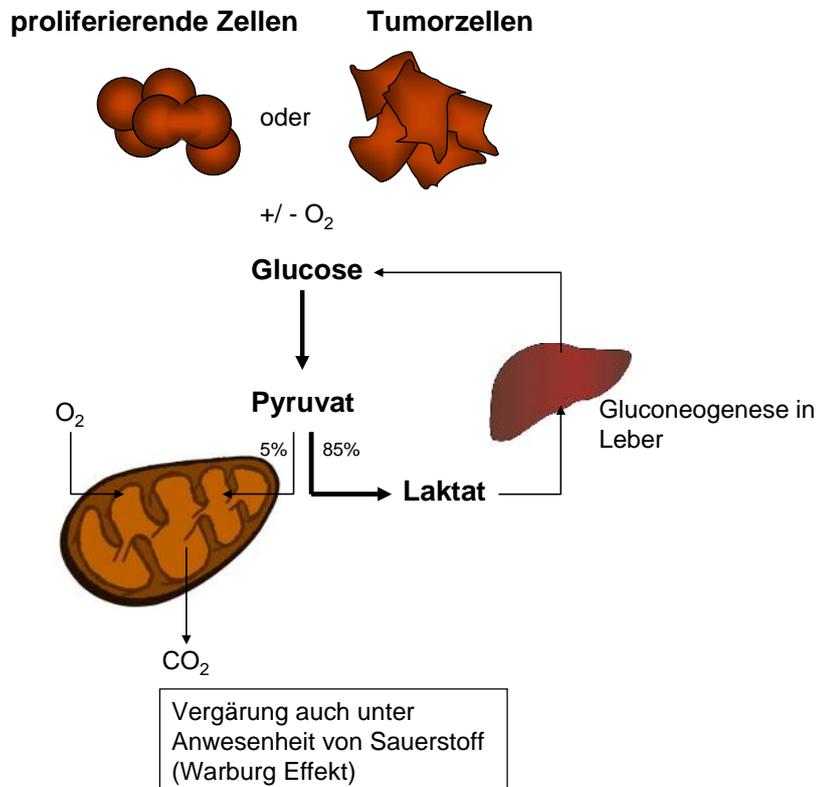
## 6.2 Der Glucose-Stoffwechsel von Tumorzellen

Warburg fand heraus, dass Tumorzellen auch in Anwesenheit von genügend Sauerstoff zu Milchsäuregärung neigen (Warburg 1956). Das entstehende Laktat wird in die Blutbahn abgegeben und steht nun für die Gluconeogenese zur Verfügung. Ein Prozess, bei dem das Laktat unter Energieverbrauch in Glucose umgewandelt wird (Abb. B-4). Dies geschieht überwiegend in der Leber und somit steht diese Glucose dem Körper wieder für eine Verstoffwechslung zur Verfügung. Auf diese Weise bekommt Gewebe, wie zum Beispiel das Gehirn oder Erythrocyten auch bei Mangelerscheinung die für sie notwendige Glucose (Koolman and Röhm 1998).

Es stellt sich die Frage warum Krebszellen die Gärung vorziehen, obwohl die Energiebilanz wesentlich ungünstiger ist. Warburg selbst vermutete, dass die Atmung in Krebszellen geschädigt sei (Warburg 1956). Einige Arbeiten zeigen allerdings in den meisten Krebszellen keinen Defekt der mitochondriellen Funktionen (Weinhouse 1976; Fantin, St-Pierre et al. 2006; Moreno-Sanchez, Rodriguez-Enriquez et al. 2007). In der gleichen Zeit, in der normale Zellen 36 mol ATP aus 1 mol Glucose produzieren, erhalten Krebszellen aus 13 mol Glucose 56 mol ATP (Murphy and Hawkins 1925). Tumorzellen verbrauchen 70 mg Glucose und geben 46 mg Laktat pro 100 ml Blut ab (Warburg, Wind et al. 1927). Dies bedeutet eine 10% ATP-Produktionssteigerung im Vergleich zu normalen Zellen. Neuste Studien in menschlichen Glioblastom-Zellen zeigen eine ähnliche Erhöhung der ATP-Produktion von 13% (Elstrom, Bauer et al. 2004). Diese Fakten zeigen, dass Tumorzellen durch den Warburg-Effekt viel schneller an die benötigte Energie gelangen als normale Zellen. Unabhängig davon wie sehr Tumorzellen zur Teilung stimuliert werden, zeigen Zellen durch den Warburg-Effekt ein sehr hohes ATP/ADP- und NADH/NAD<sup>+</sup>-Verhältnis (Christofk, Vander Heiden et al. 2008; DeBerardinis, Lum et al. 2008), so dass ATP in diesen Zellen kein limitierender Faktor ist. In normalen proliferierenden Zellen dagegen kann eine leichte Störung im ATP/ADP-Verhältnis das Wachstum schon vermindern. Zudem gehen Zellen, die unter ATP-Mangel leiden, meist in Apoptose (Vander Heiden, Chandel et al. 1999; Izyumov, Avetisyan et al. 2004) oder sie gehen in den Zellarrest und leiten ihren Katabolismus ein, wenn die Möglichkeit ATP aus Glucose zu produzieren, beeinträchtigt ist (Lum, Bauer et al. 2005). Außerdem können proliferierende Zellen nicht ihre gesamte Glucose über die oxidative Phosphorylierung zu CO<sub>2</sub> abbauen. Für das Wachstum und die Teilung einer Zelle werden Nucleotide, Aminosäuren und Lipide benötigt, so dass Glucose sowohl für die ATP-Produktion als auch für die Produktion von Biomasse wichtig ist. Einige Glucose-Moleküle müssen in makromolekulare Vorstufen für Fettsäuren, Aminosäuren oder Nucleotide umgewandelt werden. Eine Studie an Glioblastom-Zellen konnte zeigen, dass 90% der aufgenommenen Glucose und 60% des aufgenommenen Glutamins in Laktat oder Alanin umgewandelt werden (DeBerardinis, Mancuso et al. 2007). Zwar wird ein großer Teil davon aus der Zelle ausgeschieden, allerdings entsteht bei diesem Prozess das für den Anabolismus wichtige Reduktionsmittel NADPH.

Wie oben erwähnt kann das dabei entstehende überschüssige Laktat über die Gluconeogenese in der Leber wieder in Glucose umgewandelt werden. Überschüssiges Alanin aus dem Glutamin-Abbau kann über Transaminierung zu Pyruvat abgebaut und damit wiederverwendet werden (Koolman and Röhm 1998). Diese Möglichkeit der organischen Resteverwertung während der hohen Proliferationsrate von Tumorzellen entlasten somit die Energiereserven des gesamten Organismus (Vander Heiden, Cantley et al. 2009). So gibt es zusätzlich Hinweise, dass der Stoffwechsel innerhalb eines Tumors heterogen sein kann.

Manche Zellen benutzen dabei den durch den Warburg-Effekt der anderen Zellen entstehenden hohen Laktat-Gehalt für die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien (Sonveaux, Vegran et al. 2008).

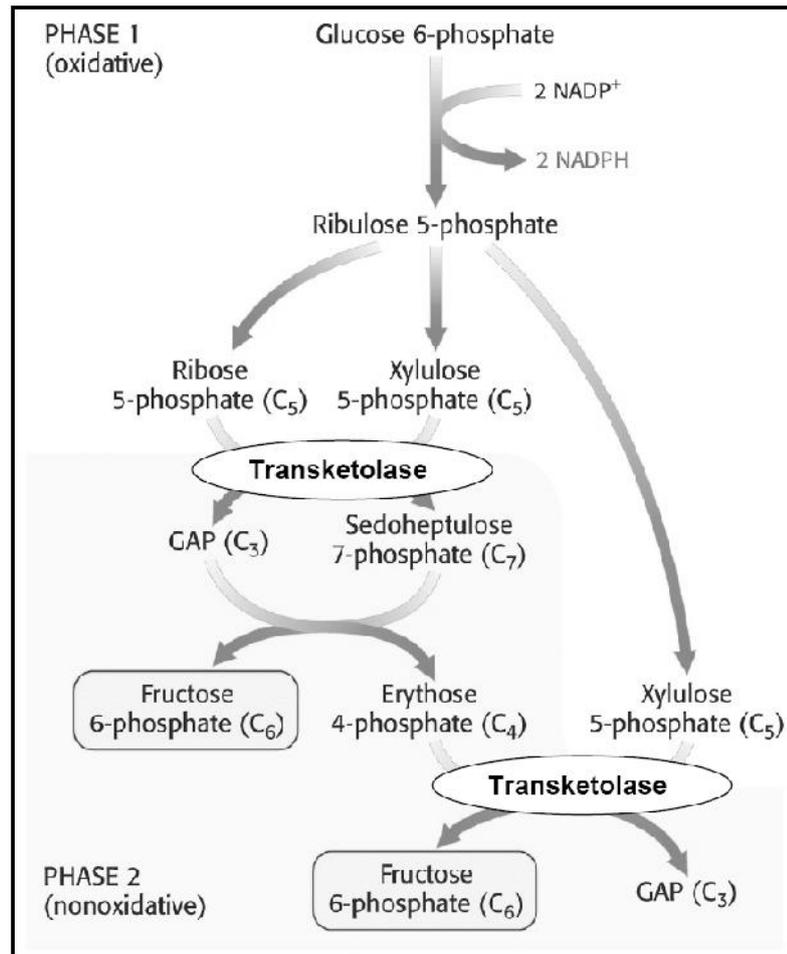


**Abb. B- 4: Schematische Darstellung des Warburg Effekts. Glucose wird sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Sauerstoff zum großen Teil zu Laktat vergärt (nach Vander Heiden, Cantley et al. 2009).**

## 7. Die Rolle der Transketolase-like-1 bei Tumoren

Die Transketolase-like-1 (TKTL-1) ist eine Isoform des Enzyms Transketolase (Schenk, Duggleby et al. 1998), das eine wichtige Bedeutung im Pentosephosphat-Weg hat (Berthon, Kuchel et al. 1992). Dort überträgt die Transketolase eine Ketolgruppe von Xylulose-5-phosphat auf Ribose-5-phosphat (Abb. B-5). Zusammen mit der Transaldolase verbindet dieses Enzym die Glykolyse mit dem Pentosephosphat-Weg. Dieser oxidative Stoffwechselweg, der auch unter der Bezeichnung Hexose-monophosphat-Weg in der Literatur zu finden ist, findet im Cytoplasma statt und geht wie die Glykolyse von Glucose-6-phosphat aus (Abb. B-5). Er liefert zwei wichtige Vorstufen für anabole Prozesse:

NADPH+H<sup>+</sup>, welches für die Biosynthese von Fettsäuren und Isoprenoide benötigt wird und Ribose-5-phosphat, welches eine Vorstufe der Nucleotid-Biosynthese ist (Koolman and Röhm 1998). Zellen können über Zwischenstufen ungenutztes Ribose-5-Phosphat zu Fruktose und Glycerinaldehyd-3-Phosphat umwandeln, wodurch wiederum Energie über die Glykolyse bereitgestellt werden kann. Umgekehrt können Zwischenprodukte der Glykolyse für die Nucleotid-Biosynthese genutzt werden, wenn es nötig ist. Ein essentieller Cofaktor der Transketolase ist Thiaminpyrophosphat (Vitamin B<sub>1</sub>) (Schenk, Duggleby et al. 1998).



**Abb. B- 5: Schema zum Pentosephosphatweg.** Er besteht aus einer oxidativen Phase (Phase 1), in der aus Glucose-6-Phosphat Ribulose-5-Phosphat gebildet wird und dem nicht-oxidativen Teil des (Phase 2), in dem aus Ribulose-5-Phosphat durch TKT- und Transaldolase-Reaktionen Fruktose-6-P und GAP entsteht. Diese dienen der Synthese von Glucose und Pyruvat, welches zu Laktat reduziert werden kann. Die enzymatischen Reaktionen in Phase 2 sind reversibel (Bau 2006)

Transketolasen kommen sowohl in Bakterien als auch Pflanzen und Tieren vor. In Säugetieren entwickelten sich mehrere Isoformen, wobei im Menschen die Transketolase-like-1 und Transketolase-like-2 eine Transketolase-Aktivität besitzen (Koolman and Röhm 1998). Die Wichtigkeit der Transketolase im Wachstum maligner Tumoren wird in der Literatur teilweise widersprüchlich behandelt. So wurde in einer Publikation aus dem Jahre

1976 kein Unterschied in der Transketolase-Aktivität von subcutan implantierten Leberkrebszellen in Ratten und nicht-malignen Leberzellen von Ratten gefunden (Heinrich, Morris et al. 1976). Im selben Jahr konnte gezeigt werden, dass eine starke Thiamin-Defizienz keinen negativen Einfluss auf den Energie-Metabolismus von C6 Gliomazellen ausübt (Schwartz and McCandless 1976). Diese Daten stehen allerdings im Widerspruch zu einer späteren Veröffentlichung, in der eine 90%ige Inhibition der Proliferation von Ehrlich-Ascites-Tumorzellen *in vivo* durch den Transketolase-Inhibitor Oxythiamin erreicht werden konnte (Boros, Puigjaner et al. 1997).

Untersuchungen über das Vorhandensein von Isoformen der Transketolase wurden früh für *E. coli* und *Saccharomyces cerevisiae* veröffentlicht (Iida, Teshiba et al. 1993; Schaaff-Gerstenschlager, Mannhaupt et al. 1993). Erst 1996 wurde von der Gruppe um Coy ein Gen beschrieben, dass mit der Transketolase bei Menschen in Verbindung gebracht wurde (Coy, Dubel et al. 1996). Einige Jahre später stellte Coy eine Hypothese vor. Demnach gibt es ein Isoenzym der Transketolase in Menschen, die Transketolase-like 1 (TKTL-1) (Coy, Dressler et al. 2005). Man fand eine hohe Expression der TKTL-1 im Hoden, Retina und im Thymus. Alle anderen analysierten Gewebeproben weisen allerdings nur eine geringe Expression verglichen mit der Transketolase auf. In diesem Zusammenhang vermutete Coy, dass der TKTL-1 eine wesentliche Funktion des Warburg-Effekts (siehe Abschnitt B.6) zukommt. Demzufolge ist die Energiegewinnung von Krebszellen stark vom TKTL-1 vermittelten Glucoseabbau zu Laktat abhängig. Diese Art von Glucoseabbau ist möglich, da es Unterschiede in der enzymatischen Funktion der TKTL-1 verglichen mit der Transketolase gibt (Coy, Dressler et al. 2005). Daraufhin erschienen eine Reihe von Veröffentlichungen, die eine wesentliche Rolle der TKTL-1 bei der Pathophysiologie und Progression von malignen Tumoren andeuten. So ist laut einiger klinischer Studien eine Überexpression der TKTL-1 mit einer schlechten Prognose für Krebspatienten verbunden (Langbein, Zerilli et al. 2006; Volker, Scheich et al. 2007; Langbein, Frederiks et al. 2008; Zerilli, Amato et al. 2008). Des Weiteren gibt es experimentelle Daten, die in klinischen Studien eine pathophysiologische Grundlage für die TKTL-1 Aggressivität zeigen (Hu, Yang et al. 2007; Zhang, Yang et al. 2007; Frohlich, Fink et al. 2009). Allerdings konnte in Dickdarmkrebszellen nur in einer von fünf Proben eine erhöhte TKTL-1 Expression gefunden werden und nur in jeweils zwei von fünf Lungenkrebs- bzw. Magenkrebsproben (Langbein, Zerilli et al. 2006). Außerdem konnte keine erhöhte Expression der Transketolase in den untersuchten Proben gefunden werden verglichen mit den entsprechenden gesunden Gewebe. Eine erhöhte Expression der TKTL-1 wurde allerdings in anderen Krebszellen nachgewiesen, so bei Brustkrebs (Foldi, Stickeler et al. 2007), im kleinzelligen Bronchialkarzinom (Schultz, Kahler et al. 2008), Nasopharynxkarzinom (Zhang, Yue et al. 2008) sowie bei Granulosazelltumoren (Schmidt, Kammerer et al. 2008). Dagegen konnte Mayer *et al.* in 6 verschiedenen Krebszelllinien

keine signifikante Expression von TKTL-1 finden weder unter normaler Sauerstoffversorgung noch unter Hypoxie-Bedingungen (Mayer, Von Wallbrunn et al. 2010).

Eine erhöhte TKTL-1 Expression zeigte einen stark negativen Effekt auf die Prognose des Patienten bei urothelialen Karzinom und Dickdarmkrebs, wobei die Patientengruppe relativ klein war (Langbein, Zerilli et al. 2006). Weitere Publikationen konnten nachweisen, dass die TKTL-1 Expression mit dem Tumorgrad korreliert und bei höherer Invasivität zunimmt, so bei Adenokarzinom des Magens (Staiger, Coy et al. 2006), Glioblastom (Volker, Hagemann et al. 2008), bei einer Anaplasie von Nephroblastomen (Wu, Allie et al. 2009) und bei hochgradig intraepithelialen Läsionen von Plattenepithelkarzinomen des Zervix (Kohrenhagen, Voelker et al. 2008). Allerdings konnte der Mechanismus, wie eine Überexpression von TKTL-1 in der Progression von malignen Zellen eine Rolle spielt, noch nicht geklärt werden (Mayer, von Wallbrunn et al. 2011). In einer Publikation von Tong et al. wird darüber spekuliert, dass der Hypoxie-induzierbare Faktor 1 (HIF-1 ) in der Hochregulierung der Transketolase beteiligt sein könnte um eine HIF-1 -vermittelte Inhibition des oxidativen Teils des Pentosephosphatsweges zu kompensieren (Tong, Zhao et al. 2009).

## C. Material und Methoden

### 1. Geräte

**Tab. C-1:** Geräte und deren Hersteller

Gerät	Modell	Firma
Atmungselektrode	Oxygraph	Hansatech, Norfolk
Brutschrank	Heracell 240	Thermo/Kendro, Dreieich/Hanau
Brutschrank Hypoxie	APT.line CB-CO <sub>2</sub> Inkubator mit O <sub>2</sub> -Regelung	Binder, Tuttlingen
Drehteller	KDE 015 gebaut vom Hausmeisterdienst	MTE, Weinstadt-Endersbach / UKT, Tübingen
Gelelektrophorese-Apparatur	Protean II, Modell 45-2020i	BioRad, München
ELISA Reader	Multiscan Ex	Thermo, Waltham
Fluoreszenzreader	Tristar LB 941/	Berthold Technology, Bad Wildbad/
Geldokumentation, UV-Transilluminator	RH-5.1 darkroom hood , easy 442K Kamera	Herolab, Wiesloch
Heizblock	Thermomixer Model Comfort LS2	Eppendorf, Hamburg
Mikroskope	Axiovert25 Invers, Axiovert200 Fluorescence, HBO100	Zeiss, Jena
PCR-Maschine	Primus 96 plus	MWG Biotech, Ebersberg
pH-Meter	CG842	Schott, Wertheim
Photometer	BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Research, Reference	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Pipette boy	Hirschmann, Eberstadt
Real Time PCR-Maschine	LightCycler®480/iCycler	Roche, Mannheim/ BioRad, München
Sterilbank	Hera Safe KS 18	Heraeus, Frotzcher
UVA-Lampe	Sellasol 1200	Sellas, Gevelsberg
Vortexer	Reax Top	Heidolph, Kelheim
Wasserbad	WB22 Funke	Medingen, Freital
Zentrifuge	Biofuge pico, Biofuge fresco/ Heraeus, Multifuge 3S-R	Thermo Waltham/ Dreieich, Hanau

## 2. Materialien

### 2.1 Kits

**Tab. C-2:** verwendete Kits

Kits	Hersteller
BCA Protein-Assay	Pierce, Rockford
DNA-Mini Kit	QIAGEN, Hilden
GO Glucose Assay Kit	Sigma, Deisenhofen
iScript cDNA Synthesis-Kit	BioRad, München
JC-1 Mitochondrial Membrane Potential Detection Kit	BD, Heidelberg
Lactate Reagent Kit	Trinity Biotech, Wicklow
Nucleo Spin RNA Kit	Macherey-Nagel, Düren
QCMEC Matrix 24 well flourimetric	Millipore, Billerica
Sso Fast EvaGreen Supermix	BioRad, München
SybrGreen Supermix	BioRad, München

### 2.2 Enzyme

**Tab. C-3:** verwendete Enzyme

Enzym	Bezugsquelle
4-Methylumbelliferyl -D-galactopyranoside (MUG)	Sigma, Deisenhofen
DNaseI	Sigma, Deisenhofen
Taq-DNA-Polymerase	QIAGEN, Hilden

### 2.3 Primer

**Tab. C-4:** verwendete Primer

Primer	Sequenz (5'-3' Richtung)
-Actin sense	AGC CTC GCC TTT GCC GAT CC
-Actin antisense	ACA TGC CGG AGC CGT TGT CG
CD sense (Koch, Wittern et al. 2001)	ACC CCC ATA CTC CTT ACA CTA TTC C
CD antisense (Koch, Wittern et al. 2001)	AAG GTA TTC CTG CTA ATG CTA GGC T
GAPDH sense	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC

GAPDH antisense	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA
IS sense (Koch, Wittern et al. 2001)	GAT TTG GGT ACC ACC CAA GTA TTG
IS antisense (Koch, Wittern et al. 2001)	AAT ATT CAT GGT GGC TGG CAG TA
TKTL-1 sense	GTC CAC GGT GCT CTG CGG TT
TKTL-1 antisense	TCC CAG CCC GGG AAG AAT CCA

## 2.4 Antikörper

**Tab C-5:** verwendete Antikörper

Antikörper	Bezugsquelle
Transketolase-like1	Abcam, Cambridge
DyLight 488 Anti-Mouse IgG	Jackson Immuno Research, Suffolk

## 2.5 Puffer

### 2.5.1 Gelelektrophorese

#### TAE-Puffer

40	mM	Tris-HCl
2	mM	EDTA
10	mM	NaAc
		pH 8,0

#### Ladepuffer

50	%	Glycerin
50	%	TAE-Puffer
0,2	%	Bromphenolblau

### 2.5.2 Zellisolation

#### Lösung A

30	mM	Hepes
10	mM	Glucose
3	mM	KCl
130	mM	NaCl
1	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
		pH 7,4

10 ml FCS Lösung zugeben, steril filtrieren, lagerbar bei -20°C für mehrere Monate

### Lysepuffer B

30	mM	Hepes
4	mM	Glucose
3	mM	KCl
130	mM	NaCl
1	mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
0,25	%	Trypsin

10 ml FCS Lösung zugeben, steril filtrieren, lagerbar bei -20°C für mehrere Monate

### 2.5.3 Zellkultur

#### Melanom-Einfriermedium

60	%	FCS
10	%	DMSO
30	%	DMEM

#### Melanozyten-Einfriermedium

92,5	%	FCS
7,5	%	DMSO

### 2.5.4 Transketolase

#### Lysepuffer

40	mM	Citrat
40	mM	Natriumphosphat
0,5	mM	Benzamidin
0,25	mM	Phenylmethanesulfonyl Xuorid
		pH 6

#### Reaktionslösung

120	µl	Lithium-Hydroxypyruvat (250 mM)
60	µl	Thiaminpyruphosphat (24 mM)
60	µl	MgCl <sub>2</sub> (90 mM)
360	µl	Gly-Gly (50 mM)
10	µl	177 ng/ml Thiamin

### 2.5.5 Atmungsmessung

#### Atmungsmedium

0,5	g	Natriumpyruvat
0,5	g	Glutamin

50 ml DMEM

### 2.5.6 Seneszenz

#### Lysepuffer

5 mM CHAPS  
 40 mM Zitronensäure  
 40 mM Natriumphosphat  
 0,5 mM Benzamidin  
 0,25 mM PMSF  
 pH 6,0

#### 2x Reaktionspuffer

40 mM Zitronensäure  
 40 mM Natriumphosphat  
 300 mM NaCl  
 10 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
 4 mM  $MgCl_2$   
 pH 6,0

## 2.6 Chemikalien

**Tab. C-6:** verwendete Chemikalien

Chemikalien und Materialien	Bezugsquelle
Acrylamid/ Bisacrylamid (30%/ 0,8%)	Roth, Karlsruhe
Agarose	Roth, Karlsruhe
Albumin Bovine	Sigma, Deisenhofen
Coffein	Sigma, Deisenhofen
3-Cholamidopropyl-dimethylammonio-1-propansulfonat (CHAPS)	Sigma, Deisenhofen
D (-) Mannitol	Roth, Karlsruhe
D (+) Sucrose	Fluka, Buchs
DAPI	Invitrogen, Darmstadt
DermaLife Basal Medium und Life Factors Kit	CellSystem, Troisdorf

## C. Material und Methoden

dNTP Set, PCR Grade	QIAGEN, Hilden
Diglycine (Gly-Gly)	Fluka, Buchs
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Fluka, Buchs
Dithionit	Fluka, Buchs
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), high / low Glucose	PAA, Pasching
Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Pasching
Eselserum	Jackson Immuno Research, Suffolk
Ethylen- diamin- tetra Essigsäure (EDTA)	Roth, Karlsruhe
Ethanol 100%	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo, Waltham
Formaldehyd	Roth, Karlsruhe
GelRed	Biotium, Hayward
Glycin	Roth, Karlsruhe
Größenstandard, 100 bp Plus DNA-Leiter	Fermentas, St. Leon Rot
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Roth, Karlsruhe
Kaliumhydroxid	Sigma, Deisenhofen
L (+) Laktat	Sigma, Deisenhofen
Lithium-Hydroxypyruvat	Sigma, Deisenhofen
Methanol	VWR, Darmstadt
Magnesiumchlorid ( $\text{MgCl}_2$ )	Fluka, Buchs
Milchpulver	DM, Karlsruhe
Natriumacetat (NaAc)	Fluka, Buchs
Natriumcarbonat	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt

## C. Material und Methoden

Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Natriumphosphate	Sigma, Deisenhofen
Natriumpyruvat	Fluka, Buchs
Natriumdodecylsulfat	Fluka, Buchs
Oxythiaminchlorid	Sigma, Deisenhofen
PCR-Puffer (10x)	QIAGEN, Hilden
Phenylmethanesulfonyl-Fluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Poly-L-Lysin	Sigma, Deisenhofen
Propanol	Merck, Darmstadt
Propionaldehyd	Fluka, Buchs
Resin Beads (Tetraalkylammonium carbonate)	Sigma, Deisenhofen
SDS Pellets	Roth, Karlsruhe
Sonnenschutz Anthelios XL 50+	Roche, Asnieres-Cedex
Streptomycin/ Amphotericin B	Invitrogen, Darmstadt
Thiamin	Sigma, Deisenhofen
Thiaminpyruvophosphat	Sigma, Deisenhofen
Triphenyltetrazoliumchlorid/ Tetrazolium Rot	Sigma, Deisenhofen
Tris	Sigma, Deisenhofen
TritonX100	Roth, Karlsruhe
Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure)	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Biochrom, Berlin
Trypsin	Invitrogen, Darmstadt/ Promocell, Troisdorf
Trypsin-Neutralisierungslösung (TNS)	Promocell, Troisdorf
Trolox	Sigma, Deisenhofen
Tween 20	Roth, Karlsruhe
Vitamin C Pulver	DM, Karlsruhe

**2.7 Gebrauchswaren**

**Tab. C-7:** benutzte Gebrauchswaren und deren Hersteller

Material	Firma
6-well-Platten	Greiner, Frickenhausen
24-well-Platten	Greiner, Frickenhausen
96-well-Platten	Greiner, Frickenhausen
96-well PCR Platten	Peqlab, Erlangen
Falcons	Greiner, Frickenhausen
Filtertips 0,5-10 µl	Greiner, Frickenhausen
Freezing Container „Mr Frosty“	Thermo, Waltham
Gewebekulturschale 10 cm	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturschale 20 cm	Greiner, Frickenhausen
Glaswaren	Schott AG, Mainz
Kryoröhrchen	Greiner, Frickenhausen
Küvetten	Ratiolab GmbH, Dreieich-Buchsschlag
Objektträger SuperFrost Plus	R. Langenbrink, Emmendingen
PCR Reaktionsgefäße	Biozym, Hessisch Oldendorf
Plastikpipetten (5ml, 10ml)	Costar, Fernwald
Plastikwaren für Zentrifugen, PCR	BD Bioscience, Heidelberg
Reaktionsgefäße (1ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritzen	Greiner, Frickenhausen
Sterilfilter (0,22 µm)	Millipore, Billerica
T 75 Kulturflaschen	Greiner, Frickenhausen
Zählkammer Neubauer	Hecht, Sondheim/ Rhön

### 3. Zelllinien

**Tab. C-8:** Zelllinien, deren Eigenschaften und Herkunft

Melanomzelllinien	Wachstumsphase	Herkunft
WM 35	radiäre Wachstumsphase	AG Schittek, Hautklinik, Tübingen
WM 1552c	radiäre Wachstumsphase	Zentrum für Medizinische Forschung (ZMF), Tübingen
WM 3211	radiäre Wachstumsphase	Zentrum für Medizinische Forschung (ZMF), Tübingen
WM 115	vertikale Wachstumsphase	Prof. David Melton, Cancer Research Center, Edinburgh
WM 793	vertikale Wachstumsphase	AG Schittek, Hautklinik, Tübingen
WM 1205	metastasierend	AG Schittek, Hautklinik, Tübingen
WM 451 LU	metastasierend	AG Schittek, Hautklinik, Tübingen
WM 266-4	metastasierend	AG Bauer; Hautklinik, Tübingen

### 4. Zellkultur

#### 4.1 Anzucht und Kulturbedingungen

##### 4.1.1 Kultivierung von Melanomzellen

Für die Anzucht und Kultivierung von Melanomzelllinien wurde DMEM-Medium benutzt, das mit 10% FCS und 1% Streptomycin/ Amphotericin B komplementiert wurde.

Melanomzellen sind adhärent wachsende Zellen. Sie wurden in Gewebekulturflaschen, in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C kultiviert. Die Atmosphäre im Brutschrank war wasserdampf-gesättigt und mit 5 % CO<sub>2</sub> angereichert. Das Medium wurde alle 2-3 Tage erneuert.

Während der Bestrahlungsexperimente wurden einige Zellen in einem Hypoxie-Brutschrank kultiviert, die Temperatur betrug auch hier 37°C. Die wasserdampf-gesättigte Atmosphäre des Hypoxie-Brutschrankes wurde auf 5 % CO<sub>2</sub> und 1 % O<sub>2</sub> eingestellt.

Zur Passagierung wurden die Zellen bei einer Zelldichte von 60-80 % einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 3 ml vorgewärmte Trypsin-Lösung auf die Zellen gegeben diese für 5 min inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurde 3 ml DMEM auf die Zellen gegeben. Durch den hohen Proteingehalt des FCS im Medium wurde das Fortschreiten der Proteolyse durch das Trypsin verhindert. Dabei wurden mit Hilfe der Pipette noch verbleibende Zellen vom Flaschenboden abgespült. 3 ml der Zellsuspension wurden auf eine neue Flasche gegeben und beide Flaschen jeweils mit DMEM aufgefüllt und in den Brutschrank gestellt.

### 4.1.2 Kultivierung von Melanozyten

Melanozyten sind relativ empfindliche Zellen, sie sind adhären wachsend und wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C kultiviert. Die Atmosphäre war wasserdampf-gesättigt und mit 5 % CO<sub>2</sub> angereichert. Kultiviert wurden die Melanozyten in DermaLife Basal Medium, welches mit für Melanozyten optimierten Wachstumsfaktoren komplementiert wurde. Auf Antibiotika wurde verzichtet, da die Melanozyten dies nicht gut vertragen. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel. Dabei wurde immer nur so viel Medium vorgewärmt, wie man benötigte um das Medium vor häufigen Temperaturschwankungen zu schützen. Passagiert wurden die Zellen sobald sie zu 80-90 % konfluent waren. Dabei wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 2-3 ml vorgewärmte Trypsin-Lösung auf die Zellen gegeben und 2-3 min inkubiert. Dies erfolgte unter Beobachtung unter dem Mikroskop. Die Trypsin-Lösung wurde durch eine Neutralisierungs-Lösung neutralisiert und anschließend wurden die Zellen 5 min bei 600 Umdrehungen pro Minute (UpM) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit etwas Melanozytenmedium aufgenommen. Dies konnte nun auf die Flaschen aufgeteilt werden, in denen schon warmes Medium vorgelegt worden war und anschließend wurden die Flaschen in den Brutschrank gestellt. Melanozyten erreichen unter optimalen Bedingungen bis zu 15 Passagen sie haben eine relativ lange Verdopplungszeit von ca. 60 h und sollten in einer Dichte von 5000 Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät werden.

### 4.1.3 Beschichten von Kulturflaschen mit Poly-L-Lysin

Zellen können in einer Poly-L-Lysin beschichteten Flasche kultiviert werden. Das Polymer hilft den Zellen beim Anheften und Wachsen.

- 50 ml steriles H<sub>2</sub>O zu 5 mg Poly-L-Lysin geben, mischen und steril filtrieren (Arbeitskonzentration von 0,1 mg/ml)
- Flasche oder Petrischale mit 0,5-1 ml auf 25 cm<sup>2</sup> bedecken, leicht schwenken und 5 min bei RT inkubieren
- alles abnehmen (kann wiederverwendet werden)
- Gefäß mit sterilem H<sub>2</sub>O oder PBS waschen und mindestens 2 h trocknen lassen
- sowohl die Gefäße als auch die Lösung können bei 4°C gelagert werden

### 4.1.4 Zellzahlbestimmung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer

In der Mitte der Glasplatte der Zählkammer befindet sich die Zählfläche mit einem Liniennetz. Ein Deckglas wird auf die seitlich daneben befindlichen Auflagen gelegt, die um einen genau

bekanntem Betrag (0,1 mm) gegenüber der Zählfläche erhöht sind. Dadurch wird ein Raum mit definierter Höhe geschaffen. Die auszuzählende Teilchensuspension wird bei aufgelegtem Deckglas seitlich aufpipettiert und saugt sich durch Kapillarkraft in diesen Zwischenraum. Nach Auszählung der auf den Zählfeldern liegenden Teilchen unter dem Lichtmikroskop lässt sich deren Anzahl pro Volumeneinheit errechnen

- 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau mischen und in Zählkammer geben
- 4 große Quadrate auszählen und den Mittelwert bilden
- mit dem Kammerfaktor 10 000 multiplizieren (=Zellen/ml) und anschließend die Trypanblau-Verdünnung einberechnen
- um auf die Gesamtzellzahl zu kommen, muss das Ergebnis mit dem Gesamtvolumen multipliziert werden
- mit Hilfe des Dreisatzes kann man nun die Zellzahldichte einstellen

### 4.1.5 UVA-Bestrahlung von Zellen

Die UVA-Bestrahlung wurde jeweils drei Mal am Tag 1-3 Wochen lang bei 6 J/cm<sup>2</sup> durchgeführt. Dies entspricht der Frequenz wie sie zur Induktion von ROS und Mutationen der mtDNA bei Fibroblasten etabliert wurden. Wenn nicht anders angegeben, wurden die Melanomzellen während eines Bestrahlungsexperiments in Petrischalen in 15 cm Durchmesser und DMEM mit 4,5 g/l Glucose (high glucose media) kultiviert. Die Bestrahlung selbst erfolgte in PBS um Veränderungen des Mediums durch UVA zu vermeiden. Die UVA Lampe muss regelmäßig neu ausgemessen werden um die exakten Bestrahlungszeiten für 6 J/cm<sup>2</sup> zu berechnen. Die Petrischalen wurden unter der UVA Lampe auf einem Drehteller gestellt um zu gewährleisten, dass alle Schalen an jeder Stelle gleichmäßig bestrahlt werden. Zwischen den einzelnen Bestrahlungen lagen jeweils mindestens 3 Stunden um eine ausreichend hohe Erholungsphase der Zellen zu gewährleisten. Die Kontrollen wurden ebenfalls aus dem Brutschrank genommen, wurden aber nicht bestrahlt.

- Medium abnehmen und in einem sterilen Falcon aufbewahren
- PBS in die Petrischale geben
- die Petrischale so lange unter die UVA Lampe stellen bis eine Bestrahlungsdosis von 6 J/cm<sup>2</sup> erreicht ist
- PBS unter der Sterilbank aus den Petrischalen absaugen, das Medium wieder auf die Zellen geben und die Petrischalen in den Brutschrank zurück stellen

### 4.1.6 Behandlung von Zellen während der UVA-Bestrahlung

Zellen, die als Kontrollgruppe mit Zusätzen, wie Trolox oder Oxythiamin behandelt werden sollten, wurden wie oben beschrieben auf Petrischalen ausgesät. Der Zusatz wurde in folgenden Konzentrationen das Medium zugegeben, in dem die Zellen während des Bestrahlungsexperiments kultiviert wurden. Trolox wurde in der Endkonzentration 20  $\mu$ M eingesetzt und Oxythiamin in der Endkonzentration 15 mM.

### **4.2 Kryokonservierung**

Konfluente Zellen wurden wie in Kapitel 4.1.1/ 4.1.2 beschrieben mit Trypsin abgelöst. Die Trypsinierung wurde mit DMEM gestoppt, anschließend wurden die Zellen bei 1500 UpM für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1 ml Einfriermedium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein 1 ml Einfrierröhrchen überführt und für 24 Stunden in einem Freezing Container bei -80 °C gelagert. Anschließend wurden die Röhrchen zur endgültigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Im Gegensatz zum Einfrieren sollte das Auftauen von Zellen zügig erfolgen. Die Zellen wurden daher in der Hand aufgetaut und in eine Gewebekulturflasche mit vorgewärmten DMEM überführt. Anschließend wurden sie im Brutschrank inkubiert. Nach einem Tage erfolgte ein Mediumwechsel.

### **4.3 Isolation von Melanozyten**

- Hautbiopsie (Vorhaut, Burow-Dreieck) wird direkt nach der Operation in einem sterilen Falcon mit PBS und Antibiotika/ Antimykotika überführt
- die Haut sollte innerhalb von 24 Stunden bei adulter Haut und 48 Stunden bei neonataler Haut präpariert werden
- dazu die Haut 30 s in 70 %igen Ethanol waschen, anschließend in PBS legen
- von Fett und Blutgefäßen befreien und in kleine Stücke schneiden
- Diese in vorgeritzte 6-well-Platten mit Epidermis nach unten verteilen und antrocknen lassen
- In jedes Well ca. 2 ml Lysepuffer B geben
- 18-20 Stunden bei 4°C inkubieren
- Die Epidermis von der restlichen Haut abtrennen
- Epidermis in ca. 7 ml Lösung A 60x resuspendieren um Melanozyten vom Zellverband zu lösen und 5 min lang bei 1500 UpM zentrifugieren

- Überstand absaugen das Pellet in Melanozytenmedium aufnehmen und auf die 6-well- Platte verteilen
- im Brutschrank inkubieren, nach 2 Tagen Mediumwechsel vornehmen

## 5. Molekularbiologische Methoden

### 5.1 DNA Isolation

Die DNA wurde nach Protokoll des Herstellers für das DNA Mini Kit von Quiagen durchgeführt. Die zu untersuchenden Zellen wurden geerntet und 5 min bei 1500 UpM pelletiert. Das Pellet wurde mit dem Lysepuffer aus dem Kit aufgenommen. Die DNA wurde in 200 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> (doppelt destilliertes Wasser) eluiert. Um die Common Deletion zu messen, wurde die PCR zügig nach der Isolation durchgeführt, da diese nicht sehr lang stabil bleibt.

### 5.2 RNA Isolation

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den Zellproben wurde mit Hilfe des NucleoSpin® RNA II-Kits von Machery-Nagel nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die geernteten Zellen wurden pelletiert und bis zur RNA-Isolation in 300 µl R1-Lysepuffer des Kits bei -20°C eingefroren. Alle Arbeitsschritte fanden bei Raumtemperatur statt. Die RNA wurde in einem Volumen von 30 µl aus der Säule eluiert. Zur Bestimmung der RNA-Konzentration und der Reinheit der RNA wurde 1 µl der RNA-Probe in 70 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> verdünnt und mit dem Photometer die Extinktion gemessen. Dabei dienten 70 µl H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> als Leerwert zur Eichung des Photometers. Die RNA-Konzentration wurde mit der Photometer-Software berechnet, wobei die Extinktion der Nukleinsäuren bei 260 nm Wellenlänge und bei 280 nm die Extinktion für Proteine bestimmt wurden. Aus den Einzelwerten der optischen Dichten (OD) ließ sich die Konzentration der RNA berechnen. Eine optische Dichte von 1 entsprach 40 µg/ml RNA, so dass folgende Formel zur Berechnung der RNA-Konzentration gilt:

$$\frac{OD_{260} \times 40}{\text{Verdünnung}} = \text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g/ml}]$$

Als Maß für die Reinheit der RNA-Präparation wurde der Quotient aus Nukleinsäuren- und Proteinextinktion (OD-Ratio) gebildet. Ratios von 1,8 bis 2,0 wiesen auf hochreine DNA- bzw. RNA-Präparationen hin. Da das Absorptionsmaximum für Proteine bei 280 nm liegt, verringert Proteinverunreinigungen die Ratio.

### 5.3 cDNA Synthese mittels RT-PCR

Um die mRNA in cDNA (complementary DNA) umzuschreiben wird die Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR) angewendet. Zur Initiation der DNA-Synthese wurden Oligo-d(T)-Primer verwendet, die komplementär zum Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA sind. Dies ermöglicht der RNA-abhängigen Polymerase (*M-MLV*-Reverse Transkriptase aus *Moloney Murine Leukemia Virus*) an diesem Punkt anzusetzen und von dort die RNA in DNA umzuschreiben. Hierzu stehen dem Enzym die im Reaktionsansatz vorhandenen Trinukleotide (dNTPs) zur Verfügung. Dabei wurde das iScript Synthesis Kit nach Protokoll des Herstellers benutzt. In folgender Tabelle finden sich die einzelnen PCR Schritte.

**Tab. C-9:** PCR Programm der RT-PCR

Schritt	Temperatur [°C]	Zeit
1	25	5 min
2	42	30 min
3	85	5 min
4	4	halten

### 5.4 PCR

Die PCR (polymerase chain reaction) ist eine Methode, die es ermöglicht, definierte DNA-Bereiche enzymatisch zu amplifizieren. Es können verschiedene Polymerasen genutzt werden, die je nach Anforderung variiert werden können. Das Resultat der PCR lässt sich über die Gelelektrophorese nachweisen. Ausgewertet wurde die PCR, indem die Intensität der Banden im Agarosegel mit Hilfe eines Graphikprogramms ermittelt wurde. Die Intensitäten wurden auf die Intensitäten der Housekeeping-Banden normiert.

#### 5.2.1 PCR- Ansatz

**Tab.C-10:** PCR-Ansatz

Ansatz für Mykoplasmentest	
Template- DNA	2 µl
Primer forward	1 µl
Primer reverse	1 µl
<i>Taq</i> -Puffer (10x)	2,5 µl
dNTPs	1 µl
<i>Taq</i> -Polymerase	0,2 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	15,8 µl

### 5.2.2 PCR-Programm

Das Programm wurde auf die Hybridisierungstemperatur des Primerpaars und die Elongationszeit für die gewünschte Fragmentlänge optimiert.

**Tab. C-11:** Programm für Mykoplasmentest

Schritt	Reaktion	Temperatur [°C]	Zeit
1	Denaturierung	94	2 min
2	Denaturierung	94	30 s
3	Annealing	55	30 s
4	Polymerisierung	72	30 s
5	40x Schritt 2-4		
6	Polymerisierung	72	3 min

### 5.5 Real Time PCR

Die Real Time PCR ist eine Methode zur Quantifizierung von DNA (Livak and Schmittgen 2001; Radonic, Thulke et al. 2004). Um eine zuverlässige Quantifizierung vornehmen zu können, wurde in dieser Arbeit das Prinzip der relativen Quantifizierung mit externen Standards verwendet. Dabei wird die Amplifikation der Ziel-DNA zur Amplifikation einer Referenz-DNA (Housekeeping) normalisiert. Dazu werden beide DNA-Proben parallel erfasst und die ermittelten Werte des relativ zueinander angegeben. Die Real Time PCR wurde in vorliegender Arbeit angewendet um die Expression der *TKTL-1* zu ermitteln, dabei wurde als Housekeeping-Gen  *$\beta$ -Aktin* verwendet, das einen stabilen Expressionslevel zeigt. Zusätzlich wurde die Real Time PCR zur Detektion der mitochondrialen Common Deletion benutzt, wobei hier ein DNA Stück der Mitochondrien, an dem normalerweise keine Deletion auftritt (IS) als Housekeeping diente (Berneburg, Grether-Beck et al. 1999; Koch, Wittern et al. 2001). Die unterschiedliche Menge an Common Deletion wurde mit Hilfe des CT-Wertes angegeben (Livak and Schmittgen 2001). Wichtig bei diesem Verfahren ist eine gleiche Effizienz der beiden beteiligten PCR-Reaktionen (Ziel-DNA/ Referenz-DNA). Die CT-Werte werden hierbei einfach voneinander abgezogen ( $\Delta CT$ ), die beiden CT-Werte der einzelnen Gruppen (z. B. bestrahlt/ unbestrahlt) voneinander abgezogen ( $\Delta\Delta CT$ -Wert) und in die Gleichung  $n$ -fache Menge Common Deletion (bestrahlte Gruppe zu unbestrahlte Gruppe) =  $2^{-\Delta\Delta CT}$  eingesetzt. Bei dieser Berechnungsmethode wird allerdings eine Verdopplung der DNA Menge in jedem Zyklus vorausgesetzt, bei der die Primereffizienz bei 2 liegt. Um die genaue Effizienz (E) der verwendeten Primer einzubeziehen wurde das effizienzkorrigierte relative Quantifizierungsmodell entwickelt (Pfaffl 2001).

$$\text{Ratio} = \frac{E_{(TKTL-1)}^{\text{CT TKTL-1 (bestrahlt-unbestrahlt)}}}{E_{(\beta\text{-Aktin})}^{\text{CT } \beta\text{-Aktin (bestrahlt-unbestrahlt)}}$$

Diese Methode kommt bei den Expressionsanalysen der *TKTL-1* zum Einsatz, wobei die Effizienzen von *TKTL-1* und *β-Aktin* zuvor anhand einer Eichkurve ermittelt worden waren.

### 5.3.1 Real Time PCR Ansätze

**Tab. C-12:** Real Time PCR Ansätze

Ansatz für Common Deletion		Ansatz für TKTL-1 Expression	
Template- DNA	5 µl	cDNA	1 µl
Primer forward	0,75 µl	Primer forward	1 µl
Primer reverse	0,75 µl	Primer reverse	1 µl
SybrGreen	12,5 µl	EvaGreen	5 µl
H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	11 µl	H <sub>2</sub> O <sub>bidest</sub>	2 µl

### 5.3.2 Real Time PCR Programme

**Tab. C-13:** Real Time PCR Programm für Common Deletion (iCycler)

Reaktion	Temperatur [°C]	Zeit
Denaturierung	95	3 min
Amplifizierung, 40 Zyklen	95	15 s
	58	20 s
	72	20 s
Schmelzkurve	55	10 s
Kühlung	15	30 min

**Tab. C-14:** Real Timer PCR Programm für TKTL-1 Expression (LightCycler)

Reaktion	Temperatur [°C]	Zeit	Heizrate [°C/s]
Denaturierung	95	5 min	4,4
Amplifizierung, 45 Zyklen	95	10 s	4,4
	58	10 s	2,2
	72	20 s	4,4
Schmelzkurve	95	10 s	4,4
	65	1 min	2,2
	95	Äquilibration: 10 s /°C, kontinuierlich	
Kühlung	37	10 s	1,5

### 5.6 Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese kann DNA aus einer PCR oder DNA-Isolierung analysiert werden. Wegen seines negativ geladenen Phosphatrestes kann die DNA elektrophoretisch aufgetrennt werden. Die Wandergeschwindigkeit eines DNA-Moleküls ist abhängig von seiner Größe, Konformation und der Agarosekonzentration. Die Proben werden vor dem Auftragen mit einem Ladepuffer versetzt. Dadurch wird die Dichte der DNA-Lösung erhöht und die Probe kann in die Geltaschen absinken. Der Farbstoff Bromphenolblau dient als Indikator und zeigt die zurückgelegte Laufstrecke im elektrischen Feld an. Mit Hilfe eines fluoreszierender Farbstoff, der sich Ladepuffer befindet, können die DNA-Moleküle im UV-Strahlung eines Transsilluminators bei 312 nm als fluoreszierende Banden sichtbar gemacht und fotografiert werden.

#### Herstellung und Lauf des Agarosegels

- 2,0 % Agarose in TAE-Elektrophoresepuffer unter ständigen Rühren aufkochen
- unter Rühren auf etwa 60°C abkühlen lassen
- Agarose in eine Gelkammer gießen und den Gelkamm einsetzen
- Gel etwa 15 min fest werden lassen
- mit TAE-Puffer überschichten und den Kamm vorsichtig entfernen
- die mit dem Ladepuffer versetzten DNA-Proben in die Geltaschen laden
- das Gel bei 80 – 100 V ungefähr 30 min lang laufen lassen
- Gel fotografieren

### **Längenbestimmung von DNA-Molekülen**

Die Wandergeschwindigkeit linearer DNA ist im elektrischen Feld umgekehrt proportional dem Logarithmus ihres Molekulargewichts in einem bestimmten Molekülgrößenbereichs. So kann die Größe unbekannter DNA-Fragmente durch Vergleich eines definierten Längenmarkers ermittelt werden.

## **6. Stoffwechseluntersuchungen**

### **6.1 Glucose-Messung in Zellkulturmedium**

Der Glucose-Verbrauch wird berechnet durch die Differenz von eingesetzter Glucose im Medium und der Glucosegehalt im Medium nach der Bestrahlung. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die Zellen während des ganzen Experiments ungefähr gleich viel Medium zur Verfügung haben. Es wurde für jede Petrischale dokumentiert wie viel Medium im Laufe der Bestrahlungswoche hinzugegeben wurde um dies bei der endgültigen Berechnung zu berücksichtigen.

- Zellen 1 Woche bestrahlen
- nach der Bestrahlung ca. 1 ml Medium abnehmen
- Medium verdünnen: bei Low Glucose Medium (1g/l) muss 1:10 verdünnt werden; bei High Glucose Medium (4,5g/l) muss 1:100 verdünnt werden
- Leerwert: 100 µl reines verdünntes Medium  
Standart: 95 µl H<sub>2</sub>O und 5 µl Glucosestandart (1 mg/ml)  
Proben: 100 µl verdünnter Überstand
- die Reaktion und anschließende Messung nach Protokoll des Glucose-Kits durchführen
- bei der Berechnung müssen die Verdünnung, sowie die Menge der zugegebenen Glucose berücksichtigt werden

### **6.2 Laktat-Messung in Zellkulturmedium**

Um die Menge des gebildeten Laktat durch die UVA-bestrahlten Zellen herauszufinden, wurde die Differenz ermittelt vom Laktatgehalt im Medium zu Beginn des Experiments und am Ende des Experiments. Es ist dabei zu beachten, nur hitzeinaktiviertes FCS für die Komplementation des Mediums zu benutzen, damit die Laktatdehydrogenase die Ergebnisse nicht verfälscht.

- Zellen in Platten bestrahlen und ca 1 ml Überstand abnehmen
- zu 200 µl Laktatreagenz 2 µl Überstand auf die Proben geben

- 2 µl Standart [40 mg/dl] zu 200 µl Laktatreagenz geben
- die Messung wie im Protokoll des Laktat-Kits beschrieben durchführen

### **6.3 Transketolase-Aktivität (modifiziert nach Smith, Kaulmann et al. 2006)**

Dieser Assay wurde an die Bedürfnisse des Bestrahlungsexperiments angepasst. Es wurde die allgemeine Transketolase-Aktivität gemessen. Als Positivkontrolle wurde statt des Zelllysats eine aus Bäckerhefe isolierte Transketolase eingesetzt (Tikhomirova and Kochetov 1990). Diese Transketolase konnte über mehrere Monate bei -70°C gelagert werden und blieb aktiv.

- Zellen ernten und 5 min bei 1200 UpM zentrifugieren
- Pellet in 30 µl Lysepuffer aufnehmen
- 30 µl der Reaktionslösung mit 30 µl des Zelllysats und 30 µl Gly-Gly (50mM) mischen
- 20 µl Propionaldehyd (50 mM) hinzugeben und 24 h bei RT inkubieren
- 45 µl des Reaktionsansatzes 1:1 mit Gly-Gly (50 mM) mischen
- 10 mg resin beads (Tetraalkylammonium carbonate) hinzugeben und 24 h bei RT inkubieren
- den Überstand ohne beads abnehmen und mit 50 µl Gly-Gly (50mM) verdünnen
- 20 µl Tetrazoliumrot-Lösung (0,2% in Methanol gelöst) hinzugeben
- 10 µl einer 3 M NaOH (Natronlauge)-Lösung hinzugeben und gut mischen
- nach 2 min OD-Messung bei 485 nm

### **6.4 Immunofärbung von Transketolase-like 1**

Das Vorhandensein des Protein TKTL-1 wurde durch eine Immunofärbung nachgewiesen, wobei UVA-bestrahlte Zellen und unbestrahlte Zellen im Vergleich getestet wurden.

- Zellen auf Super-Frost (Poly-L-Lysin) Objektträger in einer Petrischale wachsen lassen und 1 Woche bestrahlen
- Objektträger aus Petrischale nehmen und 2 x mit PBS waschen
- mit einem Fettstift den Rand des Objektträgers markieren (als Alternative Vaseline nehmen)
- 10 min in 3% Formaldehyd in PBS auf Eis inkubieren
- 5 min waschen mit PBS bei RT
- 2 min Methanol bei -20°C
- 5 min waschen PBS bei RT
- 10 min Permeabilisierung in 0,25% TritonX100 in PBS 10 min in Feuchtkammer

- 30 min Blockieren in 5% Eseserum in PBS+0,25%TritonX100 in Feuchtkammer
- 100 µl primärer Antikörper (auf 5 µg/ml in Triton +1% Eseserum verdünnen) in Feuchtkammer 1 h inkubieren
- 3x Waschen in PBS+0,25%TritonX100 +1% Eseserum
- sekundäre Antikörper Dylight 488 antimouse 1:500 in PBS+0,25% TritonX100 in Feuchtkammer 1,5 h inkubieren
- 2x Waschen mit PBS + 0,25% TritonX100
- Zellkernfärbung DAPI (300 nM Endkonzentration) 5 min inkubieren, danach 5 min waschen
- Eindeckeln in Dako Cytomation Fluoreszenzeindeckelmedium
- Lagerung bei 4°C bis zur Dokumentation mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops

### **6.5 Atmungsmessung**

Die Atmungsmessung ist die Messung des Sauerstoffverbrauchs von Zellen in Flüssigkeiten mit Hilfe eines Oxygraphen. Die Probe wird in eine innere Kammer gegeben, die luftdicht abgeschlossen werden kann. Die Temperatur wird während der Messung konstant auf 37°C gehalten, indem warmes Wasser über ein Wasserbad in die äußere Kammer gleitet wird. Das Wasser umspült somit die innere Kammer und hält dort die Temperatur konstant. Das Kernstück des Oxygraphen bilden zwei polarographische Sauerstoffsensoren, die aus einer Platin-Kathode und einer Silber-Anode bestehen. Beide Elektroden sind von einer gesättigten Kaliumchloridlösung umgeben. Der gesamte Sensoraufbau ist mit einer dünnen, sauerstoffdurchlässigen Teflonmembran ummantelt, wodurch der in der Probe enthaltene Sauerstoff diffundieren kann und von der Kathode reduziert wird. Der dabei gemessene Stromfluss ist der Sauerstoffkonzentration in der Messprobe direkt proportional. Durch kontinuierliches Rühren während der Messung mittels eines elektromagnetischen Rührers wird eine optimale Durchmischung gewährleistet und damit eine Sauerstoffverarmung in der Nähe der Kathode vermieden. Die Eichung der Sensoren erfolgte mittels einer Zwei-Punkt-Kalibrierung durch Messung des belüfteten Atmungsmediums einerseits und durch Messung nach Zugabe von Dithionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) andererseits. Die Konzentration des im belüfteten Medium gelösten Sauerstoffes beträgt bei einer Temperatur von 37 °C und einem Luftdruck von 95 kPa 200 nmol/ml Medium. Durch Dithionit wird sämtlicher Sauerstoff chemisch verbraucht, so dass die Sauerstoffkonzentration nach Zugabe von Dithionit praktisch dem Nullwert entspricht.

- Vorbereitung und Kalibrierung der Sauerstoffelektrode nach Herstellerangabe
- Zellen trypsinieren, pelletieren und Pellet in 1 ml Atmungsmedium aufnehmen

- um Zellen zu zählen 10 µl der Probe aufheben
- Probe in gut ausgespülte innere Messkammer geben
- mit Stöpsel verschließen und Programm starten
- Programm so lange laufen lassen bis Atmungsrate ca. bei 0 liegt
- Programm stoppen und Daten speichern
- Probe heraus pipettieren und Kammer mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub> und Ethanol ausspülen
- Elektrode ist damit bereit für die nächste Messung

### 7. Invasionsassay

Der Invasionsassay wurde mit Hilfe von Boyden Chambers durchgeführt. Dazu wurden die Zellen eine Woche lang in Petrischalen mit UVA bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Zellsuspension auf 0,5-1 Million Zellen/ml eingestellt und die Boyden Chambers damit beladen. Gemessen wurden die Zellen, die durch die Matrix der Boyden Chamber gewandert sind. Die weitere Durchführung und anschließende Messung wurde nach Protokoll des Zellinvasions-Kit QCM von Millipore durchgeführt. Die Matrix besteht aus Kollagen I, Kollagen IV und Laminin (Terranova, Hujanen et al. 1986; Albini, Iwamoto et al. 1987).

### 8. Seneszenz (nach Gary and Kindell 2005)

In diesem Assay wird die Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galactosidase gemessen. Dabei wurde die Hydrolyse von MUG in das fluoreszierende 4-Methylumbelliferon (4-MU) detektiert.

- Zellen nach der Bestrahlung ernten und pelletieren
- Pellet in 200 µl 1x Lysepuffer aufnehmen
- Proben 3x in flüssigen Stickstoff tauchen und erwärmen um die Zellen zu lysieren
- bei 1200 UpM für 5 min zentrifugieren und Überstand weiter verwenden
- 150 µl Überstand und 150 µl 2x Reaktionspuffer, der 1:20 mit MUG verdünnt ist, zugeben
- Inkubation bei 37°C für 3-4 h
- Reaktion stoppen: 400 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> auf 100 µl Probe zugeben
- Am Fluoreszenzreader je 200 µl Probe messen (Excitation 355 nm; Emission 460 nm)

## 9. Hautäquivalenzmodell

Ein dreidimensionales humanes Hautäquivalenzmodell kommt der natürlichen Haut mit ihrem zweischichtigen Aufbau sehr nahe. Die Dermis des Konstrukts wird aus dermalen Fibroblasten aufgebaut. Diese sind eingebettet in eine Biomatrix aus gewebetypischen Matrixproteinen und bilden die Unterlage für darauf ausgesäte epidermale Keratinozyten und Melanozyten bzw. Melanomzellen. Mit Hilfe des Äquivalenzmodells ist es möglich eine Brücke zu schlagen zwischen *in-vitro* Versuchen mit humanen Zellen und *in-vivo* Versuchen mit Mäusen. Es gibt die Möglichkeit Versuche durchzuführen, die sonst nicht mit menschlichen Probanden durchgeführt werden könnten. Das hier benutzte Hautkonstrukt wurde freundlicherweise durch Tobias Sinnberg von der Arbeitsgruppe Schittek und Evelyn Maczey von der Arbeitsgruppe Meier bereitgestellt. Es enthielt entweder Melanozyten oder Melanomzellen. Die Konstrukte wurden mit UVA für eine Woche drei Mal täglich bestrahlt. Als Sonnenschutz wurde der UVA- und UVB-Filter Drometrizole Trisiloxane (Mexoryl XL) mit einem Lichtschutzfaktor von 50+ verwendet. Die geschied gemäß COLIPA-Norm (Comité de Liaison des Associations Européennes de L'Industrie de la Parfumerie, des Produits Cosmétiques et de Toilette), nach der 2 mg Sonnenschutzmittel auf einer Fläche von 1 cm<sup>2</sup> Sonnenschutzmittel aufgetragen werden (Spielmann, Liebsch et al. 1994). Diese Methode wurde entwickelt um die Wirksamkeit von Sonnenschutzmitteln zu vereinheitlichen und miteinander vergleichbar zu machen.

## 10. Statistische Auswertung

Alle Versuche wurden mindestens zwei, in den meisten Fällen jedoch drei Mal durchgeführt. Es wurde in Triplets gemessen. Die grafische Darstellung erfolgte in Microsoft Excel als Mittelwerte mit der Standardabweichung als Fehlerbalken. Als statistischer Test zur Signifikanzprüfung wurde der Zweistichproben-t-Test für zwei unabhängige Stichproben verwendet. Ein signifikanter Unterschied zu den Kontrollen wurde mit dem Symbol \* dargestellt bei  $P < 0,05$ , \*\* bei  $P < 0,001$  und \*\*\* bei  $P < 0,0001$ . In einigen Fällen war es auf Grund des Versuchsablaufs nicht möglich mehrere unabhängige Versuchsdurchführung zusammen zu fassen, in diesen Fällen wurde ein repräsentatives Ergebnis mit dessen Mehrfachbestimmung dargestellt, wobei die Tendenz stets gleich war.

An dieser Stelle soll auf die Methoden eingegangen werden und die Schwierigkeiten, die sich dabei für die Vergleichbarkeit zeigten. Bei allen wiederholt durchgeführten Versuchen zeigte sich stets die gleiche Tendenz, aber die ausgerechneten Werte wichen teilweise stark voneinander ab, so dass es nicht möglich war die Daten mehrerer unabhängiger Experimente als ein Mittelwert zu behandeln. Aus diesem Grund wurde stets ein

repräsentativer Versuch als Beispiel dargestellt, wobei der Unterschied zwischen UVA-bestrahlten Zellen und Kontrollen tendenziell immer gleich waren. Um unterschiedliche Experimente auch direkt miteinander vergleichen zu können (z.B. Glucoseaufnahme und Laktatproduktion), wurden so viele Experimente wie möglich mit den selben Zellen nach der UVA-Bestrahlung durchgeführt und hier entsprechend dargestellt. Dies war allerdings nicht fortlaufend für alle hier angegebenen Daten möglich, so dass sich dadurch die unterschiedlichen Datenbereiche erklären lassen. Es bieten sich zum Normieren zwei Methoden an, einmal die Normierung auf die Gesamtproteinmenge und andererseits die Normierung auf die Zellzahl. Letzteres hat sich in diesem Fall in der Praxis bewährt und wurde für den *in vitro*-Teil stets auf diese Weise gehandhabt. Aber auch die Normierung auf 1 Million Zellen wirkte sich letzten Endes auf den ausgerechneten Datenbereich aus, da nicht immer exakt die gleiche Zellanzahl auf den Petrischalen wuchs. Da es unterschiedliche Zelllinien für die einzelnen Wachstumsphasen gibt, wurde soweit möglich, die Experimente jeweils mit mindestens 2 Zelllinien pro Wachstumsphase durchgeführt, wobei auch hier die Tendenz gleich blieb. Die Hautkonstrukte dagegen wurden auf die gesamte Proteinmenge normiert und in diesem Fall war es möglich 2 unabhängige Experimente mit je einer 3-Fach-Bestimmung in einem Diagramm zusammen zu fassen.

## 11. Eingesetzte Software und Internet-Dienste

### 11.1 Office-Anwendungen, Literaturverwaltung und Sequenzauswertung

- Microsoft® Word 2003 SP3, Copyright® 1983-2001 Microsoft Cooperation
- Microsoft® Excel 2003 SP3, Copyright® 1983-2001 Microsoft Cooperation
- Microsoft® Powerpoint 2003 SP3, Copyright® 1983-2001 Microsoft Cooperation
- EndNote X4.0.2, Copyright® 1988-2010 Thomson Reuters
- LightCycler® 480 Software release 1.5.1, Copyright® 2011 Roche
- Adobe Photoshop® CS2 V. 9, Copyright® 1990-2005 Adobe Systems Incorporated
- <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> (Primerkalkulation)
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> (Primerdesign)

### 11.2 Literaturrecherche

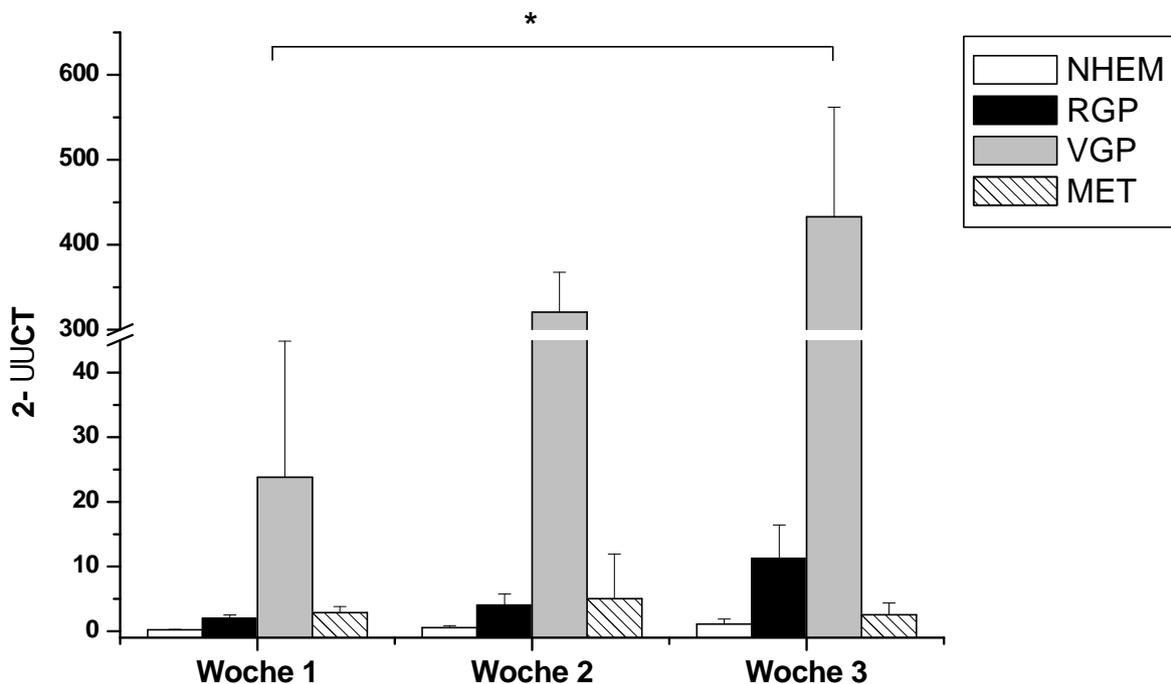
- <http://www.google.de>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>
- <http://www.work.ub.uni-tuebingen.de>

## D. Ergebnisse

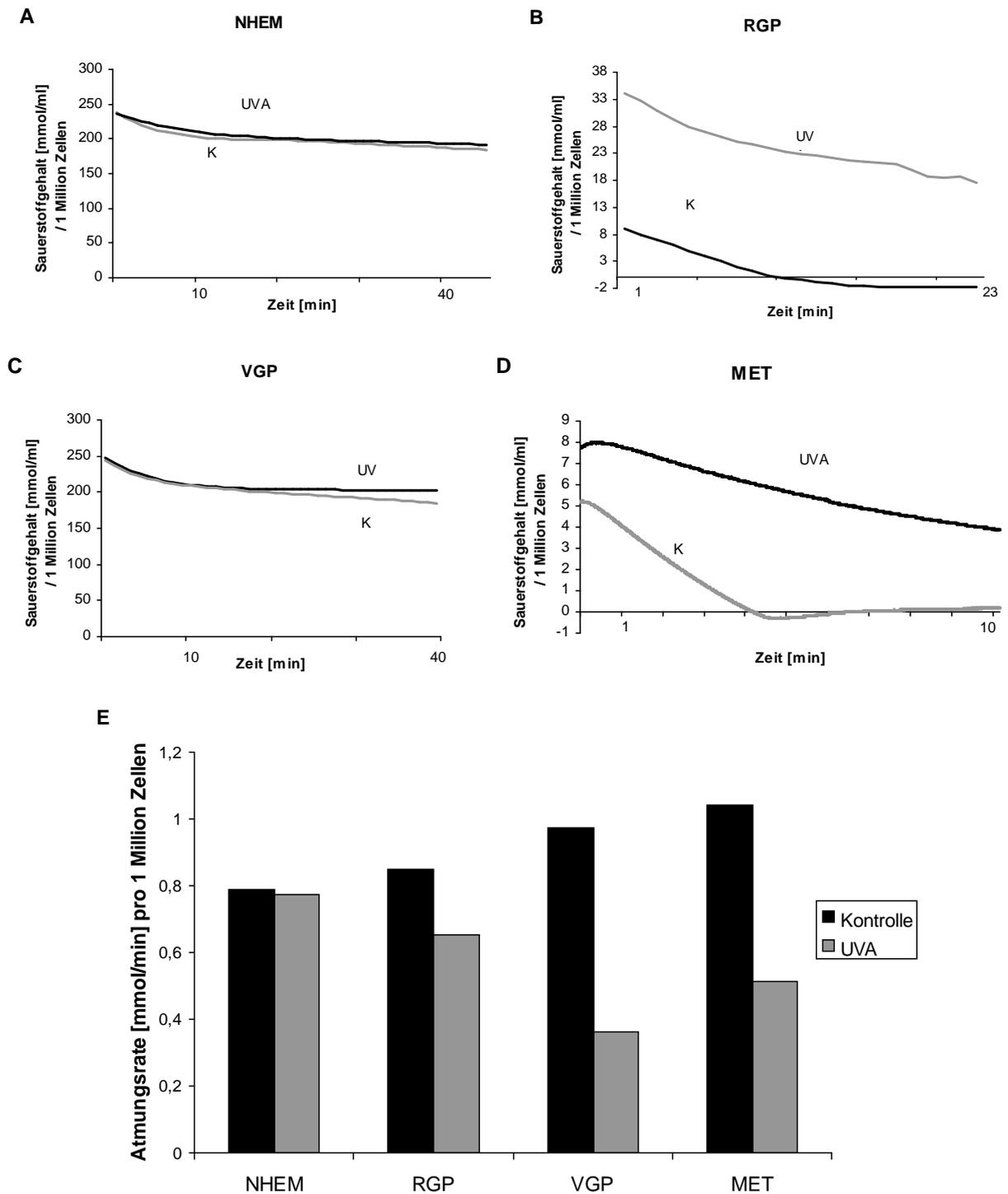
### 1. Effekt von UVA auf die Physiologie von Melanomzellen

#### 1.1 Einfluss von UVA auf die Mitochondrien

Es ist schon seit längerem bekannt, dass UVA-Bestrahlung zur Generation von ROS führt (Meewes, Brenneisen et al. 2001). Die UVA-vermittelten ROS führen wiederum zu Mutationen der mitochondrialen DNA, welche bei vorzeitiger Hautalterung eine Rolle spielen (Berneburg, Grether-Beck et al. 1999; Berneburg, Gremmel et al. 2005). Während des Alterungsprozesses steigt der Gehalt der mitochondrialen Common Deletion im Allgemeinen an, sinkt allerdings während der Entstehung mancher Hauttumoren wie Plattenepithelkarzinom und Basalzellkarzinom (Eshaghian, Vleugels et al. 2006; Kamenisch, Wenz et al. 2007). Um den Level der ROS-vermittelten mitochondrialen Common Deletion während der Melanomentstehung sowie der Melanomentwicklung zu untersuchen, wurden humane Melanozyten (NHEM), Melanomzellen aus der radiären Wachstumsphase (RGP) und aus der vertikalen Wachstumsphase (VGP) sowie metastasierende Melanomzellen (MET) mit UVA bestrahlt und mit Hilfe einer Real Time PCR der Gehalt der der Common Deletion bestimmt (Abb. D-1).



**Abb. D- 1: Die Common Deletion der mtDNA in Melanozyten, RGP-, VGP- und MET-Melanomzellen.** Melanozyten (NHEM), Melanomzellen der radiären Wachstumsphase (WM 3211), Melanomzellen der vertikalen Wachstumsphase (WM 115) und metastasierende Melanomzellen (WM266-4) wurden mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA drei Mal täglich drei Wochen lang bestrahlt. DNA wurde aus dem Zelllysate isoliert. Die Menge der Common Deletion wurde durch eine Real Time PCR ermittelt. Die Quantifizierung erfolgte durch die 2<sup>-CT</sup>-Methode (siehe Abschnitt C.5.5). Die Daten ergeben sich aus dem Mittelwert ± Standardabweichung drei separater Messungen.



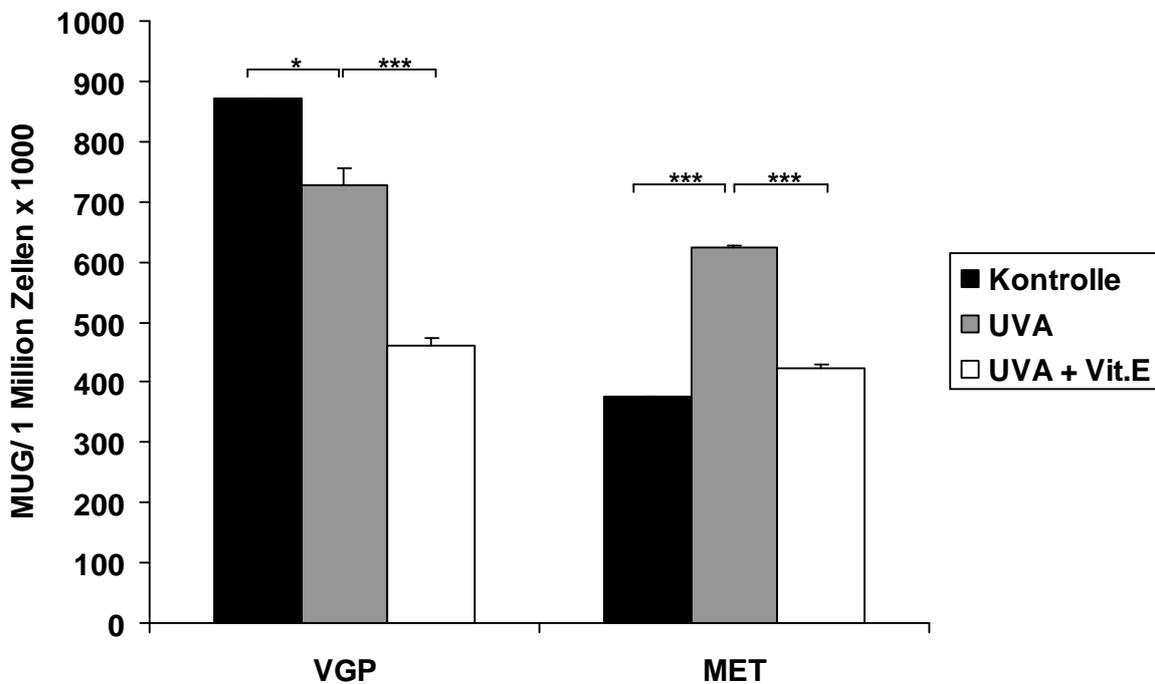
**Abb. D- 2: Der Sauerstoffverbrauch in Melanozyten, RGP-, VGP- und MET-Melanomzellen.** Melanozyten (A; NHEM), Melanomzellen der radiären Wachstumsphase (B; WM 152c), Melanomzellen der vertikalen Wachstumsphase (C; WM 115) und metastasierende Melanomzellen (D; WM 266-4) wurden mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA drei Mal täglich eine Woche lang bestrahlt. Der Sauerstoffgehalt der Zellen wurde mit einem Oxygraphen gemessen. Die Abbildungen A-D zeigen die Sauerstoffabnahme im Laufe der Zeit, wogegen eine Zusammenfassung der daraus resultierenden Atmungsraten in Abbildung E dargestellt ist. Die Daten zeigen repräsentative Versuche aus mindestens drei unabhängigen Durchführungen mit vergleichbaren Ergebnissen.

Dabei zeigte sich eine leichte Erhöhung der Common Deletion im Laufe von drei aufeinander folgenden Wochen in den Melanozyten. Dieses Ausmaß entspricht in etwa den Anstieg wie er bei anderen Hautzellen wie Fibroblasten beobachtet werden kann. Die RGP-Melanomzellen, welche aus einem sehr frühen Entwicklungsstadium eines Melanoms stammen, zeigten eine deutlichere Erhöhung der Common Deletion ( $P > 0,05$ ). Im Kontrast dazu ist die gemessene Erhöhung dieser mitochondrialen Mutation in den VGP-Melanomzellen sehr stark nach drei Wochen UVA-Bestrahlung ( $P < 0,03$ ). Interessanterweise ist die Menge der Common Deletion in den metastasierenden Melanomzellen sehr viel geringer und erhöht sich nur leicht nach 2 Wochen UVA-Bestrahlung ( $P > 0,05$ ). Da der Schaden der mtDNA zunimmt, wurde untersucht ob UVA ebenfalls einen Einfluss auf die Funktion der Mitochondrien hat. Dazu wurde die Atmung mit Hilfe eines Oxygraphen in den Zellen nach einer Woche UVA-Bestrahlung gemessen (Abb. D-2). Es zeigte sich kein Unterschied in der Sauerstoffabnahme, die in nmol/min angegeben ist, bei bestrahlten und unbestrahlten Melanozyten (Abb. D-2A). Dagegen nahm der Sauerstoff in den Melanomzellen unterschiedlicher Wachstumsphasen stärker ab, wenn diese unbehandelt waren. Die UVA-bestrahlten RGP- und VGP-Melanomzellen zeigten eine langsamere Abnahme des Sauerstoffgehalts (Abb. D-2B und D-2C). Dabei war der Unterschied in den metastasierenden Melanomzellen zu den Kontrollen am deutlichsten (Abb. D-2D). Bemerkenswert hierbei ist die Tatsache, dass die unbestrahlten MET-Melanomzellen schon nach wenigen Minuten den gesamten im Atmungsmedium verfügbaren Sauerstoff verbraucht haben. Der direkte Vergleich der berechneten Atmungsraten [nmol/min] aller Zellen, macht den Unterschied zwischen Melanozyten und Melanomzellen deutlich (Abb. D-2E). Die Atmungsrate der RGP war verglichen mit denen von VGP und MET niedriger. Diese Daten wurden aus der Sauerstoffabnahme im Laufe der Zeit berechnet und als repräsentativer Versuch aus mehreren unabhängigen Versuchen dargestellt. Normiert wurden alle Werte auf die Zellzahl der in die Messkammer des Oxygraphen eingesetzten Zellen.

### **1.2 Der Einfluss von UVA auf die Seneszenz**

Normale Melanozyten aus humanen Nevi exprimieren die Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ -Gal) sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als einen Marker für Wachstumskontrolle um Zellen in normalen Nevi mit oncogenen Mutationen wie BRAF<sup>E600</sup> davor zu bewahren zu proliferieren und zu malignen Zellen zu werden (Michaloglou, Vredeveld et al. 2005). Um den Einfluss von UVA auf diesen initiierenden Schritt der Melanomagenese zu untersuchen, wurden Melanomzellen verschiedener Wachstumsphasen (VGP und MET) eine Woche lang mit UVA bestrahlt und die

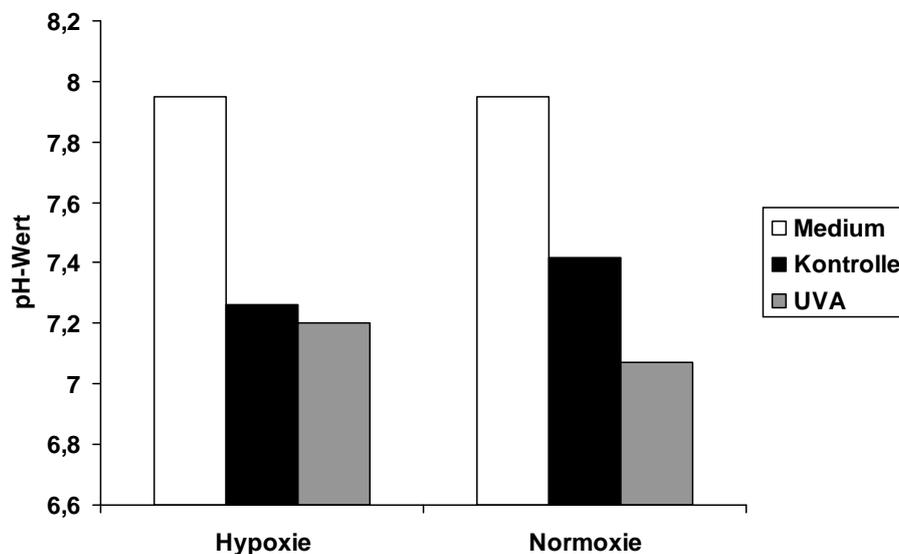
enzymatisch die SA- $\beta$ -Gal gemessen. Die Werte wurden auf die im Assay eingesetzte Zellzahl normiert. In den Melanomzelllinien aus der vertikalen Wachstumsphase konnte nach UVA-Bestrahlung eine Erniedrigung der  $\beta$ -Gal-abhängigen Seneszenz festgestellt werden ( $P < 0,0017$ , Abb. D-3). Nach Zugabe von Trolox wurde MUG-Aktivität stärker erniedrigt ( $P < 0,0001$ ). Im Kontrast dazu zeigt UVA auf die metastasierenden Melanomzellen einen höheren Effekt ( $P < 0,0001$ ). In diesem Fall haben die UVA-bestrahlten Zellen eine 1,5-fache Erhöhung der Seneszenz als die unbestrahlten Kontrollen. Dabei senkte Trolox auch in diesem Fall die gemessene MUG-Aktivität ( $P < 0,0001$ ).



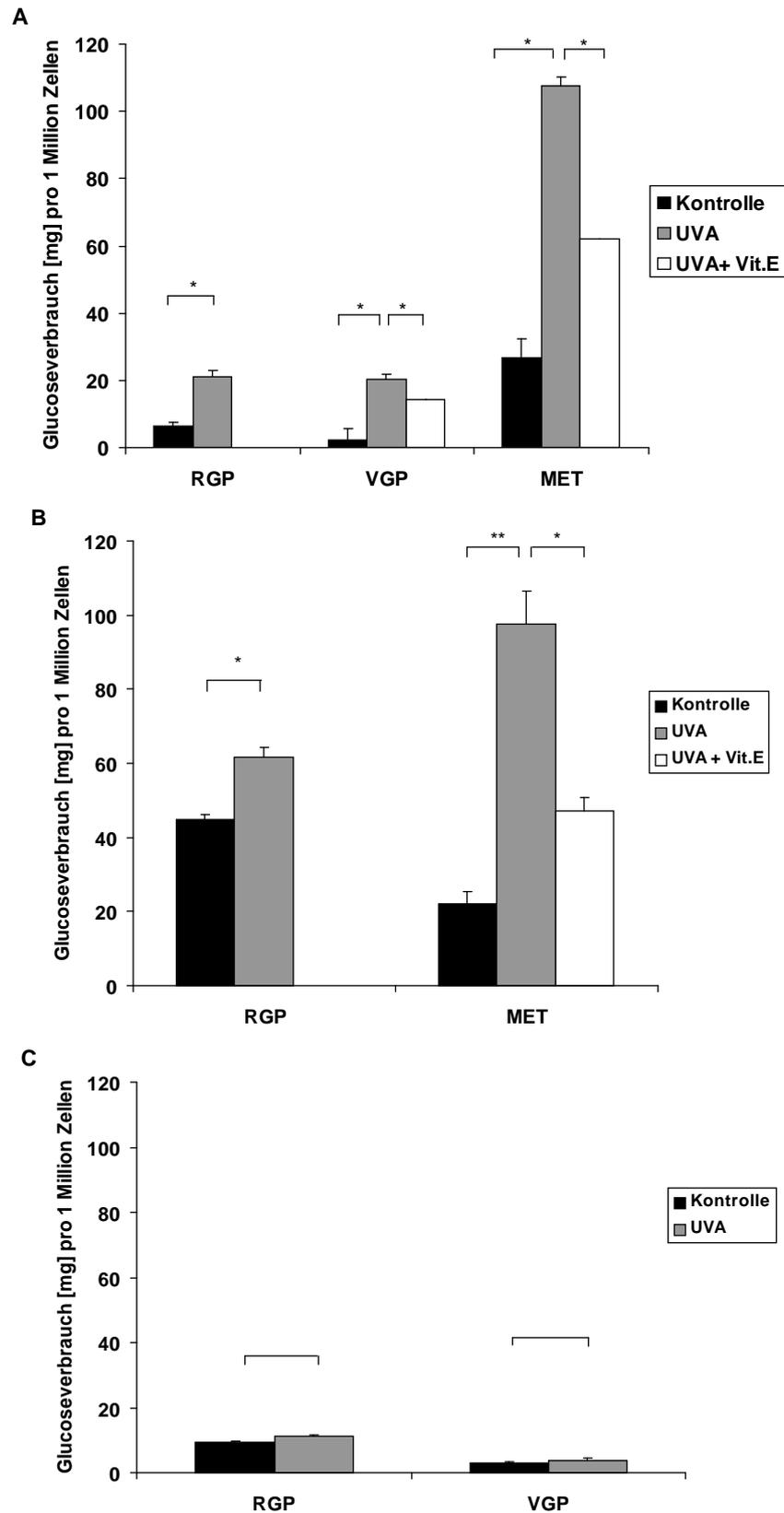
**Abb. D- 3: Die Aktivität der seneszenz-assoziierten  $\beta$ -Gal in VGP- und MET-Melanomzellen.** VGP- (WM 793) und MET-Melanomzellen (WM 266-4) wurden mit  $6 \text{ J/cm}^2$  UVA drei Mal täglich eine Woche lang bestrahlt. Die seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galaktosidase wurde anschließend wie in Abschnitt C.8 beschrieben enzymatisch fluorometrisch gemessen. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von Repräsentanten dreier unabhängigen Experimenten dargestellt.

### 1.3 Hinweise zeigen einen erhöhten Warburg-Effekt durch UVA

Im Vergleich mit den unbestrahlten Kontrollen, sank der pH-Wert nach einer Woche UVA-Bestrahlung ab (Abb. D-4). Dieser Effekt war unter Normoxie-Bedingung stärker, als bei den Zellen, die bei nur 1% Sauerstoff-Gehalt kultiviert wurden. Um die Ursache des Absinkens des pH-Werts zu ergründen, wurde der Einfluss von UVA auf den sogenannten Warburg-Effekt untersucht. Der Warburg-Effekt bedeutet für die Zellen, dass die Energieproduktion über die Atmungskette reduziert wird, dafür aber die Rate der Glycolyse erhöht wird und die benötigte Energie über Laktatbildung produziert wird. Dieser Effekt spielt sich in verschiedenen Tumoren ab (siehe Abschnitt B-6.2), unabhängig davon ob genug Sauerstoff für die Atmung der Zellen vorhanden ist. Um zu prüfen ob der Warburg-Effekt eine Rolle in Melanomzellen spielt und ob UVA diesen Effekt beeinflusst, wurden Melanomzellen verschiedener Wachstumsphasen eine Woche lang mit UVA bestrahlt und sowohl der Glucoseverbrauch als auch die Laktatproduktion gemessen. Dabei geben ein erhöhter Glucoseverbrauch und gleichzeitig eine erhöhte Laktatproduktion einen Hinweis auf den Warburg-Effekt.



**Abb. D- 4: Die Änderung des pH-Werts nach UVA-Bestrahlung.** Metastasierende Melanomzellen (WM 266-4) wurden mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA drei Mal täglich eine Woche lang bestrahlt. Der pH-Wert wurde mit Hilfe eines pH-Meters bestimmt. Dargestellt ist der pH-Wert des Mediums ohne Zellen, des pH-Wert des Überstandes nach 1 Woche UVA-Bestrahlung und der Überstand der unbestrahlten Kontrollen nach 1 Woche. Die Kultivierung der Zellen erfolgte sowohl unter Normoxie-Bedingungen als auch in einem Hypoxie-Inkubator bei 1% Sauerstoff. Diese Darstellung zeigt ein Repräsentant aus zwei unabhängigen Messungen.



**Abb. D- 5: Glucoseverbrauch nach UVA-Bestrahlung in RGP-, MET- und VGP-Melanomzellen.** RGP- (WM 35, WM 1552c), VGP- (WM 115, WM 793) und MET- (WM 266-4) Melanomzellen wurden mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA drei Mal täglich eine Woche lang bestrahlt. Anschließend wurde der Glucosegehalt des Überstandes wie in Abschnitt C-6.1 beschrieben bestimmt und anhand dessen der Glucoseverbrauch berechnet. Die Zellen wurden unter Normoxie-Bedingungen (A, C) und unter Hypoxie-Bedingung (B) kultiviert. Das Medium wurde mit hitzeinaktivierten FCS (A, B) und mit unbehandelten FCS (C) komplementiert. Die Daten sind Repräsentanten aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung.

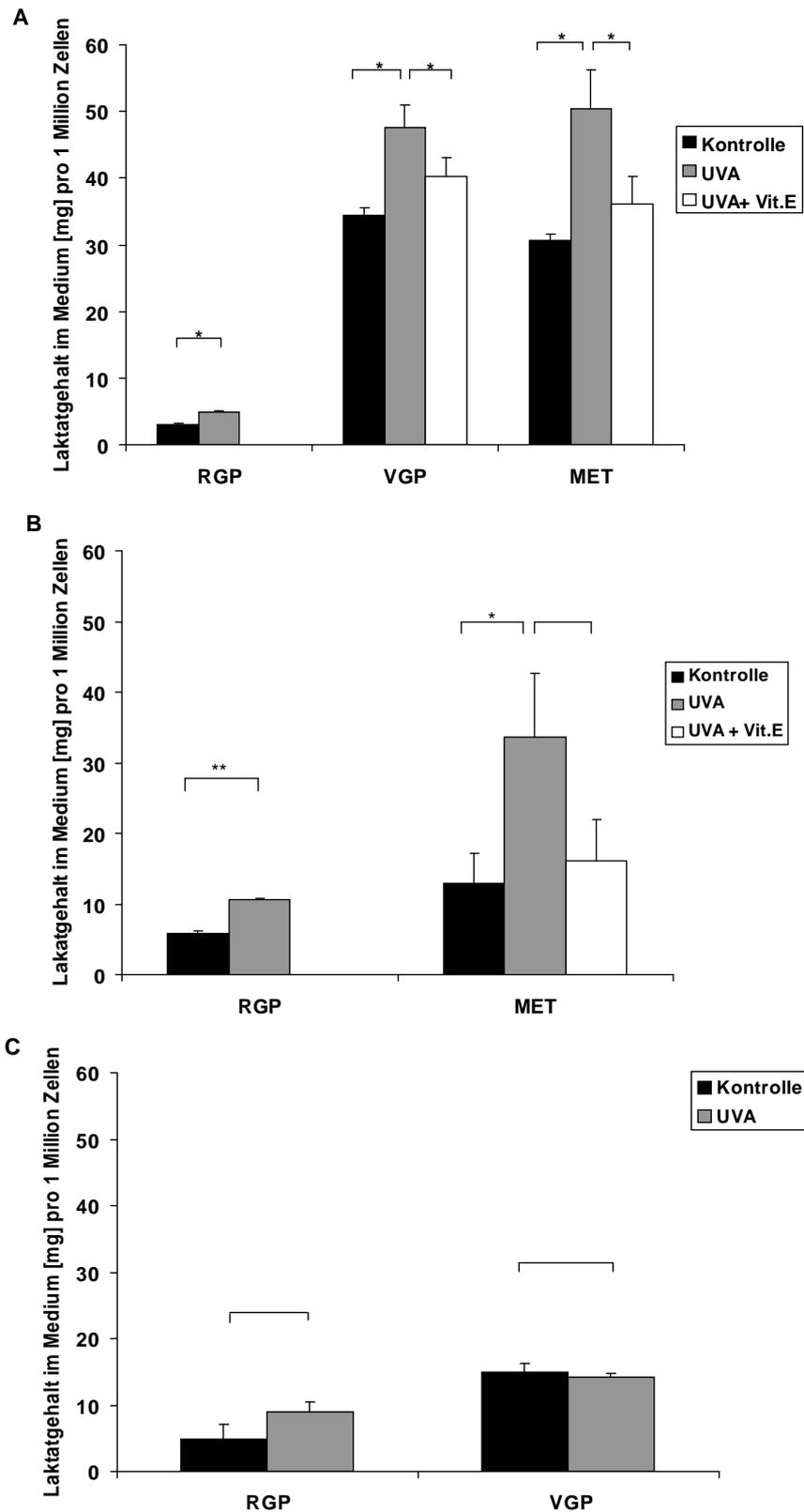
Um die genaue Glucoseaufnahme der Zellen zu bestimmen, wurden die Zellen eine Woche lang mit UVA bestrahlt und darauf geachtet, dass stets die gleiche Menge Medium den Zellen zur Verfügung steht. Dabei wurde dokumentiert wie viel Medium im Laufe der Woche hinzugegeben wurde um diese Menge in die Berechnung einzubeziehen. Anschließend wurde die Glucosemenge im Überstand gemessen und berechnet wie viel mg Glucose, das anfangs im Medium vorhanden war, von den Zellen verbraucht wurde. Diese Werte wurden mit unbestrahlten Kontrollen verglichen (Abb. D-5). Dabei konnte ein deutlicher Effekt ( $P < 0,02$ ) von UVA auf die Melanomzellen, die in einer normalen Sauerstoffatmosphäre kultiviert wurden, gemessen werden (Abb. D-5A). Im Vergleich zu den Melanomzellen der radiären und vertikalen Wachstumsphase war dieser Effekt in den metastasierenden Zellen um das 5-fache erhöht.

Durch Zugabe des Vitamin E Derivats Trolox (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carbonsäure) in einer Arbeitskonzentration von 20  $\mu\text{M}$  konnte dieser Effekt abgeschwächt werden ( $P < 0,02$ ). Normiert wurde der Glucoseverbrauch auf die Zellzahl. Der Warburg-Effekt findet in den betroffenen Tumorzellen statt, wenn die Zelle genügend Sauerstoff zur Verfügung hat um auch die Zellatmung durchführen zu können. Um die Zellen zu zwingen Glucose zu Laktat zu vergären, unabhängig vom Warburg-Effekt, wurden zusätzlich Melanomzellen während des Bestrahlungsexperiments in einem Hypoxie-Brutschrank inkubiert, in dem die Atmosphäre einen Sauerstoffgehalt von ca. 1% aufwies, statt der normalerweise vorhandenen 21% Sauerstoff. In diesem Fall zeigte sich, dass die Zellen ebenfalls nach UVA-Bestrahlung mehr Glucose verbrauchen als die unbestrahlten Kontrollen (Abb. D-5B). Der Effekt von UVA war bei den metastasierenden Zellen ( $P = 0,001$ ) doppelt so hoch verglichen mit den radiären Melanomzellen ( $P < 0,03$ ). Allerdings ist der Glucoseverbrauch bei den radiären Melanomzellen sowohl in den Kontrollen als auch nach UVA-Bestrahlung wesentlich höher als unter Normoxie-Bedingung. Durch Zugabe von Trolox (20  $\mu\text{M}$ ) konnte der Effekt von UVA abgeschwächt werden ( $P < 0,004$ ). Um eine Veränderung der Ergebnisse durch Proteine des FCS im Medium auszuschließen, wurden die Experimente aus Abb. D-5A und D-5B mit Medium durchgeführt, welches mit hitzeinaktivierten FCS komplementiert worden war. Als Kontrollexperiment wurde eine UVA-Bestrahlung von Melanomzellen aus der radiären und vertikalen Wachstumsphase mit nicht inaktivierten FCS im Medium durchgeführt (Abb. D-5C). Dabei konnte kein signifikanter Unterschied in Hinblick auf den Glucoseverbrauch von UVA-bestrahlten Zellen und Kontrollen gemessen werden ( $P > 0,1$ ).

Um die Menge an Laktat zu bestimmen, die die Melanomzellen während eines Bestrahlungsexperiments produzieren, wurde der Laktatgehalt des Überstandes nach einer Woche UVA-Bestrahlung gemessen und mit dem Laktatgehalt des Mediums zu Beginn des Experiments verrechnet. Dabei stammen die Messungen aus Abb. D-6 aus den gleichen

Experimenten, aus denen auch die Daten für den Glucoseverbrauch (Abb. D-5) stammen um einen direkten Vergleich zu erlauben. Unter Normoxie-Bedingung zeigte sich, dass sowohl die Kontrollen als auch die UVA-bestrahlten RGP- VGP- und MET-Melanomzellen Laktat bilden (Abb. D-6A), wobei UVA die Laktatproduktion signifikant ansteigen lässt ( $P < 0,03$ ). Es war zu beobachten, dass die Laktatproduktion in den metastasierenden Zellen 11-fach höher war als in den radiären Melanomzellen verglichen mit den Kontrollen. Die Melanomzellen der vertikalen Wachstumsphase produzierten etwas weniger Laktat als die metastasierenden Zellen, jedoch 9-mal so viel die RGP-Melanomzellen. Durch Zugabe von Trolox in einer Endkonzentration von  $20\mu\text{M}$  konnte der Effekt bei den metastasierenden Zellen fast auf Kontrollniveau gesenkt werden. Wurden die Melanomzellen während des Bestrahlungsexperiments im Hypoxie-Brutschrank bei 1% Sauerstoff kultiviert, produzierten sowohl RGP- als auch MET-Melanomzellen Laktat und auch in diesem Fall wurde die Laktatbildung durch UVA-Bestrahlung verstärkt (Abb. D-6B;  $*P < 0,04$ ;  $**P < 0,0001$ ). Die metastasierenden Melanomzellen weisen im Vergleich zu den Kontrollen eine 4-fache Erhöhung der Laktatmenge auf als die radiären Melanomzellen. Dabei produzieren die RGP-Melanomzellen ungefähr die doppelte Menge an Laktat als sie es unter Normoxie-Bedingung getan haben. Dagegen ist die absolute Menge an gebildeten Laktat bei den metastasierenden Melanomzellen etwas geringer als unter Normoxie-Bedingung. Die Zugabe von Trolox ( $20\mu\text{M}$ ) hat auch in diesem Fall die Menge an Laktat auf ein ähnliches Niveau wie die Kontrollen herabsinken lassen. Das Kontrollexperiment mit nicht inaktivierten FCS (Abb. D-6C) zeigte auch in diesem Fall keinen signifikanten Unterschied zwischen UVA-bestrahlten und unbestrahlten Zellen ( $P > 0,2$ ) in RGP- und VGP-Melanomzellen.

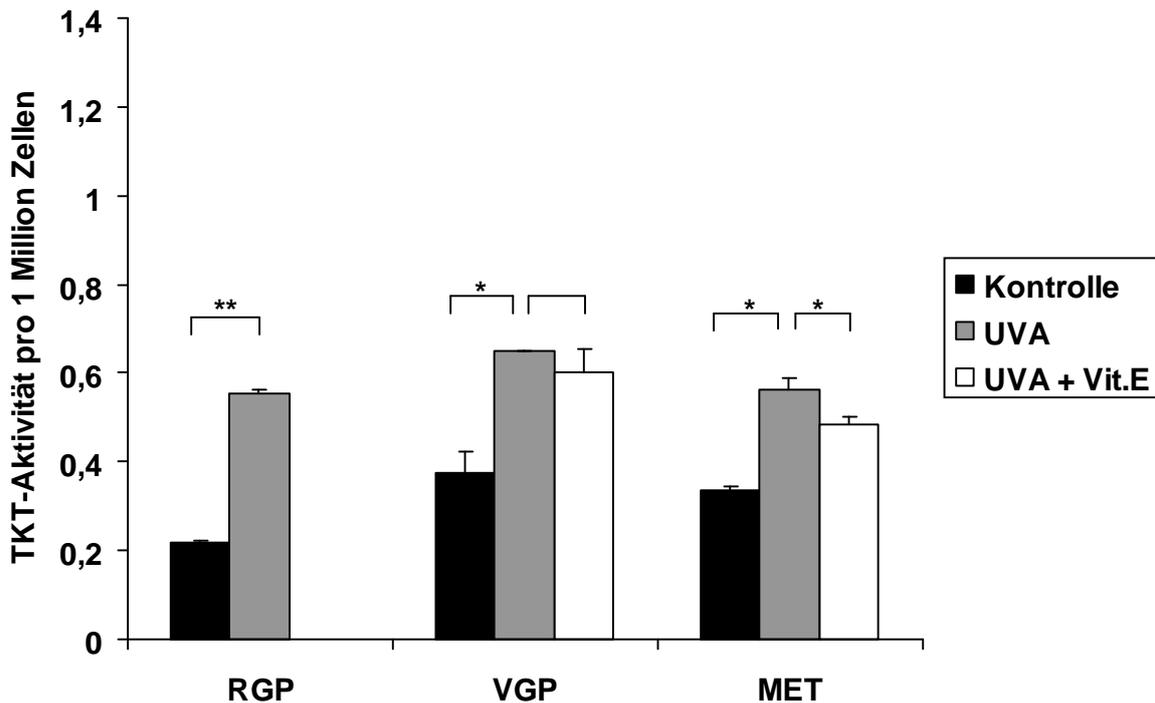
## D. Ergebnisse



**Abb. D- 6: Laktatproduktion nach UVA-Bestrahlung in RGP-, MET- und VGP-Melanomzellen.** RGP- (WM 35, WM 1552c), VGP- (WM 115; WM 793) und MET- (WM 266-4) Melanomzellen wurden mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA drei Mal täglich eine Woche lang bestrahlt. Anschließend wurde der Laktatgehalt des Überstandes wie in Abschnitt C-6.2 beschrieben bestimmt und anhand dessen die Bildung von Laktat berechnet. Die Zellen wurden unter Normoxie-Bedingungen (A, C) und unter Hypoxie-Bedingung (B) kultiviert. Das Medium wurde mit hitzeinaktivierten FCS (A, B) und mit unbehandelten FCS (C) komplementiert. Die Daten sind Repräsentanten aus drei unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung.

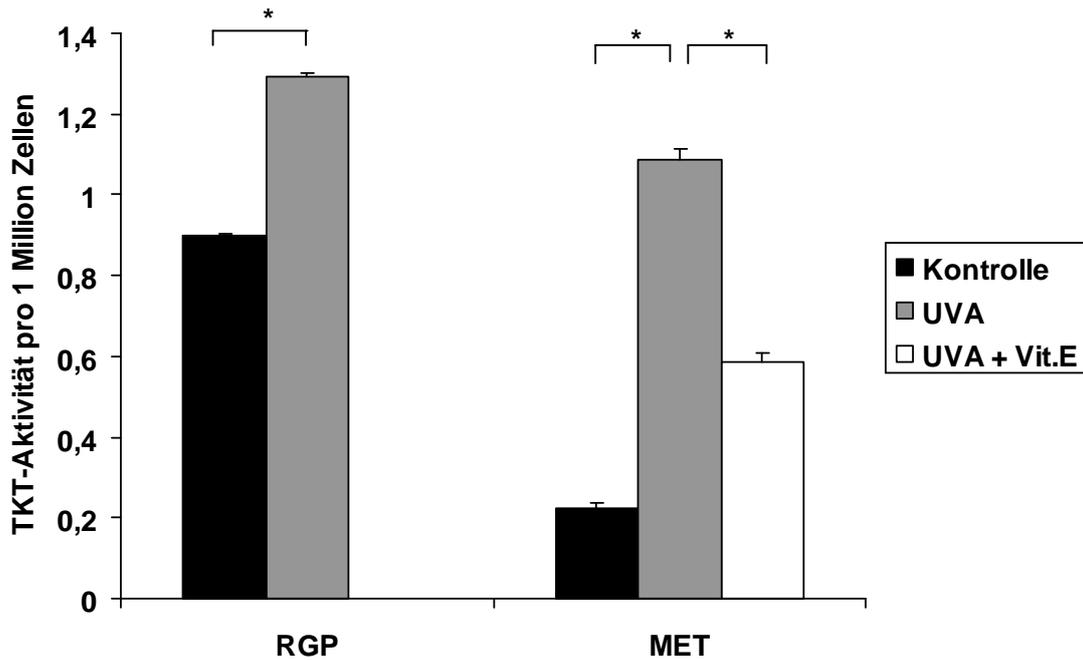
#### **1.4 Der Einfluss von UVA auf die Transketolase**

Die Transketolase (TKT) ist ein Schlüsselenzym des Penosephosphatweges und gilt als wichtiger prognostischer Marker. Des Weiteren wird speziell die Isoform Transketolase-like-1 (TKTL-1) mit dem Stoffwechsel des Warburg-Effekts in Verbindung gebracht (Coy, Dressler et al. 2005). Die Rolle der TKTL-1 in Melanomzellen wurde bisher nicht geklärt. Um zu untersuchen ob UVA einen Einfluss auf die Transketolase-Aktivität hat, wurden Melanomzellen aus der radiären Wachstumsphase und metastasierende Melanomzellen eine Woche lang mit UVA bestrahlt. Die Transketolase-Aktivität wurde im Zelllysate photometrisch bestimmt. In Abbildung D-7 ist der Vergleich der TKT-Aktivität mit UVA-bestrahlten Zellen und unbestrahlten Kontrollen unter Normoxie-Bedingung dargestellt. Sowohl in den RGP- als auch in den MET-Melanomzellen steigt die Aktivität signifikant nach einer Woche UVA-Bestrahlung an ( $*P < 0,003$ ;  $**P < 0,0003$ ). Diese Erhöhung steigt in den RGP-Melanomzellen um das doppelte verglichen mit den Kontrollen und in den metastasierenden Zellen um das 1,5-fache der unbestrahlten Zellen. Durch Zugabe von Trolox als Antioxidans in der Endkonzentration von  $20\mu\text{M}$  sinkt die TKT-Aktivität ( $P < 0,02$ ). Die verwendeten Zellen stammen aus dem gleichen Bestrahlungsexperiment, wie die Ergebnisse aus Abschnitt D-1.3 um das Verhalten der Zellen nach UVA-Bestrahlung auf die verschiedenen Aspekte miteinander vergleichen zu können. Der Versuch wurde zugleich mit RGP- und MET-Melanomzellen durchgeführt, welche in hypoxischer Umgebung bei ca. 1% Sauerstoffgehalt kultiviert worden waren.

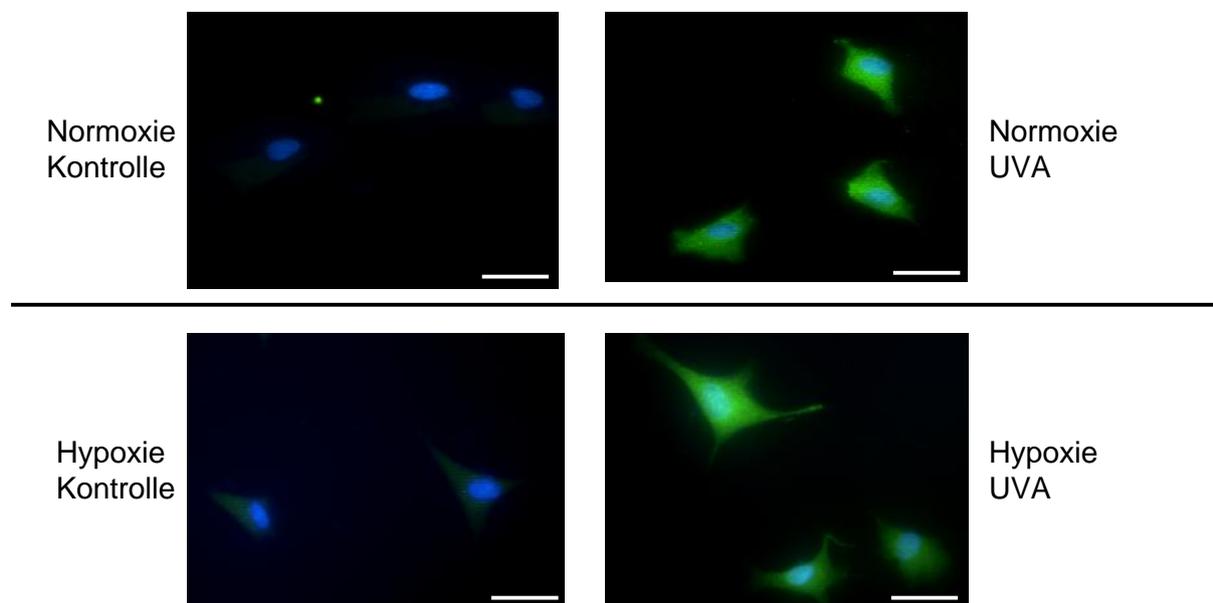


**Abb. D- 7: Aktivität** der Transketolase in Melanomzellen unter Normoxie-Bedingung. RGP- (WM 35), VGP- (WM 793) und MET- (WM 266-4) Melanomzellen wurden mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA drei Mal täglich eine Woche lang bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Aktivität der Transketolase wie in Abschnitt C.6.3 beschrieben im Zelllysate gemessen. Die Messwerte wurden auf die Zellzahl der bestrahlten Zellen normiert. Die Daten stammen aus einer Dreifach-Bestimmung  $\pm$  Standardabweichung eines repräsentativen Versuchs.

Nach einer Woche UVA-Bestrahlung wurde die TKT-Aktivität im Zelllysate gemessen und die ermittelten Werte auf die Zellzahl der eingesetzten Zellen normiert (Abb. D-8). Die Melanomzellen aus der radiären Wachstumsphase zeigten eine deutliche Erhöhung der TKT-Aktivität nach UVA-Behandlung im Vergleich mit den unbestrahlten Kontrollen ( $P < 0,01$ ). Die Aktivitätserhöhung durch UVA in den metastasierenden Zellen ist, verglichen zu den Kontrollen, sogar um 5-fach erhöht ( $P < 0,004$ ). Während der Level der TKT-Aktivität unter Normoxie-Bedingung in den RGP- und MET-Melanomzellen nach UVA-Bestrahlung sich auf ein ähnliches Niveau einspielt, zeigten die bestrahlten RGP-Melanomzellen in der Hypoxie-Atmosphäre eine leicht höhere Aktivität als die bestrahlten MET-Melanomzellen ( $P < 0,04$ ). Dieser Effekt ist in einer verstärkten Weise auch bei den Kontrollen zu beobachten ( $P < 0,003$ ). Das Antioxidans Trolox schwächt die TKT-Aktivität nach UVA-Bestrahlung um die Hälfte ab ( $P < 0,004$ ). Da es bisher nur möglich ist die allgemeine Transketolasen-Aktivität zu bestimmen, in Tumoren aber die Isoform TKTL-1 eine Rolle zu spielen scheint, war es notwendig die TKTL-1 in den Melanomzellen nachzuweisen. Dazu wurden Melanomzellen aus der radiären Wachstumsphase eine Woche lang mit UVA bestrahlt, die auf Super Frost Objektträger wuchsen, diese wurden nach der Bestrahlungswoche fixiert und durch Immunofärbung mit spezifischen TKTL-1 Antikörpern angefärbt.



**Abb. D- 8: Aktivität der Transketolase in Melanomzellen unter Hypoxie-Bedingung.** RGP- (WM 35) und MET-Melanomzellen (WM 266-4) wurden mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA drei Mal täglich eine Woche lang bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und die Aktivität der Transketolase wie in Abschnitt C.6.3 beschrieben im Zelllysat gemessen. Die Messwerte wurden auf die Zellzahl der bestrahlten Zellen normiert. Die Daten stammen aus einer Dreifach-Bestimmung  $\pm$  Standardabweichung eines repräsentativen Versuchs.

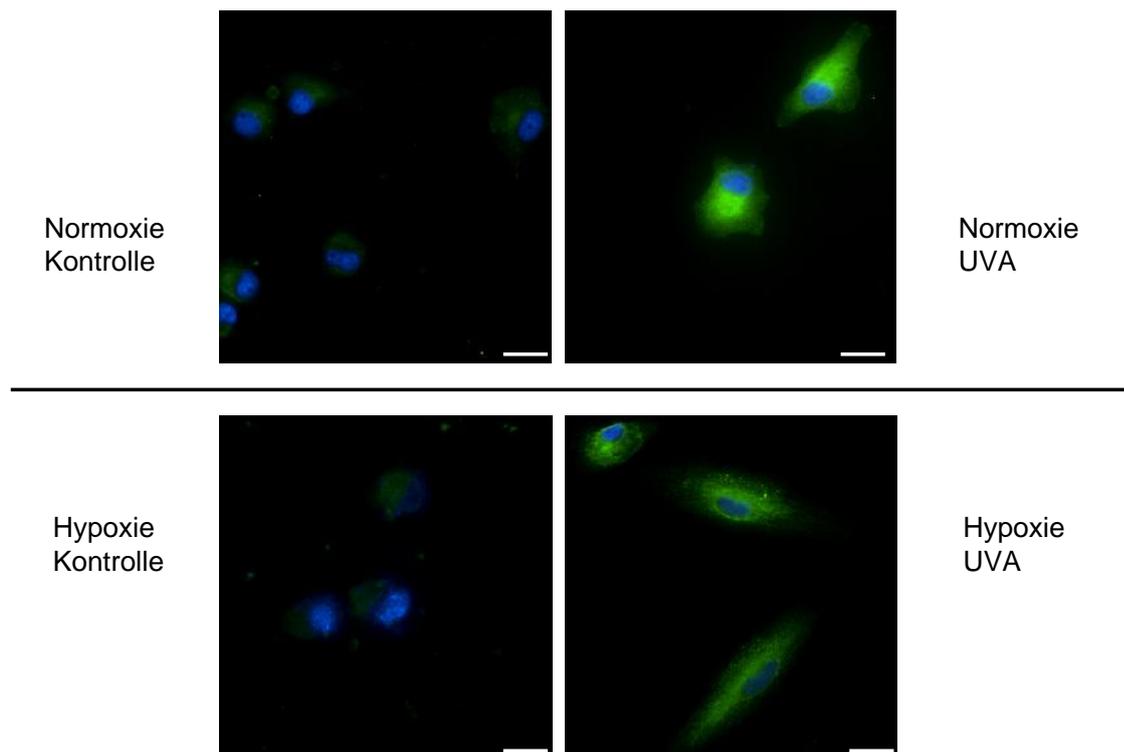


**Abb. D- 9: Induktion der TKTL-1 in RGP-Melanomzellen nach UVA-Bestrahlung.** Die Melanomzelllinie WM 35 (RGP) wurde mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA drei Mal täglich eine Woche lang bestrahlt und währenddessen unter Normoxie- bzw. Hypoxie-Bedingung kultiviert. Die Zellen wuchsen dabei auf Super Frost Plus Objektträger, die sich in der Petrischale befanden. Anschließend wurden die Zellen fixiert und wie in Abschnitt C.6.4 gefärbt. Das Enzym TKTL-1 ist dabei grün angefärbt und die Zellkerne blau. Die Maßstabsleiste entspricht 50 µm. Die Daten sind Repräsentanten aus drei unabhängigen Experimenten.

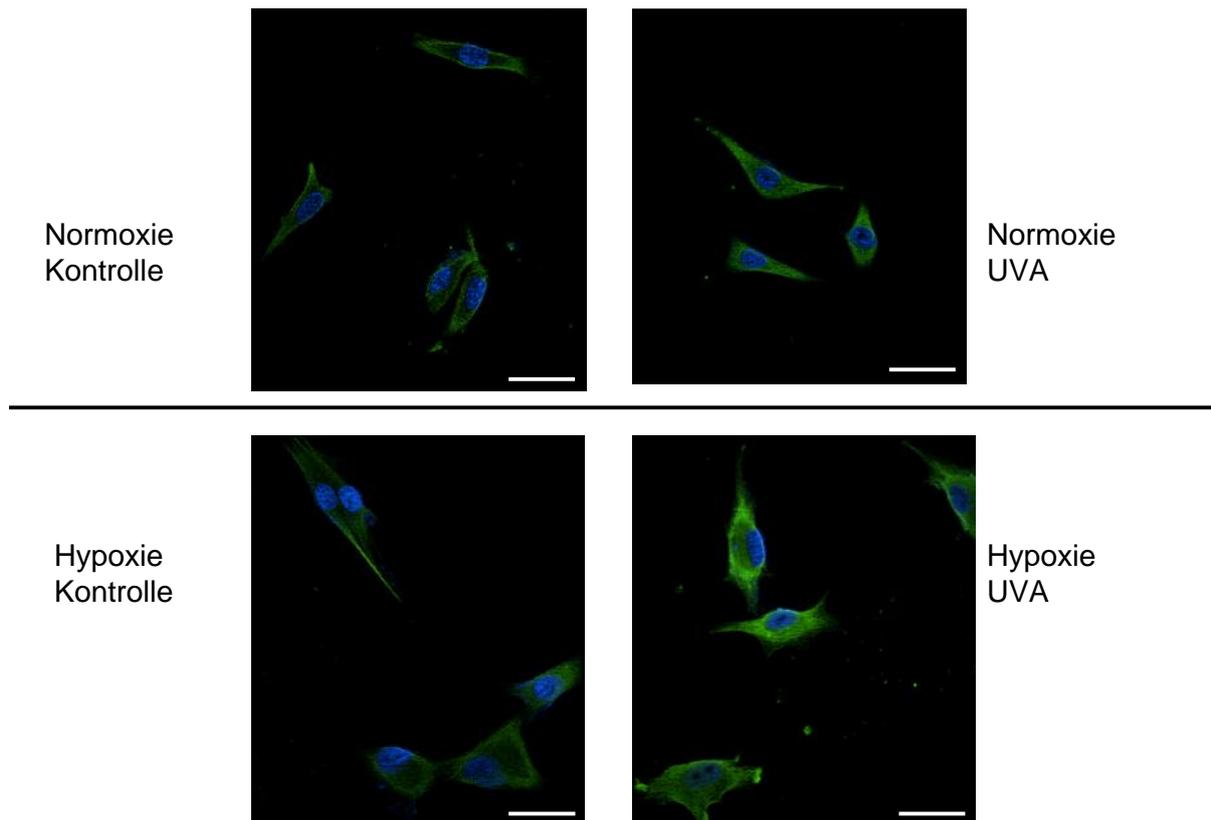
Der grün fluoreszierende sekundäre Antikörper machte anschließend das TKTL-1 Protein unter einem Fluoreszenzmikroskop sichtbar. Zusätzlich wurden die Zellkerne mit dem blau fluoreszierenden Farbstoff DAPI gefärbt.

Verglichen mit den Kontrollen zeigen die UVA-bestrahlten RGP-Melanomzellen deutlich mehr Präsenz des Enzyms TKTL-1 (Abb. D-9). Dabei war allerdings kein deutlicher Unterschied zwischen Zellen, die unter Hypoxie-Bedingung und in normaler Sauerstoffumgebung kultiviert wurden, feststellbar. In den Melanomzellen der vertikalen Wachstumsphase bestätigten sich diese Beobachtungen. Dabei war die Intensivität der TKTL-1 nach Kultivierung in Normoxie-Umgebung nach UVA-Bestrahlung höher als unter Hypoxie-Bedingung (Abb.D-10).

Dagegen konnte in den metastasierenden Melanomzellen zwar auch eine Erhöhung der TKTL-1 nach UVA-Bestrahlung festgestellt werden, jedoch war dieser Unterschied nicht so deutlich wie in den Melanomzellen der radiären Wachstumsphase (Abb.D-11). Allerdings war eine leichte Erhöhung der Präsenz von TKTL-1 nach UVA-Bestrahlung zu erkennen, die in hypoxischer Umgebung kultiviert wurden.



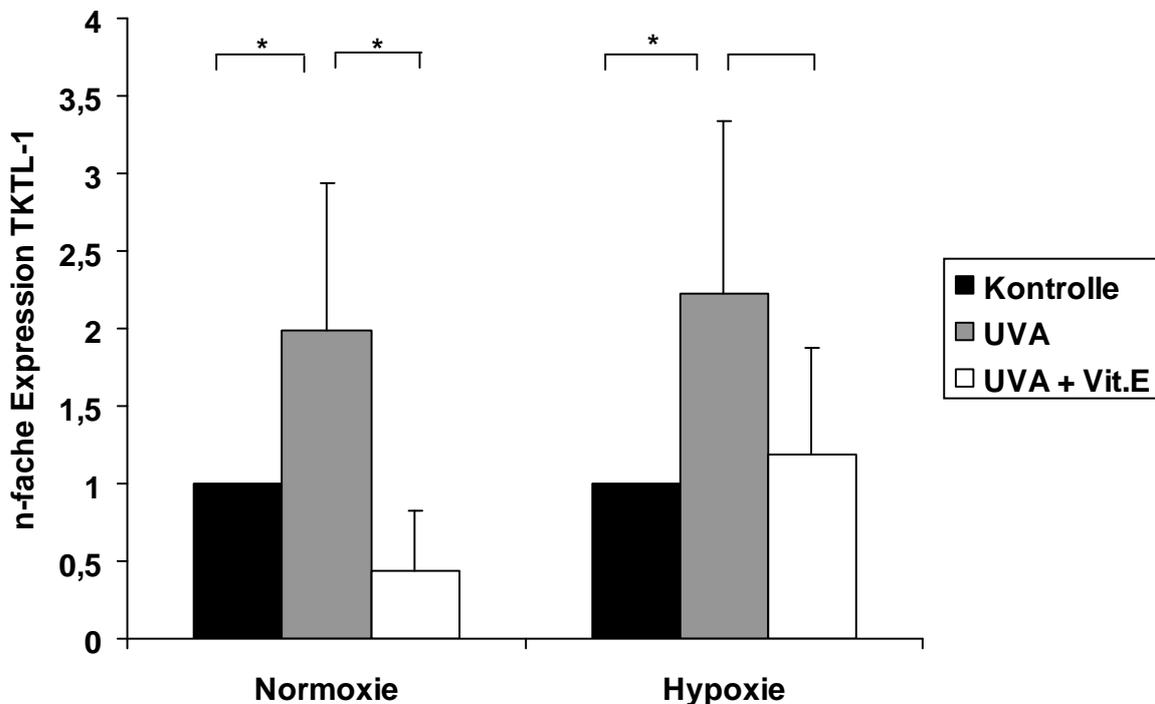
**Abb. D- 10: Induktion der TKTL-1 in VGP-Melanomzellen nach UVA-Bestrahlung.** Die Melanomzelllinie WM 793 (VGP) wurde mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA drei Mal täglich eine Woche lang bestrahlt und währenddessen unter Normoxie- bzw. Hypoxie-Bedingung kultiviert. Die Zellen wuchsen dabei auf Super Frost Plus Objektträger, die sich in der Petrischale befanden. Anschließend wurden die Zellen fixiert und wie in Abschnitt C.6.4 gefärbt. Das Enzym TKTL-1 ist dabei grün angefärbt und die Zellkerne blau. Die Maßstabsleiste entspricht 50 µm. Die Daten sind Repräsentanten aus drei unabhängigen Experimenten.



**Abb. D- 11: Induktion der TKTL-1 in MET-Melanomzellen nach UVA-Bestrahlung.** Die Melanomzelllinie WM 266-4 (MET) wurde mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA drei Mal täglich eine Woche lang bestrahlt und währenddessen unter Normoxie- bzw. Hypoxie-Bedingung kultiviert. Die Zellen wuchsen dabei auf Super Frost Plus Objektträger, die sich in der Petrischale befanden. Anschließend wurden die Zellen fixiert und wie in Abschnitt C.6.4 gefärbt. Das Enzym TKTL-1 ist dabei grün angefärbt und die Zellkerne blau. Die Maßstabsleiste entspricht 50 µm. Die Daten sind Repräsentanten aus drei unabhängigen Experimenten.

Nachdem das Vorhandensein der Transketolase-like-1 gezeigt werden konnte, war es interessant zu erfahren, ob die Expression des *TKTL-1*-Gens durch UVA beeinflusst wird. Dazu wurden Primer erstellt, die spezifisch an das Transkript von *TKTL-1* binden. Als Housekeeping wurden Primer für das Gen *β-Actin* benutzt, da dieses Gen ständig in einem konstanten Level exprimiert wird. Anhand einer Gradienten-PCR konnten diese Primer ausgetestet und ihre optimalen Annealingtemperaturen ermittelt werden. Des Weiteren wurde anhand einer Eichgerade mit unterschiedlichen Konzentrationen von cDNA die Effizienzen (E) der Primerpaare ermittelt. Dazu wurde der Anstieg (m) in folgende Formel eingesetzt:  $E = 10^{-1/m}$ . Das Primerpaar für *TKTL-1* hat eine Effizienz von 1,4 und das Primerpaar für das Housekeeping *β-Aktin* 1,8. Da beide Effizienzen unterschiedlich sind, eignete sich die  $2^{-CT}$ -Methode zur Auswertung der *TKTL-1*-Expression nicht und so wurde die effizienzkorrigierte relative Quantifizierung herangezogen, bei der die Effizienzen berücksichtigt werden. Die zu untersuchenden RGP- und MET- Melanomzellen wurden eine

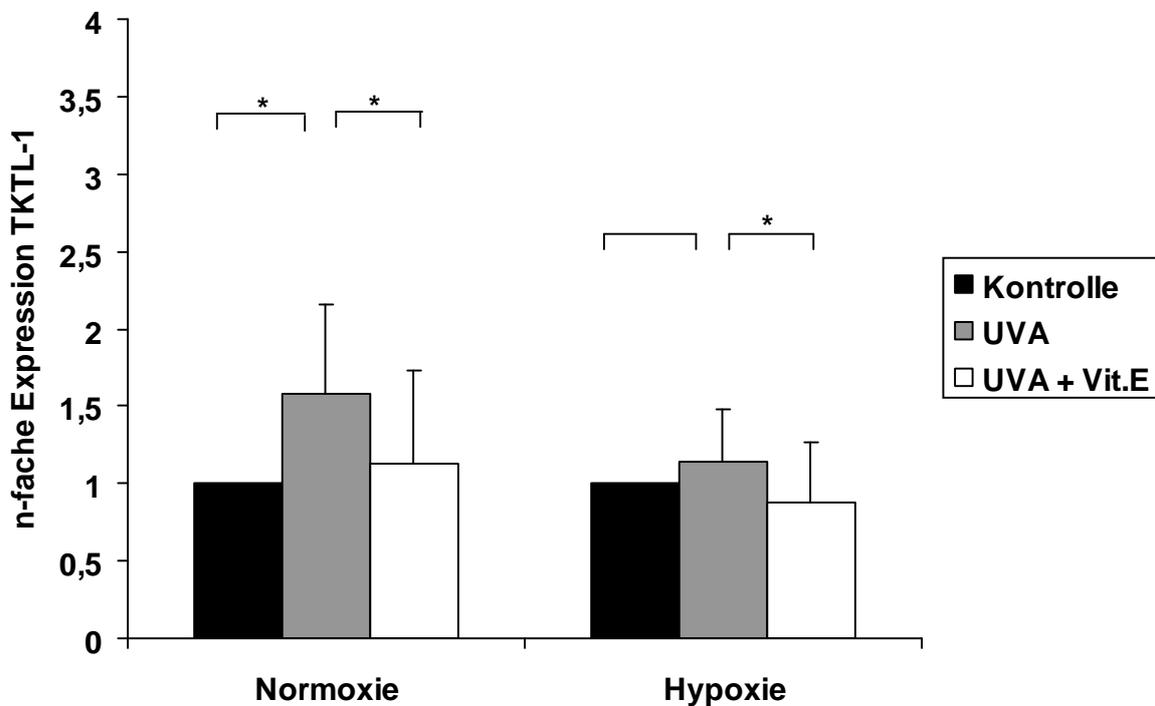
Woche lang unter Hypoxie-Bedingung und Normoxie-Bedingung mit UVA bestrahlt und mRNA aus dem Zelllysate isoliert. Diese wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben um sie als Template in einer quantifizierenden Real Time PCR einzusetzen. Abbildung D-12 zeigt die n-fache Expression der *TKTL-1* nach UVA-Bestrahlung relativ zu den Kontrollen (Kontrollen sind auf den Wert 1 gesetzt, d.h. sie werden einfach exprimiert) in Melanomzellen der radiären Wachstumsphase. Normiert wurden die Werte auf das Housekeeping  $\beta$ -Aktin. Dabei zeigt sich, dass *TKTL-1* in normaler Sauerstoffatmosphäre und unter Hypoxie-Umgebung nach UVA-Bestrahlung doppelt so hoch exprimiert wird, wie in den Kontrollen ( $P < 0,05$ ).



**Abb. D- 12: Expression der Transketolase-like-1 in RGP-Melanomzelllinie.** Die Melanomzelllinie WM 35 (RGP) wurde mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA drei Mal täglich eine Woche lang bestrahlt und währenddessen unter Normoxie- bzw. Hypoxie-Bedingung kultiviert. Aus dem Zelllysate wurde anschließend mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese wiederum wurde als Template für eine Real Time PCR eingesetzt um das *TKTL-1* Transkript zu amplifizieren. Als Housekeeping diente das Gen  $\beta$ -Aktin. Die Quantifizierung erfolgte durch die effizienzkorrigierte relative Quantifizierung (siehe Abschnitt C.5.5). Die Daten stammen aus dem Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Nach Zugabe des Antioxidans Trolox (20  $\mu$ M) konnte in den RGP-Melanomzellen nach Normoxie-Kultivierung eine Herabregulierung der *TKTL-1*-Expression gemessen werden ( $P < 0,04$ ). Dagegen hat Trolox nur einen kleinen erniedrigenden Einfluss auf die Expression

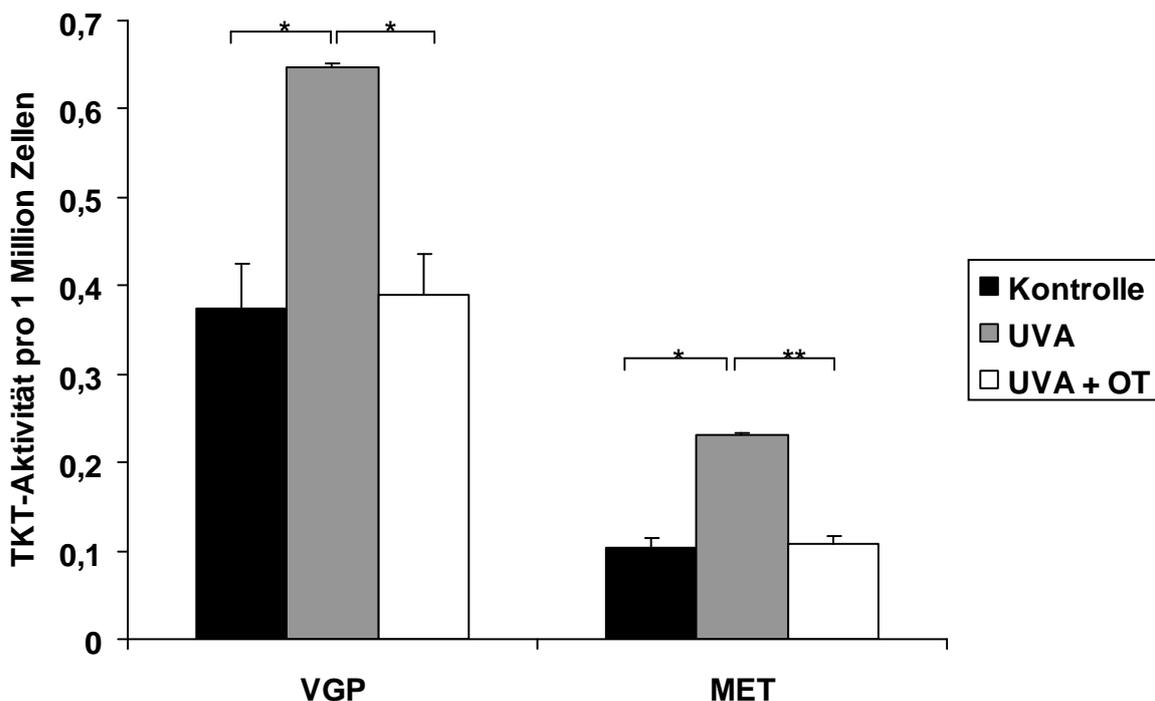
nach UVA-Bestrahlung in Zellen, die unter Hypoxie kultiviert worden waren ( $P < 0,07$ ). In Abbildung D-13 ist die *TKTL-1*-Expression in den metastasierenden Melanomzellen gezeigt. Dabei konnte eine 1,5-fache Überexpression der *TKTL-1* nach Kultivierung unter normaler Sauerstoffumgebung ( $P < 0,05$ ) und nur eine sehr kleine Überexpression nach Kultivierung unter Hypoxie-Bedingung ( $P < 0,15$ ) gemessen werden. Eine Zugabe von Trolox während der UVA-Bestrahlung hat bei beiden Kultivierungsbedingungen einen erniedrigenden Einfluss auf den Expressionslevel von *TKTL-1* ( $P < 0,05$ ). So sank in normaler Sauerstoffumgebung die Expression nach UVA auf das 1,1-fache der Kontrollen und nach Kultivierung unter Hypoxie-Bedingung zeigte sich eine Unterregulierung auf das 0,8-fache der Kontrollen.



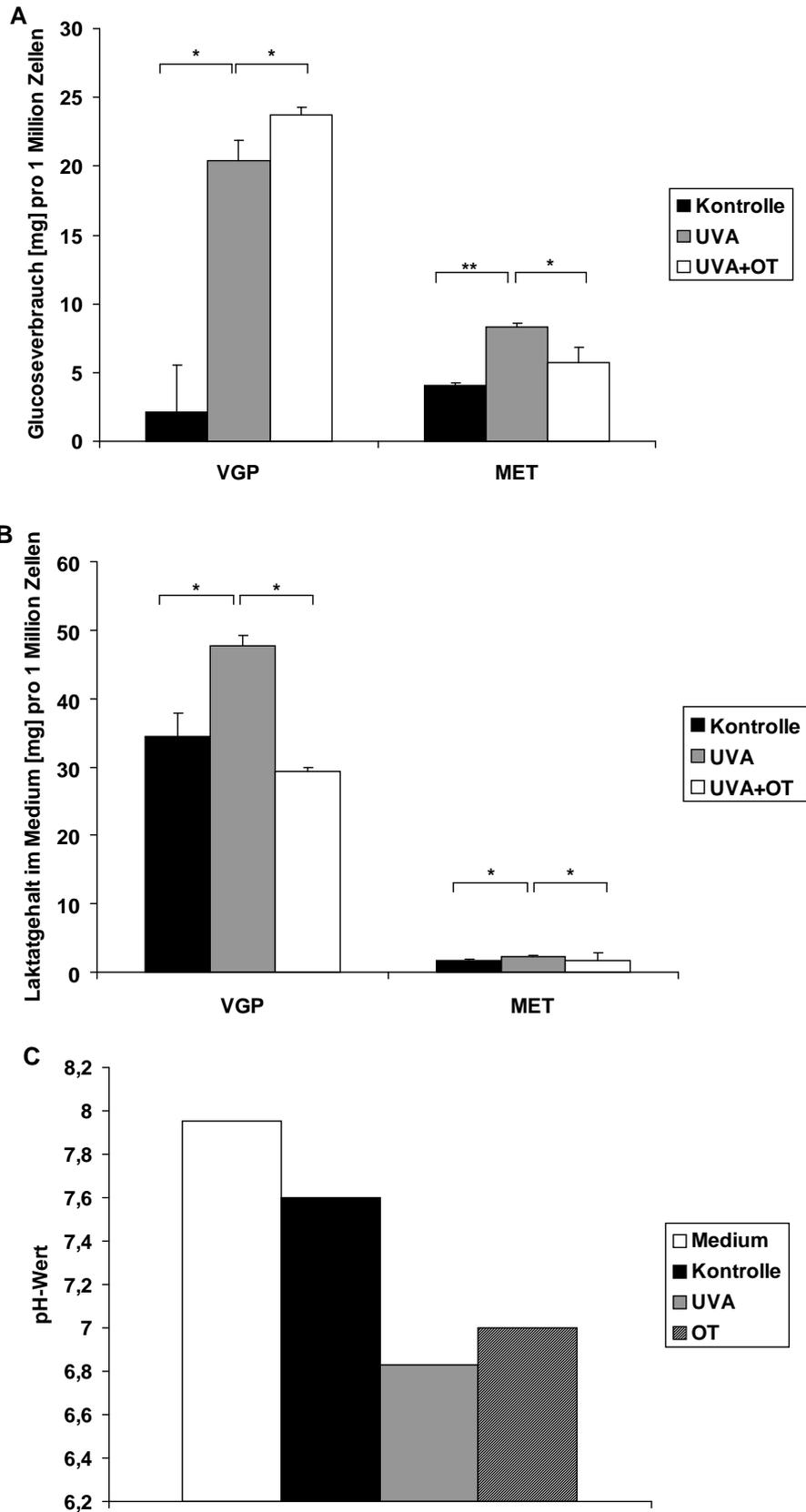
**Abb. D- 13: Expression der Transketolase-like-1 in MET-Melanomzelllinie.** Die Melanomzelllinie WM 266-4 (MET) wurde mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA drei Mal täglich eine Woche lang bestrahlt und währenddessen unter Normoxie- bzw. Hypoxie-Bedingung kultiviert. Aus dem Zelllysat wurde anschließend mRNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese wiederum wurde als Template für eine Real Time PCR eingesetzt um das *TKTL-1* Transkript zu amplifizieren. Als Housekeeping diente das Gen *β-Aktin*. Die Quantifizierung erfolgte durch die effizienzkorrigierte relative Quantifizierung (siehe Abschnitt C.5.5). Die Daten stammen aus dem Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten.

Ein Hemmstoff der Transketolase ist Oxythiamin, welches das Antivitaminderivat von Thiamin ist. Um eine Verbindung der Transketolase mit dem Warburg-Effekt zu untersuchen, wurden Melanomzellen eine Woche lang mit UVA bestrahlt, die Oxythiamin (OT) im Medium

in einer Endkonzentration von 15 mM zugesetzt bekamen. Als Kontrolle, dass Oxythiamin die Transketolase-Aktivität hemmt, wurde die Transketolase-Aktivität gemessen und mit den unbestrahlten Kontrollen sowie den bestrahlten Melanomzellen ohne Oxythiamin gemessen (Abb. D-14). Dabei zeigte sich erwartungsgemäß eine Hemmung von Oxythiamin auf die Transketolase-Aktivität nach UVA-Bestrahlung auf das Niveau der unbestrahlten Kontrollen (\* $P < 0,02$ , \*\* $P < 0,0009$ ). Um den Einfluss von Oxythiamin auf den Warburg-Effekt zu untersuchen, wurden der Glucoseverbrauch (Abb. D-15A), die Laktatproduktion (Abb. D-15B) und die pH-Wert-Änderung (Abb. D-15C) gemessen. Dabei zeigte sich eine Minderung der Transketolase-Aktivität in den metastasierenden Melanomzellen ( $P < 0,05$ ). Die radiären Melanomzellen zeigten keine Erniedrigung des Glucoseverbrauchs. Gleichzeitig konnte eine verminderte Laktatproduktion in beiden Melanomzelllinien festgestellt werden ( $P < 0,02$ ), auch der pH-Wert neutralisierte sich nach Zugabe von Oxythiamin.



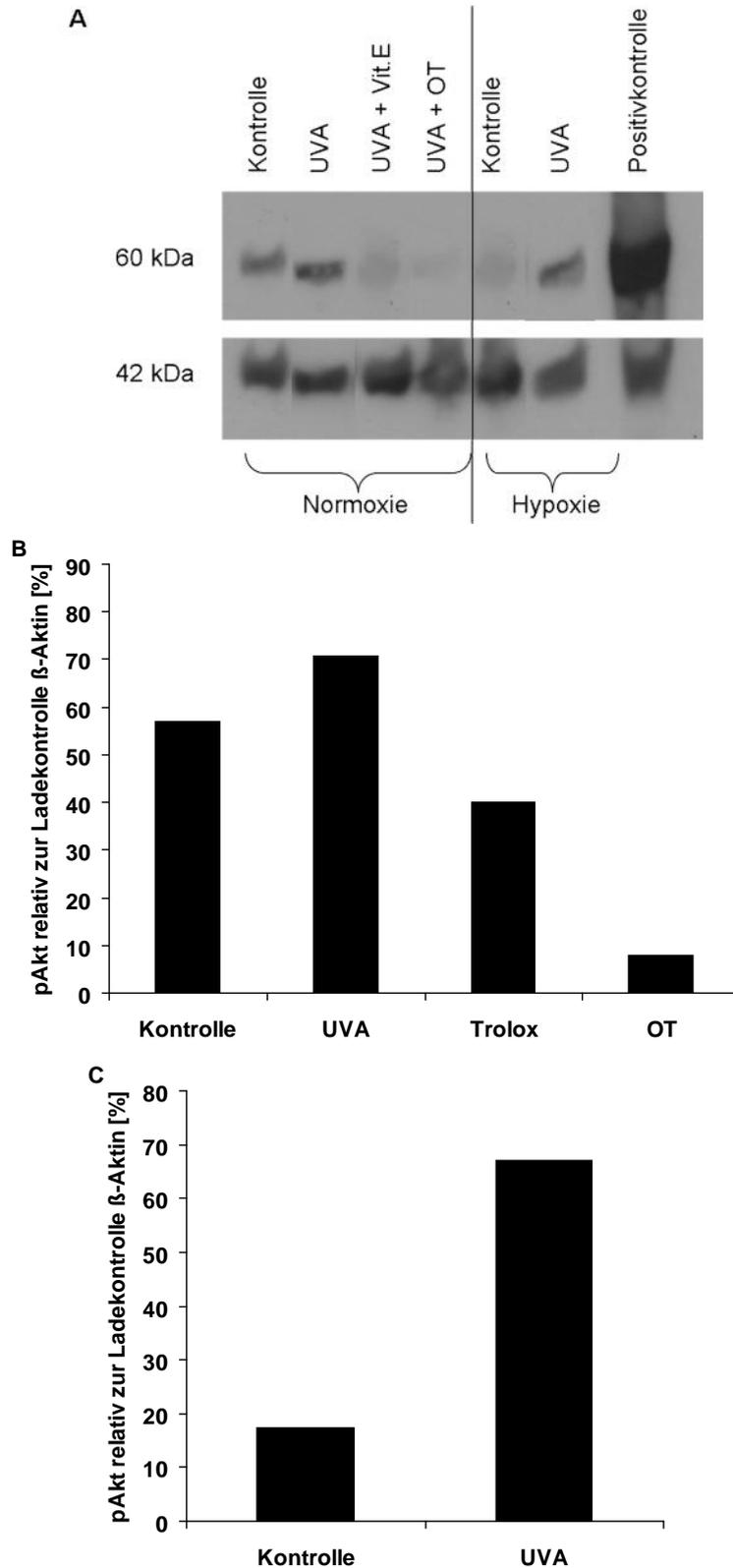
**Abb. D- 14: Kontrolleexperiment der TKT-Aktivitätshemmung durch Oxythiamin.** Die Melanomzelllinien WM 763 (RGP) und WM 266-4 (MET) wurden mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA drei Mal täglich eine Woche lang bestrahlt und währenddessen unter oxygenierten Bedingungen kultiviert. Anschließend wurde die Aktivität der Transketolase gemessen. Die Daten zeigen den Mittelwert einer 3-Fach-Bestimmung  $\pm$  Standardabweichung.



**Abb. D- 15: Einfluss von Oxythiamin auf den Warburg-Effekt:** Die Melanomzelllinien WM 763 (RGP) und WM 266-4 (MET) wurden mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA drei Mal täglich eine Woche lang bestrahlt und währenddessen unter oxygenierten Bedingungen kultiviert. Anschließend wurde der Glucoseverbrauch (A), die Laktatproduktion (B) und der pH-Wert des Medium (C) bestimmt. Die Werte stammen aus 3-Fach-Bestimmungen  $\pm$  Standardabweichung einer Messung.

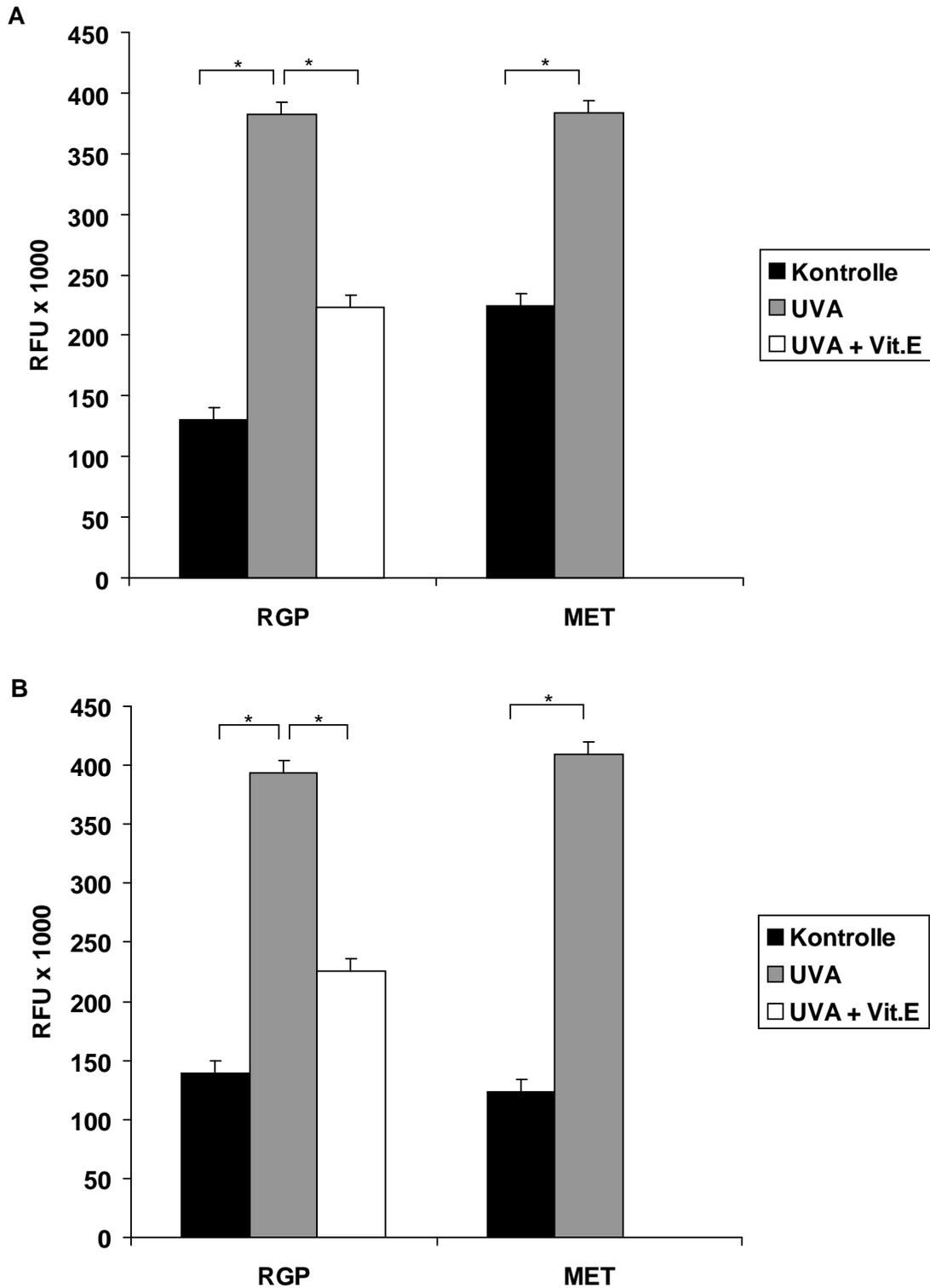
### **1.5 Die Invasivität von Melanomzellen als Folge des Warburg-Effekts**

Der PI3K/Akt-Weg (Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase/ Proteinkinase B) ist einer der wichtigsten Signalwege, die das Zellwachstum regulieren (Vivanco and Sawyers 2002). Er vermittelt eine Vielzahl an Zellantworten auf extrazelluläre Stimulation durch Hormone und Peptid-Wachstumsfaktoren. Akt ist eine Schlüsselkomponente des PI3K/Akt-Signalweges und wird als nachgeschalteter Effektor der PI3K von verschiedenen Wachstumsfaktoren (EGF, Insulin) beeinflusst (Franke, Kaplan et al. 1997). Im aktivierten Zustand ist Akt phosphoryliert und phosphoryliert im Cytoplasma eine Vielzahl von nachgeschalteten Substraten, die in die Regulierung von Zellbewegung, Zellfortbestand und Zellwachstum involviert sind (Cantley 2002; Vivanco and Sawyers 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Akt bei der Progression von Melanomzellen involviert ist (Stahl, Sharma et al. 2004; Meier, Busch et al. 2006). Des Weiteren wurde Akt mit mtDNA Mutationen und ROS-Induktion in Melanomzellen über eine erhöhte *NOX4* (NADPH Oxidase 4) Expression assoziiert (Govindarajan, Sligh et al. 2007). Dabei zeigte sich, dass eine Überexpression von Akt in WM 35 Melanomzellen zum Wandel vom Melanom der radiären Wachstumsphase in die vertikale Wachstumsphase führt. Auch im Warburg Effekt stimuliert Akt den Wechsel von Zellatmung zur aeroben Glycolyse (Elstrom, Bauer et al. 2004). Deshalb ist es sehr interessant den Einfluss von UVA auf Akt in Melanomzellen zu untersuchen. Um die aktive phosphorylierte Form (pAkt) nachzuweisen sind Western Blot Analysen besonders geeignet, die in diesem Fall in Zusammenarbeit mit der AG Schittek (Hautklinik Tübingen) durchgeführt wurden. Das Ergebnis des Western Blots ist in Abbildung D-16 dargestellt. Die metastasierenden Melanomzellen wurden während einer Woche UVA-Bestrahlung einerseits unter normaler Sauerstoffatmosphäre und andererseits im Hypoxie-Brutschrank kultiviert. Als Kontrollen wurden zusätzlich Melanomzellen bestrahlt, die mit dem Antioxidans Trolox (20  $\mu$ M) und mit dem Transketolaseinhibitor Oxythiamin (Endkonzentration 15 mM) im Medium während der Bestrahlungszeit kultiviert wurden. Abbildung D-16A zeigt die Banden des Western Blots von pAkt und der Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin. Als Positivkontrolle wurden Jurkat Zellen, die mit Calyculin A behandelt wurden (Cell Signalling), eingesetzt. Im Western Blot ist der Unterschied zwischen den Banden nach UVA-Bestrahlung und Kontrolle deutlich zu sehen. Zur Quantifizierung, wurden mit Hilfe eines Grafikprogramms die Intensitäten der Banden ermittelt, von denen der Hintergrund abgezogen wurde. Anschließend wurden die Intensitäten relativ zu denen der Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin gesetzt und als Prozent in einer Grafik dargestellt. Nach einer Kultivierung unter normaler Sauerstoffbedingung zeigt sich eine Steigerung der pAkt-Expression nach UVA-Bestrahlung verglichen mit der unbestrahlten Kontrolle (Abb. D-16B). Trolox und Oxythiamin dagegen hemmen die Expression, so dass der Expressionslevel unterhalb der der Kontrolle liegt.

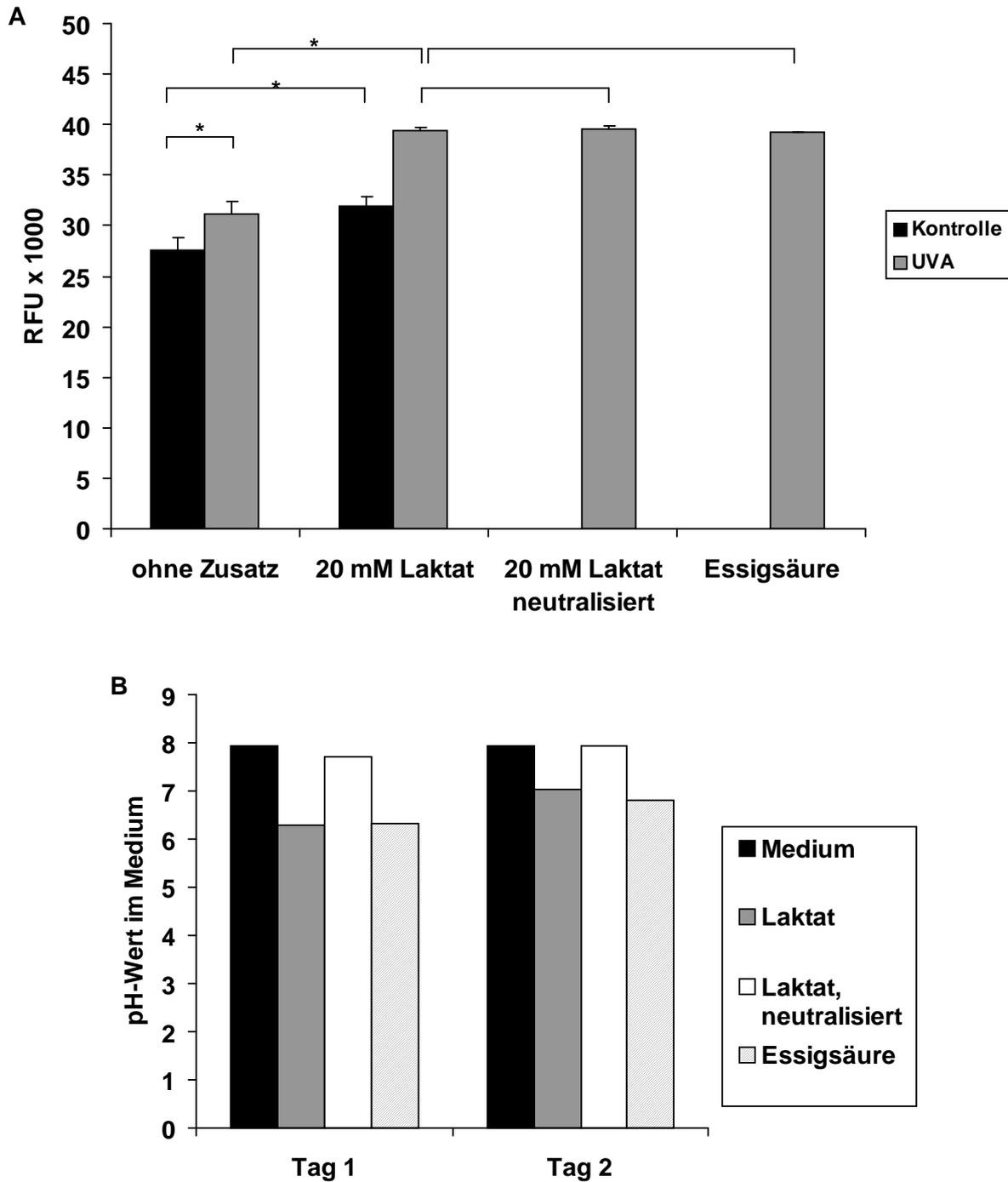


**Abb. D- 16: pAkt Expression in MET-Melanomzellen nach UVA-Bestrahlung.** Metastasierende Melanomzellen (WM 266-4) wurden eine Woche lang mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA bestrahlt und währenddessen unter Normoxie (B) und Hypoxie (C) Bedingung kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und das Zelllysate auf eine SDS-PAGE eingesetzt und mit spezifischen Antikörpern für pAkt und  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle detektiert (A). Die Intensitäten der Banden wurden mit Hilfe des Programms Adobe Photoshop gemessen und relativ zu den Intensitäten der Ladekontrolle gesetzt (B,C).

Unter Hypoxie-Bedingung war der pAkt-Expression drei Mal so hoch nach UVA Bestrahlen als in den Kontrollen, dagegen verminderten in diesem Fall Trolox und Oxythiamin den Effekt nicht (Abb.D-16C). Nachdem pAkt als Progressionsmarker in den Melanomzellen nachgewiesen werden konnte, wurde ein Invasionsassay durchgeführt. Dafür wurden Melanomzellen der radiären Wachstumsphase und metastasierende Melanomzellen eine Woche lang mit UVA bestrahlt und unter Normoxie- bzw. Hypoxie-Bedingung kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und wie in Abschnitt C.7 beschrieben, in Boyden Chambers geladen. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die invasiven Zellen, die durch die Matrix der Boyden Chambers gewandert sind mit Hilfe eines Fluoreszenzreaders gemessen. Unter normaler Sauerstoffbedingung zeigt sich eine mehr als das doppelte erhöhte Anzahl invasiver Zellen nach UVA-Bestrahlung bei den RGP-Melanomzellen im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen (Abb. D-17A;  $P < 0,002$ ). Bei Zugabe von Trolox (20  $\mu\text{M}$  Arbeitskonzentration) wurde dieser Effekt um die Hälfte kleiner ( $P < 0,0035$ ). In den metastasierenden Zellen konnte ebenfalls eine starke Erhöhung der Invasivität gemessen werden ( $P < 0,004$ ). Dabei war der Effekt um das 1,5-fache geringer als bei den RGP-Melanomzellen. Im Kontrast hierzu konnte nach einer Inkubation unter Hypoxie-Bedingung in den metastasierenden Zellen ( $P < 0,002$ ) der größere Effekt (3-fach) nachgewiesen werden im Vergleich zu den RGP-Melanomzellen (Abb.D-17B;  $P < 0,02$ ). Die Zugabe von Trolox erniedrigte die Invasivität erwartungsgemäß ( $P < 0,004$ ). Um der Frage nachzugehen, wodurch die erhöhte Invasivität hervorgerufen wird, da davon auszugehen ist, dass UVA sich nur indirekt darauf auswirkt, wurde das Experiment mit verschiedenen Zusätzen wiederholt. Dabei lag die Vermutung nahe, dass das Produkt des Warburg-Effekt, also Laktat, dabei eine Rolle spielen könnte. In Abbildung D-18A sind die Ergebnisse des Invasionsexperiments unter Zugabe von Laktat dargestellt. Ein Vorversuch zeigte den größten Effekt nach Zugabe von 20mM Laktat, was sich auch im Rahmen dessen bewegt, was bei den Versuchen in Abschnitt D.1.3 an Laktatproduktion nach UVA-Bestrahlung beobachtet werden konnte. Für diesen Versuch wurden MET-Melanomzellen eine Woche lang mit UVA bestrahlt, geerntet und 0,5 Millionen Zellen/ml auf Boyden Chambers ausgesät. Dabei wurden die Boyden Chambers mit Medium ohne Zusätze und mit Zusätzen befüllt. Um den Einfluss von Laktat auf die Invasivität zu untersuchen wurde zunächst einmal Medium mit Laktat in einer Endkonzentration von 20mM eingesetzt. Um den Einfluss des pH-Werts zu untersuchen, wurde Medium mit 20mM Laktat, das mit NaOH neutralisiert wurde eingesetzt, sowie Medium, das durch Essigsäure auf den gleichen pH-Wert wie Medium mit Laktat eingestellt wurde. Es zeigte sich ein signifikanter Anstieg der Invasivität durch Zugabe von Laktat sowohl in den unbestrahlten Kontrollen ( $P < 0,03$ ) als auch in den UVA-bestrahlten Proben ( $P < 0,005$ ).



**Abb. D- 17: Invasionsassay mit RGP- und MET-Melanomzellen nach UVA-Bestrahlung.** RGP-Melanomzellen (WM 35) und MET-Melanomzellen (WM 266-4) wurden eine Woche lang mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA bestrahlt und währenddessen unter normaler Sauerstoffatmosphäre (A) und unter Hypoxie-Bedingung (B) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen geerntet, gezählt und 0,5 Mio Zellen/ml auf Boyden Chambers geladen. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde fluorometrisch die Anzahl der invasiven Zellen bestimmt (Fluoreszenzreader Tristar). Die Ergebnisse resultieren aus einer 3-fach-Bestimmung  $\pm$  Standardabweichung und sind in 1000-fache RFU (Relative Fluoreszenz Units) angegeben.



**Abb. D- 18: Der Einfluss des pH-Werts auf die Invasivität von MET-Melanomzellen nach einer Woche UVA-Bestrahlung.** MET-Melanomzellen (WM 266-4) wurden eine Woche lang unter Normoxie-Bedingung mit  $6 \text{ J/cm}^2$  UVA bestrahlt und anschließend mit verschiedenen Zusätzen auf Boyden Chambers geladen (20 mM Laktat, 20 mM Laktat neutralisiert mit NaOH, 300 mM Essigsäure) und nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde die Anzahl der invasiven Zellen gemessen (A). Um zu überprüfen ob der pH-Wert mit den Zusätzen im Medium stabil bleibt, wurde dies zuvor mit Medium getestet, dass ÜN bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert wurde (B).

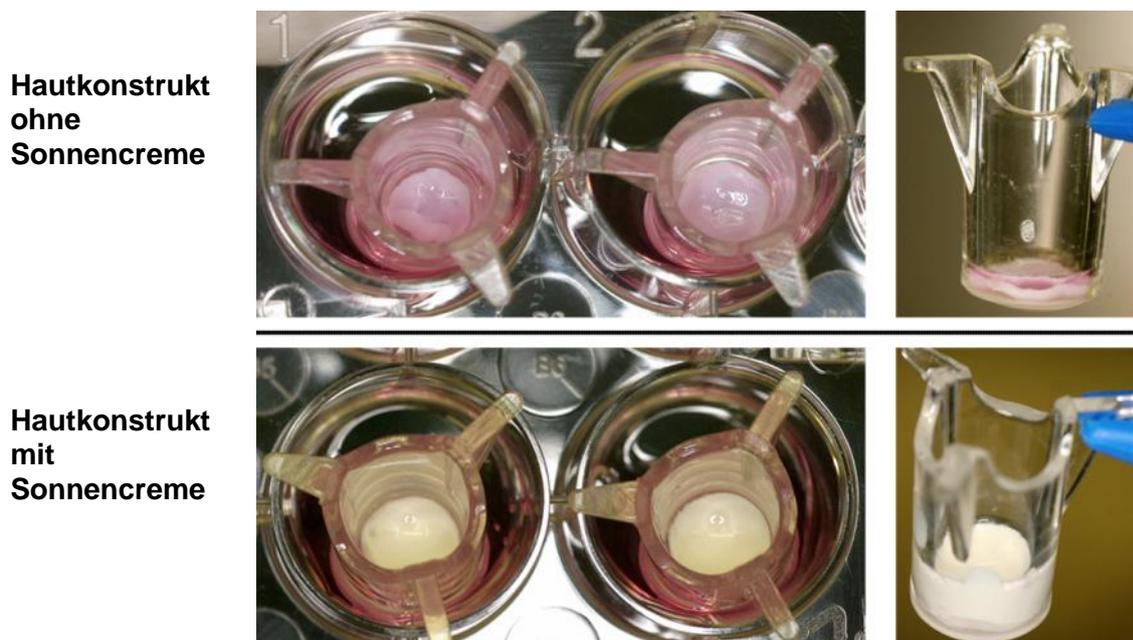
Der Anstieg war auch in diesem Fall allein durch die Bestrahlung ohne Zusätze im Medium nachweisbar ( $P < 0,025$ ). Im Gegensatz dazu gab es keinen signifikanten Unterschied zu den Proben, die mit Laktat oder Essigsäure behandelt wurden bzw. dessen laktathaltiges Medium neutralisiert wurde ( $P > 0,2$ ). Insgesamt war jedoch der alleinige Effekt durch Säurezugabe viel größer als der Effekt durch UVA-Strahlung.

Um zu überprüfen wie stabil der pH-Wert im Medium für eine Inkubation von mehreren Stunden bleibt, wurde auch dies getestet (Abb.18B). Dafür wurde Medium genau wie für das Invasionsexperiment vorbereitet und über Nacht gelagert. Der pH-Wert vor und nach der Inkubation wurde dokumentiert und zeigt, dass ein niedriger pH-Wert nicht sehr stabil gehalten werden konnte, dagegen der pH-Wert des mit NaOH neutralisierten Mediums sich nur minimal änderte und auf dem neutralen Niveau des unbehandelten Mediums blieb.

## 2. Der Effekt von UVA auf ein humanes Hautäquivalenzmodell

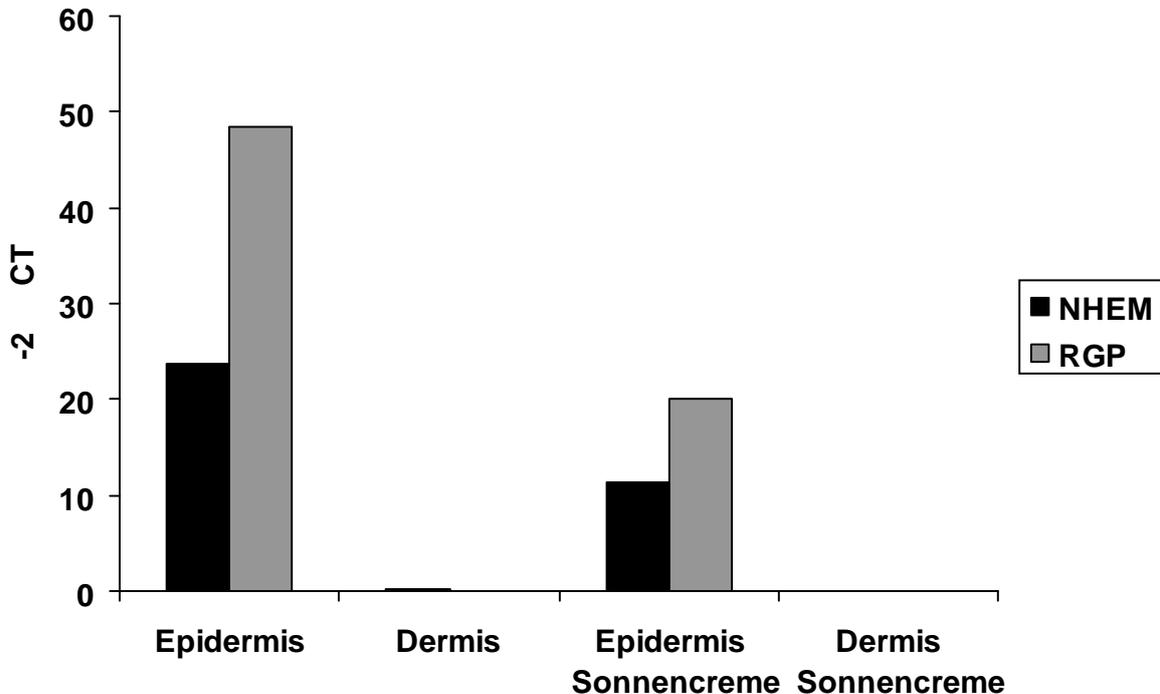
### 2.1 Die mitochondriale Common Deletion im Hautäquivalenzmodell

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit der Einfluss von UVA auf Melanomzellen verschiedener Wachstumsphasen *in-vitro* untersucht worden war, wurde der Effekt von UVA auf ein humanes Hautäquivalenzmodell überprüft. Ein Hautäquivalenzmodell besteht aus humanen Zellen der Haut (Keratinocyten, Fibroblasten, Melanozyten, Melanomzellen) und bildet ein dreidimensionales Modell der menschlichen Haut. Ein derartiges Modell hilft eine Brücke zu schlagen zwischen *in-vitro* Versuchen und *in-vivo* Versuchen, die meist mit Versuchstieren durchgeführt werden und nicht hundertprozentig auf Menschen übertragbar sind. Um einen ersten Hinweis von oxidativen Stress auf die Rekonstrukte zu erhalten, wurde der Gehalt der mitochondrialen Common Deletion nach UVA-Bestrahlung gemessen. Dazu wurden zwei verschiedene Konstrukte mit Melanozyten bzw. Melanomzellen erstellt und diese eine Woche lang mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA bestrahlt. Um einen protektiven Effekt von Sonnencreme (SC) auf die Konstrukte zu messen, wurde Sonnencreme auf die Inserts gegeben und mit UVA bestrahlt (Abb. D-19). Um den Effekt der Sonnencreme ohne UVA zu messen, wurden zusätzlich auch unbestrahlte Kontrollen mit Sonnencreme kultiviert. Anschließend wurde die DNA isoliert und anhand einer Real Time PCR die Common Deletion gemessen. Die Quantifizierung erfolgte über die  $2^{-CT}$ -Methode, so dass der Gehalt der Common Deletion in Relation zu den unbestrahlten Kontrollen angegeben ist (Abb. D-20).



**Abb. D- 19: Darstellung der Hautkonstrukte mit und ohne Sonnencreme.** Die Konstrukte wurden in Inserts in 24-well Platten kultiviert und mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA drei Mal täglich eine Woche lang bestrahlt. Der Sonnenschutz wurde nach der COLIPA-Norm auf die Konstrukte gegeben.

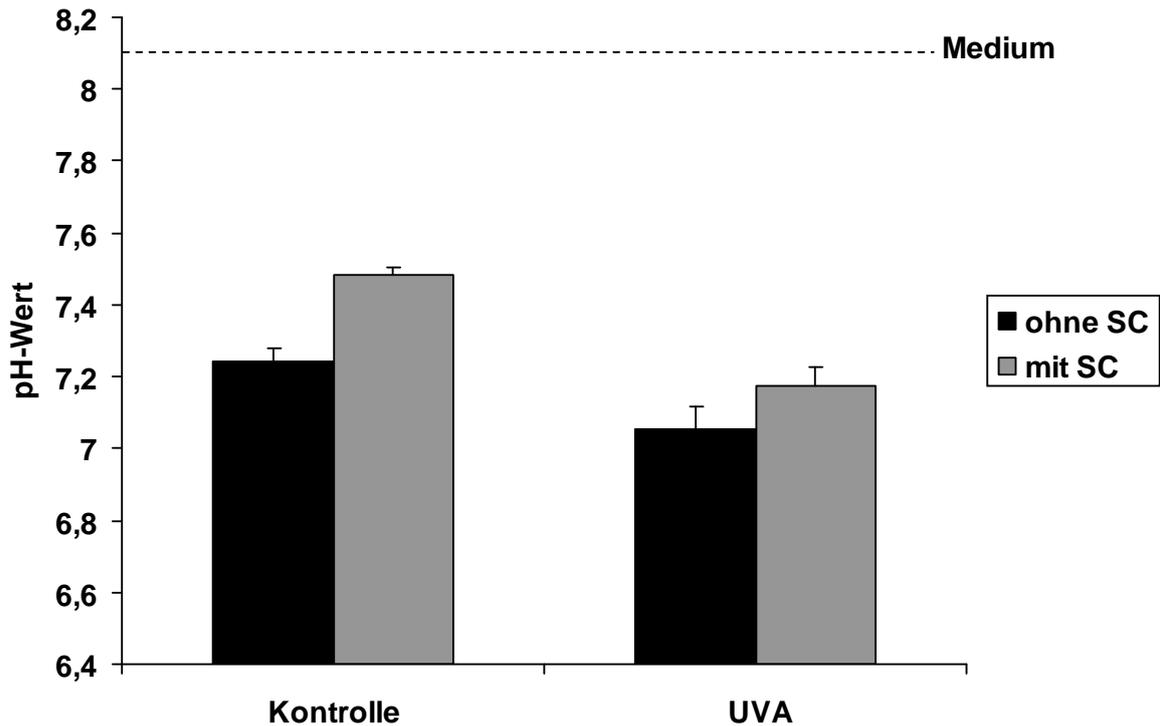
Die DNA wurde von der Epidermis und der Dermis getrennt voneinander isoliert. Dabei konnte nur in der Epidermis Common Deletion nachgewiesen werden. Der Gehalt der Common Deletion war nach der UVA-Bestrahlung in den RGP-Melanomzellen höher als in den Melanozyten, wobei der Lichtschutzfaktor die Menge der Common Deletion sowohl in der Epidermis mit Melanozyten als auch mit Melanomzellen um ca. die Hälfte minderte.



**Abb. D- 20: Messung der mitochondrialen Common Deletion im Hautäquivalenzmodell nach UVA-Bestrahlung.** Die Rekonstrukte wurden einerseits mit normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM) und andererseits mit der Melanomzelllinie WM 35 (RGP) hergestellt, eine Woche lang drei Mal täglich mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA bestrahlt und anschließend die Epidermis vom Rest des Rekonstruktes getrennt. Von diesen Proben wurde die DNA isoliert und die Common Deletion mit Hilfe einer Real Time PCR gemessen. Die Quantifizierung erfolgte durch die 2<sup>-CT</sup>-Methode (siehe Abschnitt C.5.5). Die Bestrahlung erfolgte in An- und Abwesenheit von Sonnenschutzcreme mit UVA+UVB-Filter.

## 2.2 Der Warburg-Effekt im Hautäquivalenzmodell

Als Ergänzung zu den *in-vitro* Untersuchungen des Warburg-Effekts im ersten Teil dieser Arbeit, wurden die Messungen des pH-Werts, des Glucoseverbrauchs und der Laktatproduktion mit den Hautäquivalenzmodellen wiederholt. Dazu wurden die Konstrukte in 24-well Platten eine Woche lang drei Mal täglich in PBS mit UVA bestrahlt. Dabei wurde je ein Konstrukt pro Well kultiviert um diese unabhängig voneinander testen zu können. Nach einer Woche Bestrahlung wurde das Medium abgenommen und die im Folgenden dargestellten Messungen durchgeführt. Der erste Hinweis auf einen erhöhten Warburg-Effekt nach UVA-Bestrahlung zeigt die Messung des pH-Werts (Abb. D-21).

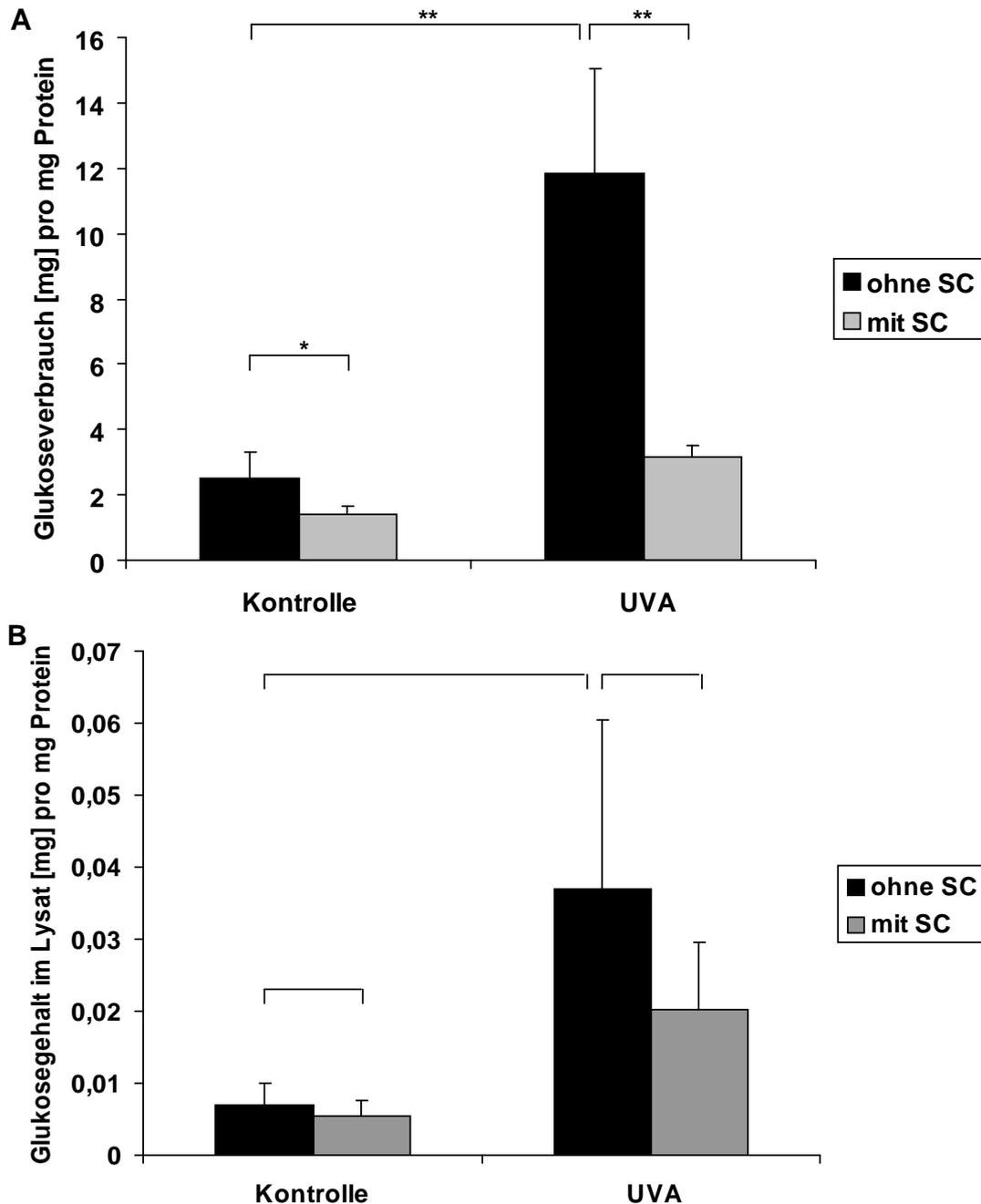


**Abb.D- 21: Messung des pH-Werts im Hautäquivalentmodell nach UVA-Bestrahlung.** Die Rekonstrukte wurden mit WM 1205 (MET) hergestellt, eine Woche lang drei Mal täglich mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA mit und ohne Sonnencreme (SC) bestrahlt und anschließend der pH-Wert des Mediums gemessen. Als Leerwert wurde zusätzlich der pH-Wert des reinen Mediums ermittelt (gestrichelte Linie). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten dargestellt.

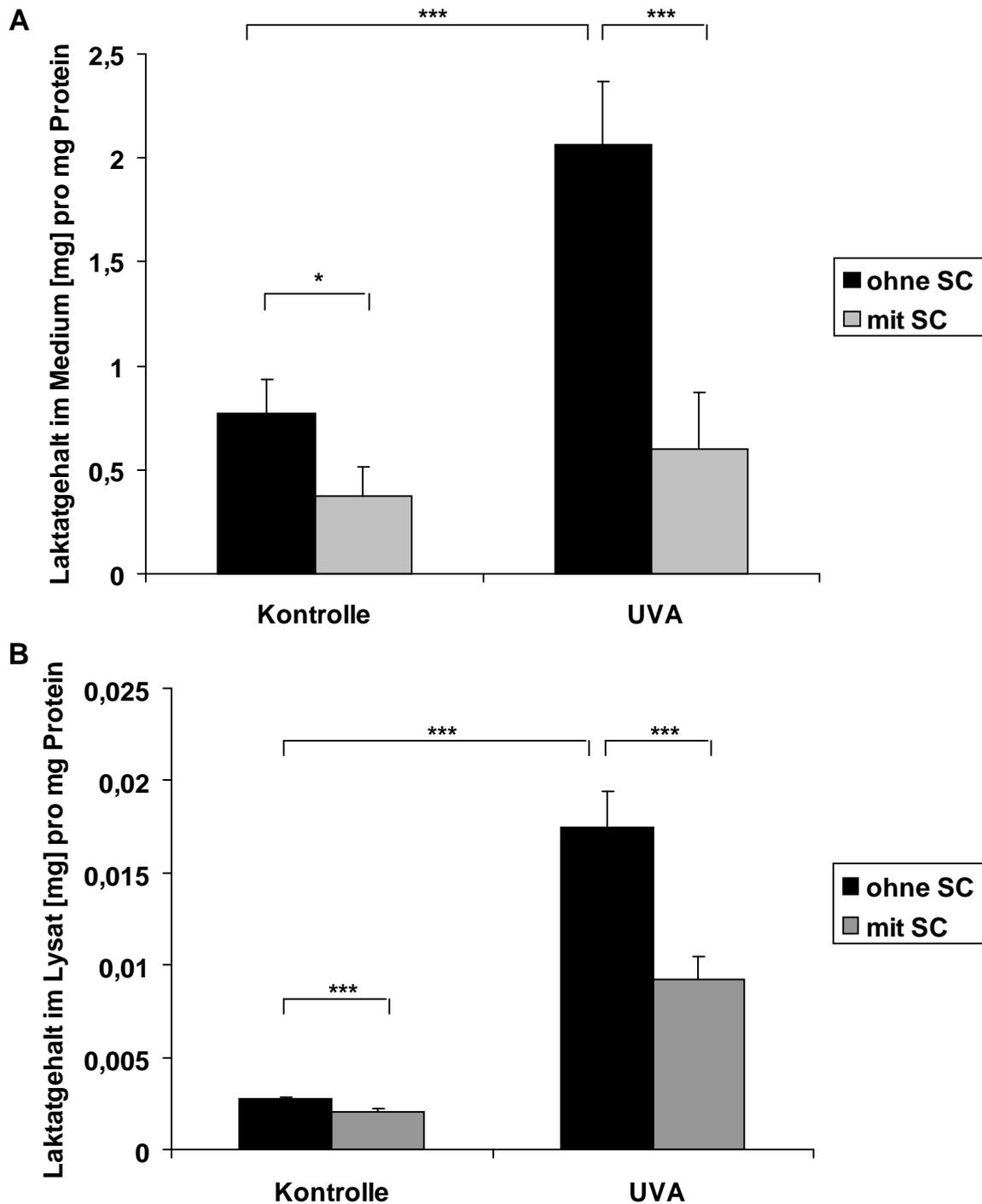
Sowohl in den Kontrollen als auch in den UVA-bestrahlten Proben fiel der pH-Wert im Vergleich zu reinem Medium nach einer Woche ab, welches einen pH-Wert von 8,1 aufwies. Der pH-Wert-Abfall der UVA-bestrahlten Konstrukte war stärker als die der Kontrollen. Dieser Effekt konnte durch Sonnencreme nach UVA-Bestrahlung deutlich abgeschwächt werden. Dabei zeigte Sonnencreme auch einen normalisierenden Effekt auf den pH-Wert bei unbestrahlten Kontrollen.

Anschließend wurde der Glucoseverbrauch ermittelt (Abb. D-22A). Dazu wurden der Glucosegehalt zu Beginn und am Ende des Experiments gemessen und an Hand des Mediumvolumens in den Wells berechnet, wie viel Glucose jedes einzelne Konstrukt verbrauchte. Normiert wurde dies auf den Proteingehalt des gesamten Konstrukts in mg. Dabei zeigte sich eine Erhöhung des Glucoseverbrauchs nach UVA-Bestrahlung um fast das 5-Fache der unbestrahlten Kontrollen in den Konstrukten mit MET-Melanomzellen ( $P < 0,0005$ ). Sonnencreme war dabei in der Lage den Glucoseverbrauch auf das Niveau der Kontrollen zu senken ( $P < 0,001$ ). Doch auch in den unbestrahlten Kontrollen konnte Sonnencreme einen leicht senkenden Effekt zeigen ( $P < 0,02$ ). Die Daten sind als Mittelwert von zwei unabhängigen Versuchen dargestellt, die je aus einer Triplet-Messung besteht.

Zusätzlich wurde der Glucosegehalt im Lysat der Konstrukte bestimmt, dabei wurden sehr geringe Glucosemengen ohne signifikante Unterschiede gemessen (Abb. D-22B;  $P > 0,05$ ). Diese Werte wurden auf den Proteingehalt normiert.



**Abb.D- 22: Messung des Glucoseverbrauchs im Hautäquivalenzmodell nach UVA-Bestrahlung.** Die Rekonstrukte wurden mit WM 1205 (MET) erstellt und eine Woche lang drei Mal täglich mit  $6 \text{ J/cm}^2$  UVA mit und ohne Sonnencreme bestrahlt. Anschließend wurde der Glucosegehalt des Mediums bestimmt und daraus der Verbrauch berechnet (A). Zusätzlich wurde der Glucosegehalt in den Lysaten ermittelt (B). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten mit Triplet-Messung dargestellt.

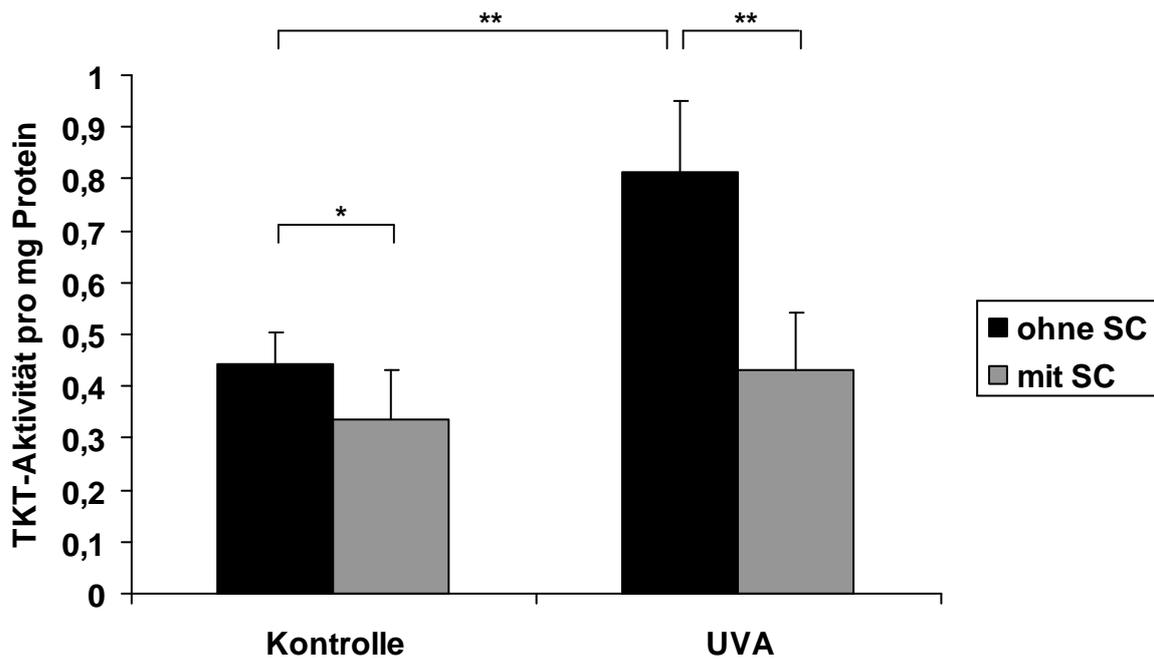


**Abb.D- 23: Messung der Laktatproduktion im Hautäquivalenzmodell nach UVA-Bestrahlung.** Die Rekonstrukte wurden mit WM 1205 (MET) hergestellt und eine Woche lang drei Mal täglich mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA mit und ohne Sonnencreme bestrahlt. Anschließend wurde der Laktatgehalt des Mediums bestimmt (A). Zusätzlich wurde der Laktatgehalt in den Lysaten gemessen (B). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten mit Triplet-Messung dargestellt.

Für die Laktatmessung wurden die Daten der gleichen Konstrukte dargestellt, wie sie auch für die Glucosemessung verwendet wurden (Abb. D-23). Dafür wurde der Laktatgehalt im Medium nach einer Woche UVA-Bestrahlung gemessen, wobei das unbehandelte Medium lediglich einen kaum messbaren Laktatgehalt zeigte. Die Messung zeigte in Korrelation mit den pH-Wert- und Glucosemessungen einen erhöhenden Effekt von UVA auf die Laktatproduktion (Abb.D-23A). Die Konstrukte mit MET-Melanomzellen produzierten nach UVA-Bestrahlung 3-mal so viel Laktat wie die unbestrahlten Kontrollen ( $P < 2,3 \cdot 10^{-5}$ ). Auch in diesem Fall konnte Sonnencreme den Effekt von UVA vermindern ( $P < 5,8 \cdot 10^{-6}$ ). Einen leichten, aber signifikanten Effekt konnte Sonnencreme ebenfalls bei den unbestrahlten Kontrollen aufweisen ( $P < 0,0011$ ). Der Laktatgehalt im Lysat der Konstrukte wurde in einen kaum messbaren Bereich ermittelt (Abb.D-23B). Dabei waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungen signifikant ( $P < 0,00002$ ). Diese Werte wurden auf den gesamten Proteingehalt der Konstrukte normiert.

### **2.3 Die Aktivität der Transketolase im Hautäquivalenzmodell**

Da sich in den *in-vitro* Experimenten ein Effekt von UVA auf die Transketolase-Aktivität der Melanomzellen zeigte, wurde auch dieses Experiment mit dem Hautäquivalenzmodell durchgeführt. Nach einer Woche UVA-Bestrahlung wurde aus den Konstrukten ein Lysat erstellt und dieses in den Transketolase-Assay eingesetzt. Die Lysate stammen aus denselben Versuchen, aus denen die Glucose- und Laktatmessung hervorgingen. Die Messwerte wurden auf die jeweilige Proteinmenge in mg normiert. Dabei erhöhte UVA die Transketolase-Aktivität um das Doppelte im Vergleich mit der unbestrahlten Kontrolle bei den Konstrukten mit metastasierenden Melanomzellen ( $P < 0,0007$ ). Sonnencreme verminderte die Transketolase-Aktivität nach UVA-Bestrahlung auf das Niveau der Kontrollen ( $P < 0,0005$ ), dabei konnte ein leicht normalisierender Effekt von Sonnencreme auch bei den unbestrahlten Kontrollen nachgewiesen werden ( $P < 0,05$ ).



**Abb.D- 24: Messung der Transketolase-Aktivität im Hautäquivalenzmodell nach UVA-Bestrahlung.** Die Rekonstrukte wurden mit WM 1205 (MET) hergestellt und eine Woche lang drei Mal täglich mit 6 J/cm<sup>2</sup> UVA mit und ohne Sonnencreme bestrahlt. Anschließend wurde ein Lysat hergestellt und in diesem die Aktivität der Transketolase gemessen. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von zwei unabhängigen Experimenten mit Triplett-Messung dargestellt.

## **E. Diskussion**

### **1. Effekt von UVA auf die Physiologie von Melanomzellen**

#### ***1.1 Einfluss von UVA auf die Mitochondrien***

Die Daten der vorliegenden Arbeit weisen auf einen Einfluss von UVA neben UVB auf die Pathogenese des malignen Melanoms hin. Dabei generiert UVA ROS und wirkt somit indirekt auf die Zelle. Es konnte gezeigt werden, dass die mitochondriale Common Deletion in menschlicher Haut nach chronischer UVA-Belastung nachweisbar ist (Berneburg, Plettenberg et al. 2000; Koch, Wittern et al. 2001). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Common Deletion in Melanomzellen verschiedener Wachstumsphasen nachweisbar ist und im Laufe der Zeit zunimmt. Dagegen nimmt die Common Deletion in normalen Melanozyten zwar auch zu, dies aber in deutlich geringeren Maß. Der größte Effekt zeigte sich in Melanomzellen, die aus der invasiveren vertikalen Wachstumsphase stammen. Interessanterweise war der Gehalt der Common Deletion in metastasierenden Melanomzellen auf einem ähnlichen Level wie die Melanomzellen der nichtinvasiven radiären Wachstumsphase. Dies konnte einen Hinweis darauf geben, dass im Laufe der Progression des Melanoms an einem bestimmten Punkt ein Maximum von mitochondrialen DNA-Schäden erreicht ist, was letzten Endes zur Metastasierung führen könnte. Ist dieser Schritt einmal überschritten, wird dieser hohe Gehalt nicht mehr nachweisbar, der Krebs jedoch streut Metastasen. So wurde schon zuvor gezeigt, dass mitochondriale DNA-Mutationen über erhöhte ROS-Produktion in den Mitochondrien die Metastasierung von Krebszellen begünstigt (Ishikawa, Takenaga et al. 2008). Dies bestätigte sich kürzlich für die Invasivität von Melanomzellen, die in Medium mit ROS kultiviert worden waren (Taddei, Giannoni et al. 2012). Des Weiteren konnte in der Haut von hellhäutigen Patienten mit Melanom eine höhere Menge an Common Deletion gefunden werden, als in der Haut von dunkelhäutigen Patienten (Hubbard, Steinberg et al. 2008). Bei Patienten, die vergleichsweise spät im Leben an Melanom erkrankten, zeigte sich dabei ein höherer Gehalt an Common Deletion als bei den jüngeren Patienten. In Nicht-Melanom-Hautkrebs war allerdings keine erhöhte Menge an Common Deletion messbar, wohingegen dessen Gehalt während des Alterungsprozesses ansteigt (Eshaghian, Vleugels et al. 2006). Es gibt eindeutige Hinweise darauf, dass Zwischenprodukte der Glykolyse wie Pyruvat effektive Radikalfänger sind (Salahudeen, Clark et al. 1991; Brand 1997). Verglichen mit Pyruvat ist Laktat zwar ein weniger effizienter Radikalfänger, doch in manchen Bereichen solider Tumoren liegen die Laktatkonzentrationen bei über 30 mM. Bei solch hohen Konzentrationen ist es wahrscheinlich, dass Laktat Radikale inaktivieren kann (O'Donnell-Tormey, Nathan et al. 1987; Groussard, Morel et al. 2000). Diese Reduzierung der ROS-Bildung durch in dieser Arbeit ebenfalls nachgewiesene stark erhöhte Laktatkonzentration in metastasierenden

Melanomzellen nach UVA-Bestrahlung könnte ebenfalls eine Erklärung dafür sein, dass in den metastasierenden Zellen ein geringerer Gehalt von Common Deletion zu messen war. Da ein erhöhter Gehalt der Common Deletion nach UVA-Bestrahlung in unterschiedlichen Melanomzellen gefunden werden konnte, wurde die Atmungsrate jener Zellen gemessen. Die Atmungsraten der unbestrahlten Melanomzellen stiegen leicht an im Vergleich zu den normalen Melanozyten, dieser Unterschied ist allerdings nicht signifikant. Ähnliches konnte in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass die Atmungsraten von Wildtypzellen und Tumorzellen ungefähr gleich sind (Chance and Castor 1952; Chance and Hess 1959). Die UVA-bestrahlten normalen Melanozyten zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Atmungsrate im Vergleich zu den Kontrollen, so wie sie auch nur einen sehr geringen Anstieg der Common Deletion zeigten. Dagegen war die Atmungsrate der Melanomzellen nach UVA-Bestrahlung geringer als in den unbestrahlten Kontrollen, dies deutet auf eine verminderte Funktion der Mitochondrien hin. Dabei korrelieren die Daten mit dem Gehalt der Common Deletion. So nahm die Differenz zwischen Kontrollen und bestrahlten Zellen von der radiären Wachstumsphase bis zur vertikalen Wachstumsphase zu. Doch nahm dieser Unterschied in den metastasierenden Zellen wieder ab. Es gibt Veröffentlichungen, die einen Zusammenhang herstellen zwischen der Atmungsrate und der Progression von Tumoren. So wurde der oxidative Stoffwechsel in Leberzellen ausgeschaltet, woraufhin die Tumorzellen invasiver wurden (Thierbach, Schulz et al. 2005). Die gleiche Arbeitsgruppe konnte mit Hilfe des Proteins Frataxin in Mitochondrien Dickdarmkrebszellen zur Atmung zwingen und daraufhin bildeten Versuchstiere weniger bösartige Geschwülste (Schulz, Thierbach et al. 2006). Diese beiden Publikationen stützen des Weiteren die Warburg-Hypothese, nach der Krebszellen vermehrt Glucose zu Laktat vergären.

### ***1.2 Hinweise zeigen einen erhöhten Warburg-Effekt durch UVA***

Die vorliegenden Daten über die reduzierten Atmungsraten von Melanomzellen nach UVA-Bestrahlung gaben einen ersten Hinweis auf eine Erhöhung des Warburg-Effekts durch UVA. Dies bestätigte sich in den darauf folgenden Experimenten. Nach einer UVA-Bestrahlung sank der pH-Wert des Mediums stärker ab als in den Kontrollen. Da durch den Warburg-Effekt Laktat gebildet wird (Warburg 1956), sinkt der pH-Wert durch vermehrte Laktatproduktion stärker ab als in den Kontrollen. Aber im Medium der unbestrahlten Melanomzellen ist der pH-Wert stark abgefallen, was darauf hindeutet, dass die Melanomzellen von sich aus Laktat bilden und damit den Warburg-Effekt zeigen. Der Warburg-Effekt bedeutet für die Zellen, dass sie einen erhöhten Glucoseumsatz haben um genug Energie bereitzustellen. Es zeigte sich, dass der Glucoseverbrauch nach der UVA-Bestrahlung, sowohl in Melanomzellen der radiären Wachstumsphase als auch in

metastasierenden Melanomzellen erhöht war. Durch das Erzwingen der Gärung durch eine Kultivierung unter Hypoxie-Bedingung, konnte ein Grundlevel ermittelt werden, wie viel Glucose die Melanomzellen bei gleichzeitiger Gärung zu Laktat verbrauchen. Dabei zeigte sich, dass radiäre Melanomzellen unter Normoxie-Bedingung weniger Glucose verbrauchen. Dagegen war der Glucoseverbrauch in den metastasierenden Zellen in beiden Kultivierungsbedingungen auf einem ähnlichen Niveau. Dies spricht dafür, dass die weniger invasiven Melanomzellen noch keinen sehr starken Warburg-Effekt haben. Dagegen ist der Warburg-Effekt bei den metastasierenden Zellen auch unter Normoxie-Bedingung stark ausgeprägt, was durch UVA-Bestrahlung zusätzlich verstärkt wird. Dies spiegelt sich auch in den Daten für die Laktatproduktion wieder. UVA verstärkt in allen Fällen die Laktatproduktion. Allerdings ist der Unterschied in den metastasierenden Melanomzellen unter Normoxie- und Hypoxie-Bedingung etwas deutlicher. Die Experimente wurden zusätzlich mit Medium durchgeführt, welches mit hitzeinaktivierten FCS komplementiert wurde. Als Kontrollexperiment wurden sowohl die Glucose, als auch die Laktatmessungen mit nativen FCS durchgeführt. In diesen Fällen war die Laktatdehydrogenase, die laut Hersteller mit einer Aktivität von 712 U/l gemessen wurde, aktiv und konnte das durch den Warburg-Effekt produzierte Laktat zu Pyruvat oxidieren. Zum Vergleich, unter physiologischen Bedingungen beträgt die Serumaktivität der Laktatdehydrogenase 240 U/l beim Menschen. Die Laktatproduktion war nach UVA-Bestrahlung wesentlich geringer, was darauf hinweist, dass Laktat oxidiert wurde und nicht mehr im großen Maß messbar waren. Gleichzeitig verringerte sich auch der Glucoseverbrauch, denn durch die Laktatdehydrogenase kann das Laktat zu Pyruvat abgebaut werden und steht der Zelle für die Glukoneogenese oder den Citratzyklus zur Verfügung. In beiden Fällen benötigt die Zelle weniger Glucose aus dem Medium und der Glucoseverbrauch ist nicht erhöht.

Die Zellen produzierten nach UVA-Bestrahlung ungefähr 20-25 mM Laktat, nach einer kürzlich veröffentlichten Untersuchung sind 40 mM bei Fibrosarkomzellen tödlich (Leontieva and Blagosklonny 2011). Diese Tumorzellen produzieren nach 3 Tagen in Kultur ca. 30 mM Laktat. Die hier untersuchten Melanomzellen bleiben unter dieser toxischen Dosis und es zeigt sich, dass die hier gemessene Laktatmenge realistisch ist.

Laktat sammelt sich mehr bei den metastasierenden Zellen im Medium an verglichen mit den radiären Melanomzellen. Dies passt zu mehreren unabhängigen Studien, die zeigen, dass eine Akkumulierung von Laktat in menschlichen Tumoren mit einem höheren Malignitätsgrad, einer höheren Aggressivität und schlechteren Prognosen der Patienten verbunden ist (Walenta, Salameh et al. 1997; Walenta, Wetterling et al. 2000; Brizel, Schroeder et al. 2001; Walenta, Chau et al. 2003). In einer weiteren Veröffentlichung konnte durch zugeführtes Laktat intrazellulär ein reduzierter Status und ein relativ hohes  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$ -Verhältnis erzeugt werden (Hoffmann, Gloe et al. 2001). Man bezeichnet dies im

Unterschied zu „hypoxischer Hypoxie“ durch unzureichende Sauerstoffversorgung als „chemisch induzierte Hypoxie“ (Sattler, Walenta et al. 2007). Dies könnte in Tumoren relevant sein, die einen hohen Laktatgehalt aufweisen, dessen Zellen unabhängig von der Sauerstoffzufuhr permanent einer reduzierenden Umgebung ausgesetzt sind und dadurch aggressiver werden. Dieser Effekt könnte ebenfalls durch Laktat hervorgerufen werden, dass die Zellen über den Warburg-Effekt selbst produziert. Der Redoxstatus solider Tumore ist bisher nicht sehr stark berücksichtigt worden. Dieser lässt sich durch das  $\text{NADH}+\text{H}^+/\text{NAD}^+$ -Verhältnis charakterisieren, welches besonders von der Glykolyse und der Atmung abhängt. Insofern steht es in enger Beziehung zur Umwandlung von Laktat zur Pyruvat. Des Weiteren liegt eine Verbindung des Stoffwechsels mit dem intrazellulären Redoxsystem Glutathion vor, wobei der initiierte Schritt des Pentosephosphatweges entscheidend dazu beiträgt Glutathion im reduzierten Zustand zu halten.

### **1.3 Der Effekt von UVA auf die Transketolase**

Ein Schlüsselenzym des Pentosephosphatweges ist die Transketolase und die Isoform TKTL-1 wird mit dem Warburg-Effekt in Krebszellen in Verbindung gebracht (Coy, Dressler et al. 2005). Weder der Effekt von UVA auf die TKTL-1 noch dessen Expression im malignen Melanom wurden bisher in der Literatur näher untersucht. Mit Hilfe eines Transketolase-Assays konnte die Aktivität der Transketolase in dieser Arbeit nach UVA-Bestrahlung gemessen und mit unbestrahlten Kontrollen verglichen werden. Dabei stieg die gesamte Transketolaseaktivität nach der Bestrahlung deutlich an. Dies erlaubt allerdings keinen direkten Hinweis auf die Aktivität der Isoform TKTL-1. In einer Veröffentlichung wurde zwar ein Aktivitäts-Assay für TKTL-1 in Tumorzellen durchgeführt, wobei die Eignung dieser Methode allerdings umstritten ist (Coy, Dressler et al. 2005). Dabei konnte nur eine minimale Enzymaktivität nach einer für Enzym-Assays extrem lange Inkubationszeit gezeigt werden. Allerdings geben die hier vorliegenden Daten einen Hinweis darauf, dass UVA einen Einfluss auch auf die TKTL-1 haben könnte. Die Aktivität war nach Inkubation unter Hypoxie-Bedingung um das Doppelte erhöht. Eine Immunofärbung mit Antikörpern für TKTL-1 zeigten eine Präsenz dieses Proteins sowohl in unbestrahlten Melanomzellen als auch in bestrahlten Melanomzellen, wobei eine leicht stärkere Präsenz in den radiären und metastasierenden Melanomzellen nach UVA zu sehen war. Dieser Effekt war in den vertikalen Melanomzellen am stärksten messbar. Die Kulturbedingung dagegen schien in dieser Hinsicht keinen Einfluss zu haben. Dies bestätigt sich durch die gemessenen Expressionsunterschiede der TKTL-1 auf mRNA-Ebene. Verglichen mit den Kontrollen war die *TKTL-1* in den Melanomzellen der radiären Wachstumsphase doppelt so hoch exprimiert, und 1,5-fach erhöht in den metastasierenden Melanomzellen. Wobei die Expression trotzdem in

Kontrollen und UVA-bestrahlten Melanomzellen relativ gering ist. 2007 konnte ein Zusammenhang hergestellt werden zwischen dem *TKTL-1*-Gen und der gesamten Transketolaseaktivität (Hu, Yang et al. 2007). Dabei konnte durch die Hemmung der *TKTL-1*-Expression die Aktivität der gesamten Transketolase gesenkt werden, so dass auch im vorliegenden Fall die stark erhöhte TKT-Aktivität und die erhöhte *TKTL-1*-Expression in Verbindung stehen könnten. Für verschiedene andere Tumorarten konnte gezeigt werden, dass die *TKTL-1*-Expression mit einem höheren Tumorstadium korreliert (Staiger, Coy et al. 2006; Kohrenhagen, Voelker et al. 2008; Volker, Hagemann et al. 2008). Zudem führte ein Gen-Silencing der *TKTL-1* zu einer Inhibierung der Tumorpheriferation in Leberzellkarzinom, Dickdarmkarzinom und Nasopharynxkarzinom (Hu, Yang et al. 2007; Zhang, Yang et al. 2007; Zhang, Yue et al. 2008). In dieser Arbeit konnte dagegen im malignen Melanom keine stark erhöhte Expression nach UVA-Bestrahlung in den metastasierenden Zellen gemessen werden im Vergleich zu den weniger invasiven Melanomzellen. Diese Beobachtungen machte auch eine andere Gruppe in 6 verschiedenen getesteten malignen Tumorzelllinien (Mayer, Von Wallbrunn et al. 2010). Dabei war die *TKTL-1*-Expression auf einem sehr niedrigen Niveau bzw. nicht messbar, auch unter hypoxischer Bedingung konnte keine nennenswerte Hochregulierung gemessen werden. Dies spricht gegen eine Rolle der *TKTL-1* in den hypoxischen Bereichen eines Tumors. In dieser Veröffentlichung werden die von Coy et al. verwendeten Methoden stark kritisiert, indem sie die gleichen Antikörper und Primer benutzen, aber dessen Ergebnisse nicht reproduziert werden konnten. Für die vorliegende Arbeit wurden allerdings Primer für das *TKTL-1*-Transkript selbst erstellt und es wurden andere Antikörper verwendet. Hierdurch wurde versucht Kritikpunkte zu adressieren. Auch wenn die *TKTL-1*-Expression nicht sehr hoch ist, konnte diese durch UVA stärker induziert werden. Die Inkubation unter Hypoxie-Bedingung lässt die *TKTL-1* auf ein ähnliches Niveau hochregulieren wie nach Inkubation in Sauerstoff-Atmosphäre. Dies deckt sich mit den Ergebnissen des Warburg-Effekts, was zusammen genommen auf eine Rolle der *TKTL-1* im malignen Melanom hindeutet. Nach Zugabe des Transketolase-Hemmers Oxythiamin konnte eine Verminderung des Warburg-Effekts beobachtet werden, was sich einerseits in einen niedrigeren Glucoseverbrauch und eine niedrigere Laktatproduktion als auch in einer Neutralisierung des pH-Werts nach UVA-Bestrahlung zeigte. Dies lässt durchaus die Vermutung zu, dass die Transketolase einen erniedrigenden Einfluss auf den Warburg-Effekt hat. Das passt auch zu Untersuchungen, nach denen Oxythiamin das Tumorstadium hemmen konnte (Boros, Puigjaner et al. 1997; Rais, Comin et al. 1999). Andererseits konnte in einer früheren Arbeit von Braun durch Oxythiamin keine Änderung der Laktatproduktion in Tumorzellen festgestellt werden (Braun, Puskas et al. 1997). Dabei muss allerdings erwähnt werden, dass Oxythiamin alle Transketolase hemmt und nicht nur die *TKTL-1*. Man kann nicht bedingungslos davon ausgehen, dass *TKTL-1* und Warburg-Effekt in direkter

Verbindung zueinander stehen. Da auch gesundes Gewebe TKTL-1 positiv sein kann (Bau 2006), ist sie nicht tumorspezifisch. Genauso wenig exprimieren alle Tumore *TKTL-1*, auch wenn sie sehr aggressiv sind. Dies alles zeigt, dass die Rolle der TKTL-1 bei Krebserkrankungen noch weiterer Untersuchungen bedarf. Hier konnte gezeigt werden, dass Melanomzellen positiv für die TKTL-1 sind und dass UVA einen leichten hochregulierenden Effekt auf die TKTL-1 zu haben scheint. Zusätzlich zeigte sich einen Effekt der allgemeinen Transketolase-Aktivität auf den Warburg-Effekt.

### **1.4 Die Invasivität von Melanomzellen als Folge des Warburg-Effekts**

Nachdem es Hinweise darauf gibt, dass UVA den Warburg-Effekt verstärkt, stellt sich nun die Frage, ob und wie dies mit der Tumorprogression einhergeht. Da Akt erwiesenermaßen bei der Progression von Melanomzellen eine Rolle spielt (Stahl, Sharma et al. 2004; Meier, Busch et al. 2006), war es interessant zu erfahren, welchen Einfluss UVA auf diesen Progressionsmarker hat. Dabei konnte gezeigt werden, dass Akt durch eine UVA-Bestrahlung zusätzlich induzierend auf Melanomzellen wirkt. Dieser Effekt war unter Hypoxie höher als unter Normoxie. Interessanterweise konnte dies nur unter Normoxie-Bedingung durch Trolox gesenkt werden, nicht jedoch nach Inkubation in hypoxischer Umgebung. Der Transketolaseinhibitor senkte die Akt-Expression nach Kultivierung in normaler Sauerstoffatmosphäre, wogegen der gegenteilige Effekt nach Hypoxie beobachtet werden konnte. Dies gibt einen Hinweis, dass sich die gehemmte Transketolase in den Normoxie-Zellen positiv auf den Progressionsmarker auswirkt, was dagegen in hypoxischer Umgebung nicht der Fall ist. Zieht man frühere Untersuchungen heran, zeigen die hier dargestellten Daten einen Zusammenhang von UVA mit Akt-Expression und dem Warburg-Effekt. Demnach stimuliert Akt in Mäusen die aerobe Glykolyse von Tumorzellen (Elstrom, Bauer et al. 2004), was darauf hinweist, dass UVA die Akt-Expression stimuliert und dies dann zur Induktion des Warburg-Effekts führt. Dabei zeigen die UVA-bestrahlten Melanomzellen einen erhöhten Glucoseverbrauch. Dies entspricht früheren Daten, dass Krebszellen, die Akt überexprimieren auf Glucose als Energiequelle angewiesen sind und andere Substrate wie Fett nicht verwerten können (Buzzai, Bauer et al. 2005). Das Umschalten des Stoffwechsels zur aeroben Glykolyse konnte im Darmkrebs und Lungenkrebs mit einer schlechteren Prognose von Tumorpatienten in Verbindung gebracht werden (Cuezva, Krajewska et al. 2002; Cuezva, Chen et al. 2004). Zellen mit diesem glycolytischen Stoffwechsel weisen eine erhöhte ROS-Produktion auf und Akt überexprimierende Melanomzellen zeigten einen erhöhten Gehalt an intrazellulären ROS (Lambeth, Cheng et al. 2000; Govindarajan, Sligh et al. 2007). So könnte letztendlich der durch UVA vermittelte hohe ROS-Level der bestrahlten Melanomzellen zur Überexpression von Akt führen. Aber Akt wirkt zusätzlich über einen

anderen Weg auf die Invasivität von Tumorzellen. So zeigte sich, dass Akt das Adhensionsprotein  $\beta$ -Catenin phosphoryliert, welches auch bei der Signaltransduktion im WNT-Signalweg eine Rolle spielt und dies die Metastasierung des Tumors erhöht (Fang, Hawke et al. 2007). Des Weiteren zeigte sich das Tumorsuppressorprotein p53 als Gegenspieler von Akt in einem Gleichgewicht mit diesem stehen muss (Gottlieb, Leal et al. 2002). Während p53 durch zellulären Stress die Apoptose einleitet und gleichzeitig Akt inhibiert, blockt Akt p53 über den Regulator Mdm2 (murine double minute oncogene) die p53-induzierte Apoptose. Eine Akt-Überexpression wirkt dadurch erhöhend auf das Tumorstadium. Da Akt an der Progression von Melanomzellen beteiligt ist und zur Konvertierung von Melanomzellen der radiären Wachstumsphase in die invasivere vertikale Wachstumsphase führt, würde nach dieser Argumentation UVA die Invasivität von Melanomzellen erhöhen. Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit anhand von Boyden Chambers eine erhöhte Invasivität nach UVA-Bestrahlung gemessen werden. Dabei waren die metastasierenden Kontrollzellen auch ohne extra UVA-Bestrahlung erwartungsgemäß invasiver als die Melanomzellen der radiären Wachstumsphase. Nach Inkubation unter Hypoxie-Umgebung waren die Kontrollen beider Zelllinien in ihrer Invasivität auf einem ähnlichen Niveau. Wobei sich ansonsten ein vergleichbares Bild wie in den oxygenierten Zellen zeigte. Unter Hypoxie wird die Laktatproduktion unabhängig vom Warburg-Effekt erzwungen und lässt die Invasivität ansteigen. Wie oben erwähnt, wirkt UVA nicht direkt auf die Invasivität und es liegt der Verdacht nahe, dass Laktat als Produkt eines erhöhten Warburg-Effekts dabei eine Rolle spielt. Dies bestätigten Boyden Chamber Experimente, in denen die bestrahlten Melanomzellen mit extra Laktat zugesetzt worden waren. Dabei konnte die Invasivität signifikant gesteigert werden im Vergleich zu den Melanomzellen, die nach der Bestrahlung kein zusätzliches Laktat erhielten. Auch die Kontrollen zeigten diesen Effekt. Das Kontrollexperiment mit zugesetzter Essigsäure erhärtet den Verdacht, dass der pH-Wert dabei eine Rolle spielt. Denn eine starke Laktatproduktion führt zu einem sauren und damit toxischen Mikromilieu in der direkten Umgebung von Tumorzellen. Ein weiteres Kontrollexperiment mit Medium, dessen pH-Wert nach Laktatzugabe neutralisiert worden war, zeigte allerdings keine Minderung der Invasivität. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der pH-Wert nicht alleine für eine erhöhte Invasivität verantwortlich ist. Noch sind die zugrundeliegenden Mechanismen der Zusammenhänge zwischen Laktat und Malignität auch in der Literatur nicht vollständig aufgeklärt. Doch gibt es einige Aspekte, die dabei erwähnenswert sind. So konnte gezeigt werden, dass Laktat *in vitro* mit der Immunabwehr interagiert, in dem es die antionkogene Aktivität dendritischer Zellen inhibiert (Gottfried, Kunz-Schughart et al. 2006). Der Glucosestoffwechsel konnte mit einer Sensibilität gegenüber ionisierenden Strahlen in Verbindung gebracht werden, indem die Glykolyse in HeLa-Zellen gehemmt wurde (Lin, Zhang et al. 2003). Darüber hinaus zeigten humane

Tumorxenotransplantate nach einer fraktionierten Bestrahlung mit hoher Laktatkonzentration eine signifikant höhere Strahlungsresistenz als die Proben mit niedrigerer Laktatkonzentration (Quennet, Yaromina et al. 2006). Dabei war diese Strahlenresistenz interessanterweise unabhängig davon ob der Tumor gut oxygeniert oder hypoxisch waren (Yaromina, Zips et al. 2006). Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass dieser Zusammenhang auch bei UVA-Strahlung bestehen könnte. Dazu kommt, dass in dieser Arbeit der saure pH-Wert im Medium durch Laktat über Nacht nicht stabil gehalten werden konnte, was auf eine Pufferwirkung der Proteine im Kulturmedium zurück zu führen ist. Dies deckt sich mit Beobachtungen, dass Matrix Metallproteinasen (MMP) über eine kurzzeitige pH-Wert-Senkung mit anschließender pH-Wert-Neutralisierung aktiviert werden (Davis 1991; Gunja-Smith and Woessner 1993; Wilhelm, Shao et al. 1993; Tjaderhane, Larjava et al. 1998). Für eine Metastasierung und damit die Migration einzelner Melanomzellen durch die Basalmembranen, Blut- und Lymphgefäße bis hin zur Bildung von Metastasen ist ein komplexes Zusammenspiel von Tumorzellen mit der extrazellulären Matrix und dem tumorumgebenden Bindegewebe notwendig (Hofmann, Becker et al. 2002). Letzteres erfolgt durch proteolytische Enzyme zu denen MMPs zählen. Die Familie der MMPs zählt 28 Mitglieder, die als Proenzyme synthetisiert werden und anschließend aktiviert werden müssen. Die extrazelluläre Matrix der Boyden Chambers besteht aus Kollagen I, Kollagen IV und Laminase, welche durch MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9, MMP-10, MMP-13 und MMP-18 degradiert werden können (Kerscher 2004). Eine oben erwähnte Aktivierung durch den pH-Wert konnte für MMP-2, MMP-3, MMP-8 und MMP-9 nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten MMP-1, MMP-3 und MMP-9 durch UVB-Strahlung in humanen Fibroblasten induziert werden (Brenneisen, Wenk et al. 1998). UVB führt dabei unter anderem durch die Aktivierung von Wachstumsfaktor- und Zytokinrezeptoren über den MAP-Kinase-Weg zur Expression von c-Jun und c-Fos, was wiederum zu Expression von MMP führt (Fisher, Talwar et al. 1998). Es ist denkbar, dass UVA ebenfalls zu einer Induktion von MMP führen kann und gleichzeitig MMP durch die kurzfristige pH-Wert-Senkung durch Laktat aktiviert werden könnte und letztendlich zu einer erhöhten Invasivität der Melanomzellen führt. Dass der pH-Wert im Medium nach einer Woche UVA-Bestrahlung allerdings niedriger war als in den Kontrollen, könnte daran liegen, dass die Zellen immer wieder Laktat produzieren und so der pH-Wert während der Woche Bestrahlung schwankt. Laktat scheint bei einmaliger Zugabe den sauren pH-Wert nicht lange halten zu können, doch durch das ständige Produzieren von Laktat der Zellen wird der pH-Wert immer wieder gesenkt.

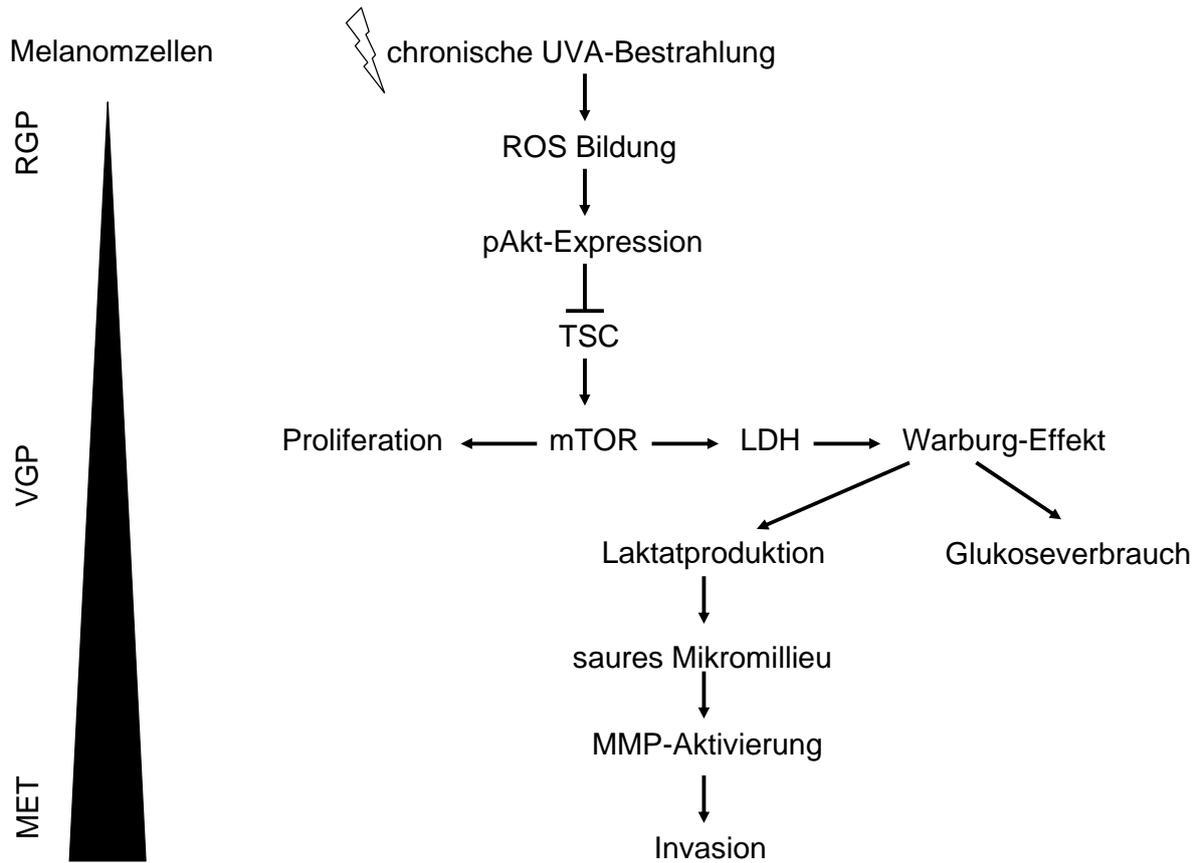
#### **1.4 Der Einfluss von UVA auf die Seneszenz**

Seneszenz gilt als ein schützender Mechanismus um Zellen vor einer Entartung zu bewahren (Michaloglou, Vredeveld et al. 2005). Dazu gehen seneszente Zellen in den Zellarrest. Seneszente Zellen zeichnen sich durch eine große und flache Morphologie aus und exprimieren die Seneszenz-assoziierte  $\beta$ -Galaktosidase (SA- $\beta$ -Gal) (Dimri, Lee et al. 1995). Dieser Marker wurde in dieser Arbeit genutzt um den Einfluss von UVA auf die Seneszenz zu messen. Dabei zeigte sich, dass die Melanomzellen der vertikalen Wachstumsphase eine geringere Seneszenz aufwiesen, als sie eine Woche lang mit UVA bestrahlt wurden. Diese Zellen sind in ihrer Entwicklung invasiver und sind in der Lage vertikal in die Haut zu wachsen, der nächste Entwicklungsschritt ist die Bildung von Metastasen. Seneszenz würde diese Melanomzellen daran hindern weiter zu proliferieren und sich auszubreiten. So wie auch die voran gegangenen Experimente zeigten, hat UVA einen erhöhenden Effekt auf die Invasivität der Melanomzellen. Dies deckt sich mit dem Ergebnis, dass die Seneszenz durch UVA erniedrigt wird und dieser für den Organismus schützender Effekt verhindert wird. Ein anderes Bild zeigten die Daten der metastasierenden Melanomzellen nach UVA-Bestrahlung. In diesem Fall wurde die Seneszenz nach der Bestrahlung erhöht. Die Melanomzellen dieser Wachstumsphase wuchsen aber trotzdem stark weiter, dies erscheint auf den ersten Blick ein Widerspruch zu sein. Doch es gibt Hinweise, dass Seneszenz-Marker während der Progression von Tumoren erhöht sind (Wasco, Pu et al. 2008). Zusätzlich beobachtete eine kürzlich erschienene Veröffentlichung ebenfalls ein derartiges Phänomen in Melanomzellen (La Porta, Zapperi et al. 2012). Die meisten Krebszellen werden letztendlich seneszent, doch macht dies auf längerer Sicht keinen Unterschied im Tumorwachstum. Nur eine kleine Fraktion innerhalb der Population von Melanomzellen geht in Seneszenz (Bonnet and Dick 1997). So kann man zwar Seneszenz messen, die Melanomzellen wachsen aber trotzdem weiter. Dabei schlussfolgert man, dass Seneszenz keine relevante Barriere gegen das Tumorwachstum ist und eine Erhöhung der Seneszenz auch nicht als therapeutische Strategie geeignet ist (La Porta, Zapperi et al. 2012). Auf der anderen Seite scheint es einen Zusammenhang zwischen Laktat und chronologischer Seneszenz zu geben (Leontieva and Blagosklonny 2011). So zeigte sich, dass das Immunsuppressivum Rapamycin die Laktatproduktion und die chronologische Seneszenz abschwächen konnte. Rapamycin zielt auf mTOR (mammalian Target of Rapamycin), welches sowohl Apoptose als auch chronologische Seneszenz initiieren kann (Fabrizio, Pozza et al. 2001; Kühn and Walz 2007). Auch andere Substanzen, die indirekt Rapamycin inhibieren, wie N-Acetyl-L-Cystein, zeigen einen erniedrigenden Effekt auf die Laktatproduktion und Seneszenz (Leontieva and Blagosklonny 2011). Des Weiteren gibt es einen Zusammenhang von mTOR und pAkt. So hemmt pAkt TSC

(Tuberous Sclerosis Complex) und hebt dessen hemmende Wirkung auf mTOR auf, was wiederum zu einer erhöhten Seneszenz führen kann (Wang and Proud 2006; Schug 2010). Die bestätigt sich in den vorliegenden Daten, dass die metastasierenden Melanomzellen eine erhöhte pAkt-Expression nach UVA-Bestrahlung vorweisen und gleichzeitig eine erhöhte Seneszenz zeigen. Dabei ist erwähnenswert, dass freie Radikale und oxidativer Stress Akt/mTOR aktivieren kann und TOR umgekehrt ROS-Bildung begünstigen kann (Blagosklonny 2008; Weinberger, Mesquita et al. 2010). Dies weist ebenfalls auf einen Zusammenhang mit UVA-Strahlung hin. Des Weiteren induziert mTOR die Translation von Genen der Glykolyse und ist über diesen Weg bei der Tumorgenese beteiligt, wie zum Beispiel der Glucosetransporter Glu1 (Buller, Loberg et al. 2008; Duvel, Yecies et al. 2010). Dabei reguliert mTOR auch die Laktatdehydrogenase (LDH), insbesondere der Untereinheit LDHB, sowohl im Mausmodell als auch in menschlichen Tumorzelllinien (Zha, Wang et al. 2011). Dabei wird spekuliert, dass eine Hochregulierung von LDHB über eine abnormale Regulierung von mTOR eine entscheidende Rolle im Warburg-Effekt spielt und die aerobe Glykolyse stimuliert (Zha, Sun et al. 2011). Dies ist demnach in der Entwicklung des Tumors involviert. In allen durchgeführten Versuchen war es möglich den Effekt von UVA durch die Zugabe von Vitamin E abzuschwächen. Dies zeigt die wichtige Bedeutung von Antioxidanzien nicht nur bei der Prävention von Krebs, sondern kann es unterstützend dabei helfen eine weitere Progression und damit eine Ausbreitung von Krebs bei Patienten zu mindern oder gar zu verhindern.

### **1.5 Schlussfolgerung - *in vitro* Daten**

Um alle Daten der vorliegenden Arbeit zusammen zu fassen, lässt sich folgende Hypothese aufstellen: Eine chronische UVA-Bestrahlung von Melanomzellen führt zur ROS-Bildung, welche eine erhöhte pAkt-Expression zur Folge hat. Das aktive phosphorylierte Akt hemmt TSC, was zu einer mTOR-Aktivierung führt. Dadurch werden das Zellwachstum und die Translationsmaschinerie induziert, dabei wird unter anderem die LDH hochreguliert und die aerobe Glykolyse begünstigt. Dieser Warburg-Effekt führt einerseits zu einem erhöhten Glucoseverbrauch und andererseits zu einer erhöhten Laktatproduktion. Der erhöhte Laktatlevel begünstigt über ein kurzzeitiges saures Milieu vermutlich die Aktivierung von MMPs, was eine erhöhte Invasivität und Metastasierung zur Folge hat (Abb.E-1).



**Abb.E- 1: Zusammenfassende Darstellung der Progression von Melanomzellen durch UVA, wie sie an Hand der vorliegenden Daten vorstellbar ist.**

Doch für ein mögliches Nachfolgeprojekt bleiben Fragen offen, so dass weiterführende *in vitro* Experimente nötig sein werden. So ist die Rolle der TKTL-1 im Warburg-Effekt und der Invasivität von Melanomzellen weiterhin nicht eindeutig geklärt. Es wäre wichtig einen Aktivitäts-Assay spezifisch für die TKTL-1 zu entwickeln um dies näher untersuchen zu können. Kurzfristige Überlegungen den normalen TKT-Aktivitäts-Assay mit Antikörpern gegen TKTL-1 durchzuführen um diese zu blocken und damit indirekt auf die Aktivität der TKTL-1 schließen zu können, verliefen erfolglos. Doch diesen Grundgedanken könnte man weiter und tiefergehend verfolgen. Des Weiteren ist es nötig einen möglichen Einfluss des durch den Warburg-Effekt gebildeten Laktats auf MMPs zu untersuchen und welche MMPs in der Metastasierung von Melanomzellen involviert sind. Als mögliche Kandidaten sind an dieser Stelle MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, MMP-19 und MMP-21 zu nennen. Während alle genannten MMPs in humanen Melanom exprimiert werden (Hofmann, Westphal et al. 2000; Muller, Beck et al. 2010), zeigen MMP-1, MMP-3 und MMP-9 zusätzlich eine Induktion durch UVB (Brenneisen, Wenk et al. 1998). MMP-2, MMP-3 und MMP-9 werden durch eine pH-Wert-Änderung aktiviert (Davis 1991; Gunja-Smith and Woessner 1993) und bei der Progression vom malignen Melanom konnten MMP-1, MMP-2,

MMP-9, MMP-13, MMP-19 und MMP-21 identifiziert werden (van den Oord, Paemen et al. 1997; Airola, Karonen et al. 1999; Hofmann, Westphal et al. 1999; Huntington, Shields et al. 2004; Corte, Gonzalez et al. 2005; Kuivanen, Ahokas et al. 2005; Muller, Beck et al. 2010)

Des Weiteren wäre es von großer Bedeutung für das Verständnis der Melanomentstehung, wenn man die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente mit den Zellen durchführen könnte, aus denen sich die Melanomzellen entwickeln, nämlich die Melanozyten. So könnte man die entscheidenden Schritte bei der Melanomgenese identifizieren und einen klareren Überblick über die Bedeutung von UVA dabei erhalten.

## **2. Hautäquivalenzmodell**

### **2.1 Die mitochondriale Common Deletion im Hautäquivalenzmodell**

Der Einsatz dreidimensionaler, organotypischer Kulturen zur Untersuchung gewebespezifischer Eigenschaften gewann in den letzten Jahren an Bedeutung (Schmeichel and Bissell 2003). Die ersten Beispiele dafür waren so genannte Hautäquivalenzmodelle (Bell, Ivarsson et al. 1979; Bell, Sher et al. 1983; Asselineau and Prunieras 1984), welche neben dem grundsätzlichen Verständnis der biologischen Funktion der Haut auch das Testen von kosmetischen und medizinischen Substanzen ermöglichen, dabei stellen sie einen Hautersatz dar (Sorrell and Caplan 2004). Während Zellkulturen humaner Hautzellen als Monolayer kultiviert werden, bilden Hautäquivalenzmodelle ein dreidimensionales Homolog zur menschlichen Haut. Diese bieten eine Alternative zu Tiermodellen sowie *in vivo*-Untersuchungen menschlicher Haut, die mit ethischer Problematik verbunden sind. In den hier vorliegenden Experimenten konnte nach einer UVA-Bestrahlung ein höherer Gehalt an Common Deletion in der Epidermis gemessen werden als in der Dermis. Schon zuvor konnte durch UVA der Gehalt der Common Deletion in Keratinozyten *in-vitro*, welche sich in der Epidermis befinden, gemessen werden (Koch, Wittern et al. 2001). Zusätzlich zeigte sich im ersten Teil der vorliegenden Arbeit eine erhöhte Common Deletion in UVA-bestrahlten Melanomzellen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass die erhöhte Common Deletion sowohl auf die Keratinozyten als auch die Melanomzellen der Epidermis des Hautäquivalentmodells zurück zu führen ist. Bei Sonnenlicht-exponierter Haut von Menschen dagegen zeigte sich mehr Common Deletion in der Dermis als in der Epidermis (Birch-Machin, Tindall et al. 1998; Berneburg, Plettenberg et al. 2004). Die Zellen der Epidermis zeigen einen hohen Zellumsatz, wodurch die Common Deletion mit der Zeit verschwindet.

### **2.2 Der Warburg-Effekt im Hautäquivalenzmodell**

Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit Hinweise erkennbar wurden, dass UVA den Warburg-Effekt in Melanomzellen induzieren kann, bot sich durch die Bestrahlung von Hautkonstrukten die Möglichkeit diesen Effekt in einem Gewebeverband zu untersuchen. Schon die Messungen des pH-Wertes im Medium nach der UVA-Bestrahlung zeigten erste Hinweise, dass der Warburg-Effekt auch im Konstrukt nachweisbar sein könnte. Die Ergebnisse des Glucoseverbrauchs und der Laktatproduktion bestätigten dies. So konnte durch eine einwöchige UVA-Bestrahlung sowohl der Glucoseverbrauch als auch die Laktatproduktion signifikant erhöht werden. Dabei verbrauchten die bestrahlten Hautkonstrukte 5-mal so viel Glucose wie die Kontrollen, die Laktatproduktion war um knapp

das 4-fache erhöht im Gegensatz zu den unbestrahlten Kontrollen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass unter physiologischen Bedingungen ein Tumor aus Zellen besteht, die Glucose aerob verstoffwechseln sowie hypoxischen Regionen, in denen die Zellen Glucose vergären (Semenza 2008). Dabei besteht eine Symbiose des Tumors, bei denen das durch die hypoxischen Zellen entstandene Laktat durch die aerob verstoffwechselnden Zellen aufgenommen wird und dieses in der oxidativen Phosphorylierung als Substrat dient (Sonveaux, Vegran et al. 2008). Diese Heterogenität könnte sich ebenfalls in einem Hautäquivalenzmodell zeigen. Sowohl der Glucosegehalt als auch der Laktatgehalt im Lysat der Konstrukte war gering, im Vergleich zu den Werten im Kulturmedium. Dies deutet darauf hin, dass die aufgenommene Glucose zeitnah umgesetzt wird und somit die Menge aufgenommen wird, die auch tatsächlich gebraucht wird. Auch zeigt dies, dass im Medium eine aktive Glucoseaufnahme gemessen wurde und nicht womöglich eine Diffusion von Glucose aus dem Medium in den Zellverband des Konstrukts. Der Glucosegehalt im Lysat der UVA-bestrahlten Konstrukte ist etwas höher ( $P < 0,003$ ), was eine erhöhte Glucoseaufnahme in dieser Momentaufnahme nach UVA zeigt. Der im Verhältnis zum Kulturmedium sehr geringe Laktatgehalt im Lysat der Konstrukte zeigt, dass das produzierte und nicht weiterverwendete Laktat ins Medium ausgeschleust wird und sich nicht im Zellverband ansammelt. Dies unterstützt die oben erwähnte Idee, dass die laktatproduzierenden Zellen das Laktat in die Umgebung abgeben und umliegendes Gewebe dies aufnehmen könnte. Wobei ein Hautkonstrukt nicht in der Lage ist das komplexe System eines ganzen Tumors unter physiologischen Bedingungen nachstellen zu können. Allerdings konnte auch in diesem Fall eine leichte Erhöhung des Laktatgehalts nach UVA-Bestrahlung gemessen werden ( $P < 0,002$ ), so dass man eine höhere Laktatproduktion nach UVA-Bestrahlung in dieser Momentaufnahme annehmen kann.

Eine Bestätigung der *in-vitro* Daten in einem Hautäquivalenzmodell war nicht von vorne herein absehbar, da die Wechselwirkungen der einzelnen Zellschichten miteinander noch nicht komplett klar sind. Dennoch sind die Daten der Konstrukte in Einklang mit kürzlich durchgeführten Untersuchungen *in-vivo* zu bringen. So wurde erst in den letzten Monaten eine Studie veröffentlicht, wonach man einen erhöhten Glucosestoffwechsel in orthotopen Mausmodellen mit menschlichen Gehirntumoren an Hand von PET-Analysen mit markierter Glucose (Positronen-Emissions-Tomographie) gefunden hat (Marin-Valencia, Cho et al. 2012). Gleichzeitig konnte markiertes Laktat detektiert werden, was den Warburg-Effekt in diesem Modell zeigt. Dieselbe Arbeitsgruppe untersuchte den Glucosestoffwechsel *in situ* bei menschlichen Gehirntumoren (Maher, Marin-Valencia et al. 2012). Dabei bekamen Patienten direkt vor der operativen Entfernung des Tumors gleichmäßig  $^{13}\text{C}$ -markierte Glucose verabreicht (d.h. alle sechs Kohlenstoffatome der Glucose waren markiert). Nach der Operation wurden die Gewebeproben mit Hilfe von NMR-Spektroskopie

(Kernspinresonanzspektroskopie) untersucht. Dabei zeigte sich die Komplexität des Glucosestoffwechsels von Tumoren *in-vivo*, dass Laktatproduktion und Citratzyklus in Konkurrenz nebeneinander ablaufen, welches schon zuvor *in vitro* gezeigt wurde (DeBerardinis, Mancuso et al. 2007; Sonveaux, Vegran et al. 2008). Doch diese komplexe Verstoffwechslung von Glucose zeigte sich in allen 11 untersuchten Gehirntumoren, die aus verschiedenen Patienten stammen, was darauf hinweist, dass diese Komplexität ein normaler Zustand ist. Dies lässt vermuten, dass auch im menschlichen Melanom bei verschiedenen Patienten auf sich ähnelnde Weise abläuft und dies womöglich ein Merkmal der jeweiligen Tumorarten sein könnte. Die Ergebnisse der Konstrukte zeigen, dass UVA den konkurrierenden Glucosestoffwechselweg so verschiebt, dass ein erhöhter Warburg-Effekt gemessen werden konnte.

Der Einsatz von Sonnenschutzmittel wirkte in diesen Experimenten protektiv auf die Hautkonstrukte. Sowohl der pH-Wert, als auch der Glucoseverbrauch und die Laktatproduktion konnten dadurch auf ein mit der Kontrolle vergleichbares Niveau stabilisiert werden. Der verwendete Filter zeigt einen hohen Schutz, speziell gegen UVA, dieser UVA-Schutz kann hiermit bestätigt werden. Bemerkenswert ist allerdings, dass das Sonnenschutzmittel alle drei Parameter, die auf einen Warburg-Effekt hindeuten, bei den unbestrahlten Kontrollen normalisieren konnte.

### **2.3 Die Aktivität der Transketolase im Hautäquivalenzmodell**

Obwohl im Abschnitt D-1.4 *in-vitro* kein deutlicher Hinweis auf eine Rolle der Transketolase-like-1 in Melanomzellen nach UVA-Bestrahlung gefunden werden konnte, gab es doch eine Erhöhung der allgemeinen Transketolase-Aktivität. Aus diesem Grund war es interessant zu erfahren, welchen Einfluss UVA auf die Aktivität der Transketolase in einem Hautäquivalenzmodell hat. Dazu wurde die Aktivität dieses Enzyms im Lysat des Konstrukts nach einer Woche UVA-Bestrahlung gemessen und auf den Gesamtproteingehalt dieses Lysats normiert. Dabei bestätigten sich die *in-vitro*-Daten, nach der UVA die Transketolase-Aktivität erhöht. Diese Daten unterstützen die Vermutung in Abschnitt E-1.3, dass UVA einen Einfluss auf die Transketolasen hat, es aber nicht deutlich ist, ob die Transketolase mit dem Warburg-Effekt in Zusammenhang steht oder direkt über UVA induziert wird. In vielen Tumorzellen wird ein erhöhter Pentosephosphat-Weg festgestellt, da stark proliferierende Zellen auf die Produkte des Pentosephosphat-Weges angewiesen sind (Vander Heiden, Cantley et al. 2009; Gogvadze, Zhivotovsky et al. 2010). So war eine erhöhte Aktivität der Transketolase als Schlüsselenzym dieses Stoffwechselweges zu erwarten. Dabei sind die meisten Studien über den Stoffwechsel von Tumorzellen *in-vitro* durchgeführt wurden und es

ist nicht klar welche Rolle die Kulturbedingungen wie die Zusammensetzung des Mediums bei der Regulierung des Stoffwechsels spielen. Dies gilt allerdings auch für künstliche Hautkonstrukte, welche ebenfalls nicht perfekt physiologische Umstände aufzeigen. Ein orthotopes Mausmodell mit humanen Gehirntumorzellen ist als *in situ*-Modell gut geeignet um den Tumorstoffwechsel unter physiologischen Bedingungen zu untersuchen. Eine vor kurzem veröffentlichte Untersuchung in einem solchen Modell mit Hilfe von markierter Glucose in MNR-Spektroskopie zeigte keinen Unterschied bei der Relation der Verstoffwechselung von Glucose über den Pentosephosphat-Weg und über die Glykolyse im Tumor in Vergleich mit dem umliegenden gesunden Gewebe (Marin-Valencia, Cho et al. 2012). Doch beide Stoffwechselwege zusammen genommen, sind im Tumorgewebe erhöht. Die Experimente der vorliegenden Arbeit zeigen einen erhöhenden Effekt von UVA auf die Transketolase-Aktivität und damit indirekt einen erhöhten Durchfluss der Glucose durch den Pentosephosphat-Weg. Die oben genannte Veröffentlichung zeigt allerdings, dass ein Vergleich der Transketolase-Aktivität im Hautkonstrukt mit gesunden Melanozyten noch aussteht. So könnte man einen klareren Hinweis darauf bekommen, ob der Pentosephosphat-Weg verglichen mit gesunder Haut im Melanom erhöht ist oder ob dieser Effekt allein auf den Einfluss von UVA zurückzuführen ist.

### **2.4 Schlussfolgerung - Hautäquivalentmodell**

Die Ergebnisse der UVA-Bestrahlung eines Hautäquivalenzmodells zeigen deutlich, dass dieses Modell sehr gut dafür geeignet ist um den Effekt der niedrigen, aber dafür chronischen Bestrahlung auf die Haut zu testen. Die Ergebnisse der *in-vitro*- Versuche konnten unter Bedingungen, die den physiologischen Gegebenheiten näher stehen, bestätigt werden. Zwar ist das Zusammenspiel der menschlichen Haut mit dem gesamten Körper sehr komplex und es gibt viele Faktoren, wie das Alter, der allgemeine Gesundheitszustand oder das Immunsystem, die bei der Pathogenese von Krebs eine Rolle spielen. Diese können bei einem derartigen Modell nicht berücksichtigt werden. Doch schlägt das Hautäquivalenzmodell eine Brücke zwischen *in vitro*-Versuchen menschlicher Zellen und *in-vivo*-Versuchen im Menschen, die mit diesem Versuchsaufbau nicht möglich wären. Dabei zeigte sich, dass UVA auch in einem dreidimensionalen Hautmodell einen starken Einfluss auf den Stoffwechsel hat, so dass sowohl der Warburg-Effekt als auch die Aktivität des Pentosephosphat-Weges gesteigert wurden. Dies wiederum spielt eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese des malignen Melanoms. Der positive und schützende Effekt von Sonnencreme konnte an dieser Stelle gezeigt werden. Jedoch sind weitere Experimente im Hautäquivalenzmodell nötig um die Rolle des UVA im malignen Melanom besser zu verstehen. So sollten Konstrukte mit Melanomzellen unterschiedlicher Wachstumsphasen

erstellt werden um den Verlauf der Pathogenese besser nachvollziehen zu können. Als Kontrolle sollten Konstrukte bestrahlt werden, die statt der Melanomzellen aus Melanozyten bestehen. Auch sind weiterführende Untersuchungen vorstellbar, zum Beispiel das Messen von pAkt oder der TKTL-1 auf mRNA-Ebene.

Der entscheidende Kerngedanke dieser Dissertation für die Praxis ist aber, dass auch Melanompatienten eventuell umsichtig im Umgang mit UVA sein sollten und sich ausreichend schützen sollten um eine Progression ihrer Erkrankung zu verhindern.

## F. Abkürzungen

Tab. F-1: verwendete Abkürzungen und deren Bedeutung

%	Prozent
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
•OH	Hydroxylradikal
6-4PPs	Pyrimidin-Pyrimidon (6-4) Photoprodukte
8oxoG	8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosin
Abb.	Abbildung
Akt	Proteinkinase B
bidest	doppelt destilliert
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenylblau
bzw.	beziehungsweise
C°	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
CD	common deletion der Mitochondrien-DNA
cm	Zentimeter
COLIPA	Comité de Liaison des Associations Européennes de L'Industrie de la Parfumerie, des Produits Cosmétiques et de Toilette
CT	cycle treshold
d	Tag
DMBA	Dimethylbenz(a)anthrazen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotid
DSB	Doppelstrangbruch
E	Effizienz
ERK	extrazelluläre signalabhängige Kinase
<i>et al.</i>	und andere
EtOh	Ethanol
g	Gramm
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid

## F. Abkürzungen

---

HCl	Salzsäure
HGF/SF	hepatozyten Wachstumsfaktor/Scatter Faktor
<i>INK4 /ARF</i>	Cyclin-abhängige Kinase 4/ Adenosyl Ribosylierungsfaktor
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kiodalton
l	Liter
M	Molar
m	Anstieg einer Geraden
MAPK	mitogenaktivierte Proteinkinase
MET	metastasierende Melanomzellen
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
Mt1	Metallotionein
mtDNA	Mitochondiren-DNA
mTOR	mammalian Target of Rapamycin
MUG	4-Methylumbelliferyl -D-galctopyranoside
n	Anzahl
NaOH	Natronlauge
nm	Nanometer
NMR-	
Spektroskopie	Kernspinresonanzspektroskopie
<i>NOX4</i>	NADPH Oxidase 4-Gen
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidradikal
OD	optische Dichte
OT	Oxathiamin
PCR	Polymerase Chain Reaction
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH	negativer Lagarithmus der Wasserstoffionen-Konzentrationen
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PKC	Proteinkinase C
RAS	<i>Rat-sarcoma</i> , ein Proto-Onkogen
RFU	Relative Fluoreszenz Units
RGP	radiäre Wachstumsphase (radial growth phase)

## F. Abkürzungen

---

Rnase	Ribonuklease
ROS	radikale Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-PCR
SA- $\beta$ -Gal	Seneszenz-assoziierte $\beta$ -Galaktosidase
s	Sekunde
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SOD	Kupfer-Zink Superoxiddismutase
SSB	Einzelstrangbruch
TKT	Transketolase
TKTL-1	Transketolase-like-1
TSC	Tuberous Sclerosis Complex
U	Units
ÜN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
Usf-1	ein Transkriptionsfaktor
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	Vergleiche
VGP	vertikale Wachstumsphase (vertical growth phase)
WT	Wildtyp
<i>Xmrk</i>	membrangebundene Rezeptortyrosinkinase-Gen
z.B.	zum Beispiel Delta (Differenz, mathematisch)

## G. Literaturverzeichnis

- Airola, K., T. Karonen, et al. (1999). "Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas." British journal of cancer **80**(5-6): 733-743.
- Albini, A., Y. Iwamoto, et al. (1987). "A rapid in vitro assay for quantitating the invasive potential of tumor cells." Cancer research **47**(12): 3239-3245.
- Amuthan, G., G. Biswas, et al. (2001). "Mitochondria-to-nucleus stress signaling induces phenotypic changes, tumor progression and cell invasion." EMBO J **20**(8): 1910-1920.
- Andrade, P., M. M. Brites, et al. (2012). "Epidemiology of basal cell carcinomas and squamous cell carcinomas in a Department of Dermatology: a 5 year review." An Bras Dermatol **87**(2): 212-219.
- Asselineau, D. and M. Prunieras (1984). "Reconstruction of 'simplified' skin: control of fabrication." The British journal of dermatology **111 Suppl 27**: 219-222.
- Atilasoy, E. S., J. T. Seykora, et al. (1998). "UVB induces atypical melanocytic lesions and melanoma in human skin." Am J Pathol **152**(5): 1179-1186.
- Bardeesy, N., K. K. Wong, et al. (2000). "Animal models of melanoma: recent advances and future prospects." Adv Cancer Res **79**: 123-156.
- Bau, L. (2006). Das Transketolase-like-1 Protein (TKTL1) im Mammakarzinom Dissertation, Alber-Ludwigs-Universität.
- Bell, E., B. Ivarsson, et al. (1979). "Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **76**(3): 1274-1278.
- Bell, E., S. Sher, et al. (1983). "The reconstitution of living skin." The Journal of investigative dermatology **81**(1 Suppl): 2s-10s.
- Berking, C. (2005). "Bedeutung von ultravioletter Strahlung beim malignen Melanom." Hautarzt **56**(7): 687-697.
- Berking, C. and M. Herlyn (2001). "Human skin reconstruct models: a new application for studies of melanocyte and melanoma biology." Histol Histopathol **16**(2): 669-674.

- Berking, C., R. Takemoto, et al. (2002). "Photocarcinogenesis in human adult skin grafts." Carcinogenesis **23**(1): 181-187.
- Berking, C., R. Takemoto, et al. (2001). "Basic fibroblast growth factor and ultraviolet B transform melanocytes in human skin." Am J Pathol **158**(3): 943-953.
- Berking, C., R. Takemoto, et al. (2004). "Induction of melanoma phenotypes in human skin by growth factors and ultraviolet B." Cancer Res **64**(3): 807-811.
- Berneburg, M., N. Gattermann, et al. (1997). "Chronically ultraviolet-exposed human skin shows a higher mutation frequency of mitochondrial DNA as compared to unexposed skin and the hematopoietic system." Photochem Photobiol **66**(2): 271-275.
- Berneburg, M., T. Gremmel, et al. (2005). "Creatine supplementation normalizes mutagenesis of mitochondrial DNA as well as functional consequences." J Invest Dermatol **125**(2): 213-220.
- Berneburg, M., S. Grether-Beck, et al. (1999). "Singlet oxygen mediates the UVA-induced generation of the photoaging-associated mitochondrial common deletion." J Biol Chem **274**(22): 15345-15349.
- Berneburg, M., H. Plettenberg, et al. (2000). "Photoaging of human skin." Photodermatol Photoimmunol Photomed **16**(6): 239-244.
- Berneburg, M., H. Plettenberg, et al. (2004). "Induction of the photoaging-associated mitochondrial common deletion in vivo in normal human skin." J Invest Dermatol **122**(5): 1277-1283.
- Berthon, H. A., P. W. Kuchel, et al. (1992). "High control coefficient of transketolase in the nonoxidative pentose phosphate pathway of human erythrocytes: NMR, antibody, and computer simulation studies." Biochemistry **31**(51): 12792-12798.
- Besaratinia, A., T. W. Synold, et al. (2004). "G-to-T transversions and small tandem base deletions are the hallmark of mutations induced by ultraviolet a radiation in mammalian cells." Biochemistry **43**(25): 8169-8177.
- Birch-Johansen, F., G. Hvilsom, et al. (2008). "Social inequality and incidence of and survival from malignant melanoma in a population-based study in Denmark, 1994-2003." Eur J Cancer **44**(14): 2043-2049.
- Birch-Machin, M. A., M. Tindall, et al. (1998). "Mitochondrial DNA deletions in human skin reflect photo- rather than chronologic aging." The Journal of investigative dermatology **110**(2): 149-152.

- Blagosklonny, M. V. (2008). "Aging: ROS or TOR." Cell cycle **7**(21): 3344-3354.
- Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nature medicine **3**(7): 730-737.
- Boros, L. G., J. Puigjaner, et al. (1997). "Oxythiamine and dehydroepiandrosterone inhibit the nonoxidative synthesis of ribose and tumor cell proliferation." Cancer research **57**(19): 4242-4248.
- Bradl, M., A. Klein-Szanto, et al. (1991). "Malignant melanoma in transgenic mice." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(1): 164-168.
- Brand, K. (1997). "Aerobic glycolysis by proliferating cells: protection against oxidative stress at the expense of energy yield." Journal of bioenergetics and biomembranes **29**(4): 355-364.
- Braun, L., F. Puskas, et al. (1997). "Ascorbate as a substrate for glycolysis or gluconeogenesis: evidence for an interorgan ascorbate cycle." Free Radic Biol Med **23**(5): 804-808.
- Brenneisen, P., J. Wenk, et al. (1998). "Central role of Ferrous/Ferric iron in the ultraviolet B irradiation-mediated signaling pathway leading to increased interstitial collagenase (matrix-degrading metalloprotease (MMP)-1) and stromelysin-1 (MMP-3) mRNA levels in cultured human dermal fibroblasts." The Journal of biological chemistry **273**(9): 5279-5287.
- Brizel, D. M., T. Schroeder, et al. (2001). "Elevated tumor lactate concentrations predict for an increased risk of metastases in head-and-neck cancer." International journal of radiation oncology, biology, physics **51**(2): 349-353.
- Broome Powell, M., P. R. Gause, et al. (1999). "Induction of melanoma in TPas transgenic mice." Carcinogenesis **20**(9): 1747-1753.
- Buller, C. L., R. D. Loberg, et al. (2008). "A GSK-3/TSC2/mTOR pathway regulates glucose uptake and GLUT1 glucose transporter expression." American journal of physiology. Cell physiology **295**(3): C836-843.
- Buzzai, M., D. E. Bauer, et al. (2005). "The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid beta-oxidation." Oncogene **24**(26): 4165-4173.
- Cadet, J., E. Sage, et al. (2005). "Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA." Mutat Res **571**(1-2): 3-17.

- Cantley, L. C. (2002). "The phosphoinositide 3-kinase pathway." Science **296**(5573): 1655-1657.
- Chance, B. and L. N. Castor (1952). "Some Patterns of the Respiratory Pigments of Ascites Tumors of Mice." Science **116**(3008): 200-202.
- Chance, B. and B. Hess (1959). "Spectroscopic evidence of metabolic control." Science **129**(3350): 700-708.
- Chin, L., G. Merlino, et al. (1998). "Malignant melanoma: modern black plague and genetic black box." Genes Dev **12**(22): 3467-3481.
- Christofk, H. R., M. G. Vander Heiden, et al. (2008). "The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth." Nature **452**(7184): 230-233.
- Corte, M. D., L. O. Gonzalez, et al. (2005). "Collagenase-3 (MMP-13) expression in cutaneous malignant melanoma." The International journal of biological markers **20**(4): 242-248.
- Coy, J. F., D. Dressler, et al. (2005). "Mutations in the transketolase-like gene TKTL1: clinical implications for neurodegenerative diseases, diabetes and cancer." Clinical laboratory **51**(5-6): 257-273.
- Coy, J. F., S. Dubel, et al. (1996). "Molecular cloning of tissue-specific transcripts of a transketolase-related gene: implications for the evolution of new vertebrate genes." Genomics **32**(3): 309-316.
- Crocetti, E., S. Guzzinati, et al. (2008). "The risk of developing a second, different, cancer among 14 560 survivors of malignant cutaneous melanoma: a study by AIRTUM (the Italian Network of Cancer Registries)." Melanoma Res **18**(3): 230-234.
- Cuezva, J. M., G. Chen, et al. (2004). "The bioenergetic signature of lung adenocarcinomas is a molecular marker of cancer diagnosis and prognosis." Carcinogenesis **25**(7): 1157-1163.
- Cuezva, J. M., M. Krajewska, et al. (2002). "The bioenergetic signature of cancer: a marker of tumor progression." Cancer research **62**(22): 6674-6681.
- Dahle, J. and E. Kvam (2003). "Induction of delayed mutations and chromosomal instability in fibroblasts after UVA-, UVB-, and X-radiation." Cancer Res **63**(7): 1464-1469.
- Davis, G. E. (1991). "Identification of an abundant latent 94-kDa gelatin-degrading metalloprotease in human saliva which is activated by acid exposure:

- implications for a role in digestion of collagenous proteins." Arch Biochem Biophys **286**(2): 551-554.
- De Fabo, E. C., F. P. Noonan, et al. (2004). "Ultraviolet B but not ultraviolet A radiation initiates melanoma." Cancer Res **64**(18): 6372-6376.
- de Laat, A., E. D. Kroon, et al. (1997). "Cell cycle effects and concomitant p53 expression in hairless murine skin after longwave UVA (365 nm) irradiation: a comparison with UVB irradiation." Photochem Photobiol **65**(4): 730-735.
- DeBerardinis, R. J., J. J. Lum, et al. (2008). "The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation." Cell metabolism **7**(1): 11-20.
- DeBerardinis, R. J., A. Mancuso, et al. (2007). "Beyond aerobic glycolysis: transformed cells can engage in glutamine metabolism that exceeds the requirement for protein and nucleotide synthesis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(49): 19345-19350.
- Denkler, K. and J. Johnson (1999). "A lost piece of melanoma history." Plast Reconstr Surg **104**(7): 2149-2153.
- Dimri, G. P., X. Lee, et al. (1995). "A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(20): 9363-9367.
- Douki, T., A. Reynaud-Angelin, et al. (2003). "Bipyrimidine photoproducts rather than oxidative lesions are the main type of DNA damage involved in the genotoxic effect of solar UVA radiation." Biochemistry **42**(30): 9221-9226.
- Durham, S. E., K. J. Krishnan, et al. (2003). "Mitochondrial DNA damage in non-melanoma skin cancer." Br J Cancer **88**(1): 90-95.
- Duvel, K., J. L. Yecies, et al. (2010). "Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1." Molecular cell **39**(2): 171-183.
- Elstrom, R. L., D. E. Bauer, et al. (2004). "Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells." Cancer research **64**(11): 3892-3899.
- Eshaghian, A., R. A. Vleugels, et al. (2006). "Mitochondrial DNA deletions serve as biomarkers of aging in the skin, but are typically absent in nonmelanoma skin cancers." J Invest Dermatol **126**(2): 336-344.
- Fabrizio, P., F. Pozza, et al. (2001). "Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast." Science **292**(5515): 288-290.

- Fang, D., D. Hawke, et al. (2007). "Phosphorylation of beta-catenin by AKT promotes beta-catenin transcriptional activity." The Journal of biological chemistry **282**(15): 11221-11229.
- Fantin, V. R., J. St-Pierre, et al. (2006). "Attenuation of LDH-A expression uncovers a link between glycolysis, mitochondrial physiology, and tumor maintenance." Cancer cell **9**(6): 425-434.
- Fears, T. R., C. C. Bird, et al. (2002). "Average midrange ultraviolet radiation flux and time outdoors predict melanoma risk." Cancer Res **62**(14): 3992-3996.
- Ferguson, K. (2005). "Melanoma." J Contin Educ Nurs **36**(6): 242-243.
- Ferlay, J., H. R. Shin, et al. (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." International journal of cancer. Journal international du cancer **127**(12): 2893-2917.
- Fisher, G. J., H. S. Talwar, et al. (1998). "Retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo." The Journal of clinical investigation **101**(6): 1432-1440.
- Fleury, C., F. Berard, et al. (2000). "The study of cutaneous melanomas in Camargue-type gray-skinned horses (1): clinical-pathological characterization." Pigment Cell Res **13**(1): 39-46.
- Foldi, M., E. Stickeler, et al. (2007). "Transketolase protein TKTL1 overexpression: A potential biomarker and therapeutic target in breast cancer." Oncology reports **17**(4): 841-845.
- Folkard, M., K. M. Prise, et al. (2002). "The production of single strand and double strand breaks in DNA in aqueous solution by vacuum UV photons below 10 eV." Radiat Prot Dosimetry **99**(1-4): 147-149.
- Franke, T. F., D. R. Kaplan, et al. (1997). "PI3K: downstream AKTion blocks apoptosis." Cell **88**(4): 435-437.
- Frohlich, E., I. Fink, et al. (2009). "Is transketolase like 1 a target for the treatment of differentiated thyroid carcinoma? A study on thyroid cancer cell lines." Investigational new drugs **27**(4): 297-303.
- Galibert, M. D., S. Carreira, et al. (2001). "The Usf-1 transcription factor is a novel target for the stress-responsive p38 kinase and mediates UV-induced Tyrosinase expression." EMBO J **20**(17): 5022-5031.

- Gary, R. K. and S. M. Kindell (2005). "Quantitative assay of senescence-associated beta-galactosidase activity in mammalian cell extracts." Anal Biochem **343**(2): 329-334.
- Gogvadze, V., B. Zhivotovsky, et al. (2010). "The Warburg effect and mitochondrial stability in cancer cells." Molecular aspects of medicine **31**(1): 60-74.
- Gottfried, E., L. A. Kunz-Schughart, et al. (2006). "Tumor-derived lactic acid modulates dendritic cell activation and antigen expression." Blood **107**(5): 2013-2021.
- Gottlieb, T. M., J. F. Leal, et al. (2002). "Cross-talk between Akt, p53 and Mdm2: possible implications for the regulation of apoptosis." Oncogene **21**(8): 1299-1303.
- Govindarajan, B., J. E. Sligh, et al. (2007). "Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma." J Clin Invest **117**(3): 719-729.
- Groussard, C., I. Morel, et al. (2000). "Free radical scavenging and antioxidant effects of lactate ion: an in vitro study." Journal of applied physiology **89**(1): 169-175.
- Gunja-Smith, Z. and J. F. Woessner, Jr. (1993). "Activation of cartilage stromelysin-1 at acid pH and its relation to enzyme pH optimum and osteoarthritis." Agents and actions **40**(3-4): 228-231.
- Halliwell, B. and O. I. Auruoma (1993). DNA and free radicals. Chichester, England, Ellis Horwood.
- Heinrich, P. C., H. P. Morris, et al. (1976). "Behavior of transaldolase (EC 2.2.1.2) and transketolase (EC 2.2.1.1) Activities in normal, neoplastic, differentiating, and regenerating liver." Cancer research **36**(9 pt.1): 3189-3197.
- Hendrix, M. J., E. A. Seftor, et al. (1998). "Regulation of uveal melanoma interconverted phenotype by hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF)." Am J Pathol **152**(4): 855-863.
- Hirobe, T. (1992). "Control of melanocyte proliferation and differentiation in the mouse epidermis." Pigment Cell Res **5**(1): 1-11.
- Hockberger, P. E. (2002). "A history of ultraviolet photobiology for humans, animals and microorganisms." Photochem Photobiol **76**(6): 561-579.
- Hoffmann, A., T. Gloe, et al. (2001). "Hypoxia-induced upregulation of eNOS gene expression is redox-sensitive: a comparison between hypoxia and inhibitors of cell metabolism." Journal of cellular physiology **188**(1): 33-44.

- Hofmann, U. B., J. C. Becker, et al. (2002). "[Role of matrix-degrading enzymes in melanoma progression]." Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete **53**(9): 587-595.
- Hofmann, U. B., J. R. Westphal, et al. (2000). "Matrix metalloproteinases in human melanoma." The Journal of investigative dermatology **115**(3): 337-344.
- Hofmann, U. B., J. R. Westphal, et al. (1999). "Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression." British journal of cancer **81**(5): 774-782.
- Horikawa-Miura, M., N. Matsuda, et al. (2007). "The greater lethality of UVB radiation to cultured human cells is associated with the specific activation of a DNA damage-independent signaling pathway." Radiat Res **167**(6): 655-662.
- Hu, L. H., J. H. Yang, et al. (2007). "The TKTL1 gene influences total transketolase activity and cell proliferation in human colon cancer LoVo cells." Anti-cancer drugs **18**(4): 427-433.
- Huang, C., W. Ma, et al. (1997). "Signal transduction through atypical PKCs, but not the EGF receptor, is necessary for UVC-induced AP-1 activation in immortal murine cells." Oncogene **14**(16): 1945-1954.
- Hubbard, K., M. L. Steinberg, et al. (2008). "Mitochondrial DNA deletions in skin from melanoma patients." Ethn Dis **18**(2 Suppl 2): S2-38-43.
- Huntington, J. T., J. M. Shields, et al. (2004). "Overexpression of collagenase 1 (MMP-1) is mediated by the ERK pathway in invasive melanoma cells: role of BRAF mutation and fibroblast growth factor signaling." The Journal of biological chemistry **279**(32): 33168-33176.
- Hussein, M. R. (2005). "Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms." J Cutan Pathol **32**(3): 191-205.
- Hussussian, C. J., J. P. Struewing, et al. (1994). "Germline p16 mutations in familial melanoma." Nature genetics **8**(1): 15-21.
- Iida, A., S. Teshiba, et al. (1993). "Identification and characterization of the tktB gene encoding a second transketolase in Escherichia coli K-12." Journal of bacteriology **175**(17): 5375-5383.
- Ikehata, H., H. Kudo, et al. (2003). "UVA induces C-->T transitions at methyl-CpG-associated dipyrimidine sites in mouse skin epidermis more frequently than UVB." Mutagenesis **18**(6): 511-519.

- Ishikawa, K., K. Takenaga, et al. (2008). "ROS-generating mitochondrial DNA mutations can regulate tumor cell metastasis." Science **320**(5876): 661-664.
- Izyumov, D. S., A. V. Avetisyan, et al. (2004). "'Wages of fear': transient threefold decrease in intracellular ATP level imposes apoptosis." Biochimica et biophysica acta **1658**(1-2): 141-147.
- Jeffers, M., S. Rong, et al. (1996). "Hepatocyte growth factor/scatter factor-Met signaling in tumorigenicity and invasion/metastasis." J Mol Med **74**(9): 505-513.
- Jemal, A., T. Murray, et al. (2005). "Cancer statistics, 2005." CA Cancer J Clin **55**(1): 10-30.
- Jiang, Y., C. Ke, et al. (2007). "Detecting ultraviolet damage in single DNA molecules by atomic force microscopy." Biophys J **93**(5): 1758-1767.
- Kabuyama, Y., M. K. Homma, et al. (2001). "Wavelength-specific activation of MAP kinase family proteins by monochromatic UV irradiation." Photochem Photobiol **73**(2): 147-152.
- Kamb, A., D. Shattuck-Eidens, et al. (1994). "Analysis of the p16 gene (CDKN2) as a candidate for the chromosome 9p melanoma susceptibility locus." Nature genetics **8**(1): 23-26.
- Kamenisch, Y., J. Wenz, et al. (2007). "The mitochondrial DNA common deletion is present in most basal and squamous cell carcinoma samples isolated by laser capture microdissection but generally at reduced rather than increased levels." J Invest Dermatol **127**(2): 486-490.
- Kang, D. and N. Hamasaki (2003). "Mitochondrial oxidative stress and mitochondrial DNA." Clin Chem Lab Med **41**(10): 1281-1288.
- Kappes, U. P., D. Luo, et al. (2006). "Short- and long-wave UV light (UVB and UVA) induce similar mutations in human skin cells." J Invest Dermatol **126**(3): 667-675.
- Kawanishi, S. and S. Oikawa (2004). "Mechanism of telomere shortening by oxidative stress." Ann N Y Acad Sci **1019**: 278-284.
- Kazianis, S., L. D. Coletta, et al. (2000). "Overexpression of a fish CDKN2 gene in a hereditary melanoma model." Carcinogenesis **21**(4): 599-605.
- Kelsall, S. R. and B. Mintz (1998). "Metastatic cutaneous melanoma promoted by ultraviolet radiation in mice with transgene-initiated low melanoma susceptibility." Cancer Res **58**(18): 4061-4065.

- Kerscher, M. (2004). Dermatocosmetik. Darmstadt, Steinkopff.
- Kielbassa, C., L. Roza, et al. (1997). "Wavelength dependence of oxidative DNA damage induced by UV and visible light." Carcinogenesis **18**(4): 811-816.
- Kligman, L. H. and R. Elenitsas (2001). "Melanoma induction in a hairless mouse with short-term application of dimethylbenz[a]anthracene." Melanoma Res **11**(4): 319-324.
- Knebel, A., H. J. Rahmsdorf, et al. (1996). "Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents." EMBO J **15**(19): 5314-5325.
- Koch, H., K. P. Wittern, et al. (2001). "In human keratinocytes the Common Deletion reflects donor variabilities rather than chronologic aging and can be induced by ultraviolet A irradiation." J Invest Dermatol **117**(4): 892-897.
- Kohrenhagen, N., H. U. Voelker, et al. (2008). "Expression of transketolase-like 1 (TKTL1) and p-Akt correlates with the progression of cervical neoplasia." The journal of obstetrics and gynaecology research **34**(3): 293-300.
- Koolman, J. and K.-H. Röhm (1998). Taschenatlas der Biochemie. Stuttgart [u.a.], Thieme.
- Kowalczyk, C. I., M. C. Priestner, et al. (2006). "Wavelength dependence of cellular responses in human melanocytes and melanoma cells following exposure to ultraviolet radiation." Int J Radiat Biol **82**(11): 781-792.
- Kühn, W. and G. Walz (2007). "Autosomal dominante polyzystische Nierenerkrankungen." Dtsch Arztebl **104**(44): 3022-3028.
- Kuivanen, T., K. Ahokas, et al. (2005). "MMP-21 is upregulated at early stages of melanoma progression but disappears with more aggressive phenotype." Virchows Archiv : an international journal of pathology **447**(6): 954-960.
- Kusewitt, D. F., L. A. Applegate, et al. (1991). "Ultraviolet radiation-induced skin tumors in a South American opossum (*Monodelphis domestica*)." Vet Pathol **28**(1): 55-65.
- Kusewitt, D. F. and R. D. Ley (1996). "Animal models of melanoma." Cancer Surv **26**: 35-70.
- La Porta, C. A., S. Zapperi, et al. (2012). "Senescent cells in growing tumors: population dynamics and cancer stem cells." PLoS Comput Biol **8**(1): e1002316.

- Lai, K., N. Di Girolamo, et al. (2007). "The effect of ultraviolet radiation on choroidal melanocytes and melanoma cell lines: cell survival and matrix metalloproteinase production." *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **245**(5): 715-724.
- Lambeth, J. D., G. Cheng, et al. (2000). "Novel homologs of gp91phox." *Trends in biochemical sciences* **25**(10): 459-461.
- Langbein, S., W. M. Frederiks, et al. (2008). "Metastasis is promoted by a bioenergetic switch: new targets for progressive renal cell cancer." *International journal of cancer. Journal international du cancer* **122**(11): 2422-2428.
- Langbein, S., M. Zerilli, et al. (2006). "Expression of transketolase TKTL1 predicts colon and urothelial cancer patient survival: Warburg effect reinterpreted." *British journal of cancer* **94**(4): 578-585.
- Leccia, M. T., M. J. Richard, et al. (1998). "UV-A1 cytotoxicity and antioxidant defence in keratinocytes and fibroblasts." *Eur J Dermatol* **8**(7): 478-482.
- Leccia, M. T., M. Yaar, et al. (2001). "Solar simulated irradiation modulates gene expression and activity of antioxidant enzymes in cultured human dermal fibroblasts." *Exp Dermatol* **10**(4): 272-279.
- Lee, D. H. and G. P. Pfeifer (2003). "Deamination of 5-methylcytosines within cyclobutane pyrimidine dimers is an important component of UVB mutagenesis." *J Biol Chem* **278**(12): 10314-10321.
- Lehtola, K., L. Laurikainen, et al. (1995). "Antioxidant enzymes are elevated in dimethylbenz[a]anthracene-induced neoplastic murine keratinocytes containing an active rasHa oncogene." *J Cancer Res Clin Oncol* **121**(7): 402-406.
- Leontieva, O. V. and M. V. Blagosklonny (2011). "Yeast-like chronological senescence in mammalian cells: phenomenon, mechanism and pharmacological suppression." *Aging* **3**(11): 1078-1091.
- Ley, R. D. (1997). "Ultraviolet radiation A-induced precursors of cutaneous melanoma in *Monodelphis domestica*." *Cancer Res* **57**(17): 3682-3684.
- Lin, X., F. Zhang, et al. (2003). "2-Deoxy-D-glucose-induced cytotoxicity and radiosensitization in tumor cells is mediated via disruptions in thiol metabolism." *Cancer research* **63**(12): 3413-3417.

- Litwin, J. (1972). "The effect of light on the aging of human diploid fibroblasts." Exp Gerontol **7**(6): 381-386.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lum, J. J., D. E. Bauer, et al. (2005). "Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis." Cell **120**(2): 237-248.
- MacKie, R. M., C. Bray, et al. (2007). "Melanoma incidence and mortality in Scotland 1979-2003." Br J Cancer **96**(11): 1772-1777.
- Maher, E. A., I. Marin-Valencia, et al. (2012). "Metabolism of [U-(13) C]glucose in human brain tumors in vivo." NMR Biomed.
- Marin-Valencia, I., S. K. Cho, et al. (2012). "Glucose metabolism via the pentose phosphate pathway, glycolysis and Krebs cycle in an orthotopic mouse model of human brain tumors." NMR Biomed.
- Marnett, L. J. (2000). "Oxyradicals and DNA damage." Carcinogenesis **21**(3): 361-370.
- Mayer, A., A. Von Wallbrunn, et al. (2010). "Glucose metabolism of malignant cells is not regulated by transketolase-like (TKTL)-1." International journal of oncology **37**(2): 265-271.
- Mayer, A., A. von Wallbrunn, et al. (2011). "Evidence against a major role for TKTL-1 in hypoxic and normoxic cancer cells." Advances in experimental medicine and biology **701**: 123-128.
- McGovern, V. J., M. C. Mihm, Jr., et al. (1973). "The classification of malignant melanoma and its histologic reporting." Cancer **32**(6): 1446-1457.
- Meewes, C., P. Brenneisen, et al. (2001). "Adaptive antioxidant response protects dermal fibroblasts from UVA-induced phototoxicity." Free Radic Biol Med **30**(3): 238-247.
- Meier, F., S. Busch, et al. (2006). "The adhesion molecule L1 (CD171) promotes melanoma progression." Int J Cancer **119**(3): 549-555.
- Michaloglou, C., L. C. Vredeveld, et al. (2005). "BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi." Nature **436**(7051): 720-724.
- Mitchell, D. L. (2000). "Effects of cytosine methylation on pyrimidine dimer formation in DNA." Photochem Photobiol **71**(2): 162-165.

- Mitchell, D. L., A. A. Fernandez, et al. (2010). "Ultraviolet A does not induce melanomas in a Xiphophorus hybrid fish model." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **107**(20): 9329-9334.
- Moan, J., A. Dahlback, et al. (1999). "Epidemiological support for an hypothesis for melanoma induction indicating a role for UVA radiation." Photochem Photobiol **70**(2): 243-247.
- Moreno-Sanchez, R., S. Rodriguez-Enriquez, et al. (2007). "Energy metabolism in tumor cells." The FEBS journal **274**(6): 1393-1418.
- Mouret, S., C. Baudouin, et al. (2006). "Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(37): 13765-13770.
- Muller, M., I. M. Beck, et al. (2010). "MMP19 is upregulated during melanoma progression and increases invasion of melanoma cells." Mod Pathol **23**(4): 511-521.
- Murphy, J. B. and J. A. Hawkins (1925). "Comparative Studies on the Metabolism of Normal and Malignant Cells." The Journal of general physiology **8**(2): 115-130.
- Nairn, R. S., D. C. Morizot, et al. (1996). "Nonmammalian models for sunlight carcinogenesis: genetic analysis of melanoma formation in Xiphophorus hybrid fish." Photochem Photobiol **64**(3): 440-448.
- Natali, P. G., M. R. Nicotra, et al. (1993). "Expression of the c-Met/HGF receptor in human melanocytic neoplasms: demonstration of the relationship to malignant melanoma tumour progression." Br J Cancer **68**(4): 746-750.
- Noonan, F. P., T. Otsuka, et al. (2000). "Accelerated ultraviolet radiation-induced carcinogenesis in hepatocyte growth factor/scatter factor transgenic mice." Cancer Res **60**(14): 3738-3743.
- Noonan, F. P., J. A. Recio, et al. (2001). "Neonatal sunburn and melanoma in mice." Nature **413**(6853): 271-272.
- Noonan, F. P., M. R. Zaidi, et al. (2012). "Melanoma induction by ultraviolet A but not ultraviolet B radiation requires melanin pigment." Nature communications **3**: 884.
- Norris, W. (1820). "Case of fungoid disease." Edinburgh Med Surg J **16**: 562-565.
- O'Donnell-Tormey, J., C. F. Nathan, et al. (1987). "Secretion of pyruvate. An antioxidant defense of mammalian cells." The Journal of experimental medicine **165**(2): 500-514.

- Okada, K., Y. Takahashi, et al. (1994). "Time-dependent effect of chronic UV irradiation on superoxide dismutase and catalase activity in hairless mice skin." J Dermatol Sci **8**(3): 183-186.
- Otsuka, T., H. Takayama, et al. (1998). "c-Met autocrine activation induces development of malignant melanoma and acquisition of the metastatic phenotype." Cancer Res **58**(22): 5157-5167.
- Pang, C. Y., H. C. Lee, et al. (1994). "Human skin mitochondrial DNA deletions associated with light exposure." Arch Biochem Biophys **312**(2): 534-538.
- Papa, S. (1996). "Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the life span. Molecular aspects and physiopathological implications." Biochim Biophys Acta **1276**(2): 87-105.
- Parisi, A. V. and J. C. Wong (2000). "An estimation of biological hazards due to solar radiation." J Photochem Photobiol B **54**(2-3): 126-130.
- Parsons, P. G. and P. Musk (1982). "Toxicity, DNA damage and inhibition of DNA repair synthesis in human melanoma cells by concentrated sunlight." Photochem Photobiol **36**(4): 439-445.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Pfeifer, G. P., Y. H. You, et al. (2005). "Mutations induced by ultraviolet light." Mutat Res **571**(1-2): 19-31.
- Picardo, M., P. Grammatico, et al. (1996). "Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells and normal melanocytes from patients with melanoma." J Invest Dermatol **107**(3): 322-326.
- Poswig, A., J. Wenk, et al. (1999). "Adaptive antioxidant response of manganese-superoxide dismutase following repetitive UVA irradiation." J Invest Dermatol **112**(1): 13-18.
- Quennet, V., A. Yaromina, et al. (2006). "Tumor lactate content predicts for response to fractionated irradiation of human squamous cell carcinomas in nude mice." Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology **81**(2): 130-135.
- Rabilloud, T., D. Asselineau, et al. (1990). "Deficiency in catalase activity correlates with the appearance of tumor phenotype in human keratinocytes." Int J Cancer **45**(5): 952-956.

- Racker, E. (1972). "Bioenergetics and the problem of tumor growth." American scientist **60**(1): 56-63.
- Radonic, A., S. Thulke, et al. (2004). "Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR." Biochem Biophys Res Commun **313**(4): 856-862.
- Rais, B., B. Comin, et al. (1999). "Oxythiamine and dehydroepiandrosterone induce a G1 phase cycle arrest in Ehrlich's tumor cells through inhibition of the pentose cycle." FEBS letters **456**(1): 113-118.
- Richter, C. (1995). "Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing." Int J Biochem Cell Biol **27**(7): 647-653.
- Rosdahl, I. K. and G. Szabo (1978). "Mitotic activity of epidermal melanocytes in UV-irradiated mouse skin." J Invest Dermatol **70**(3): 143-148.
- Rudolph, P., M. Tronnier, et al. (1998). "Enhanced expression of Ki-67, topoisomerase IIalpha, PCNA, p53 and p21WAF1/Cip1 reflecting proliferation and repair activity in UV-irradiated melanocytic nevi." Hum Pathol **29**(12): 1480-1487.
- Runger, T. M. and U. P. Kappes (2008). "Mechanisms of mutation formation with long-wave ultraviolet light (UVA)." Photodermatol Photoimmunol Photomed **24**(1): 2-10.
- Sabourin, C. L., A. G. Freeman, et al. (1992). "Identification of a transforming ras oncogene in an ultraviolet radiation-induced corneal tumor of *Monodelphis domestica*." Photochem Photobiol **55**(3): 417-424.
- Salahudeen, A. K., E. C. Clark, et al. (1991). "Hydrogen peroxide-induced renal injury. A protective role for pyruvate in vitro and in vivo." The Journal of clinical investigation **88**(6): 1886-1893.
- Sander, C. S., H. Chang, et al. (2004). "Role of oxidative stress and the antioxidant network in cutaneous carcinogenesis." Int J Dermatol **43**(5): 326-335.
- Sasaki, H., H. Akamatsu, et al. (1997). "Effects of a single exposure to UVB radiation on the activities and protein levels of copper-zinc and manganese superoxide dismutase in cultured human keratinocytes." Photochem Photobiol **65**(4): 707-713.
- Sattler, U. G., S. Walenta, et al. (2007). "[Lactate and redox status in malignant tumors]." Der Anaesthetist **56**(5): 466-469.
- Schaaff-Gerstenschlager, I., G. Mannhaupt, et al. (1993). "TKL2, a second transketolase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning, sequence and

- deletion analysis of the gene." European journal of biochemistry / FEBS **217**(1): 487-492.
- Scharffetter-Kochanek, K., P. Brenneisen, et al. (2000). "Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms." Exp Gerontol **35**(3): 307-316.
- Schenk, G., R. G. Duggleby, et al. (1998). "Heterologous expression of human transketolase." The international journal of biochemistry & cell biology **30**(3): 369-378.
- Schenk, G., R. G. Duggleby, et al. (1998). "Properties and functions of the thiamin diphosphate dependent enzyme transketolase." The international journal of biochemistry & cell biology **30**(12): 1297-1318.
- Schmeichel, K. L. and M. J. Bissell (2003). "Modeling tissue-specific signaling and organ function in three dimensions." Journal of cell science **116**(Pt 12): 2377-2388.
- Schmidt, M., U. Kammerer, et al. (2008). "Glucose metabolism and angiogenesis in granulosa cell tumors of the ovary: activation of Akt, expression of M2PK, TKTL1 and VEGF." European journal of obstetrics, gynecology, and reproductive biology **139**(1): 72-78.
- Schug, T. T. (2010). "mTOR favors senescence over quiescence in p53-arrested cells." Aging **2**(6): 327-328.
- Schultz, H., D. Kahler, et al. (2008). "TKTL1 is overexpressed in a large portion of non-small cell lung cancer specimens." Diagnostic pathology **3**: 35.
- Schulz, T. J., R. Thierbach, et al. (2006). "Induction of oxidative metabolism by mitochondrial frataxin inhibits cancer growth: Otto Warburg revisited." J Biol Chem **281**(2): 977-981.
- Schwartz, J. P. and D. W. McCandless (1976). "Glycolytic metabolism in cultured cells of the nervous system. IV. The effects of thiamine deficiency on thiamine levels, metabolites and thiamine-dependent enzymes on the C-6 glioma and C-1300 neuroblastoma cell lines." Molecular and cellular biochemistry **13**(1): 49-53.
- Seltenhammer, M. H., E. Heere-Ress, et al. (2004). "Comparative histopathology of grey-horse-melanoma and human malignant melanoma." Pigment Cell Res **17**(6): 674-681.
- Semenza, G. L. (2008). "Tumor metabolism: cancer cells give and take lactate." The Journal of clinical investigation **118**(12): 3835-3837.

- Setlow, R. B., E. Grist, et al. (1993). "Wavelengths effective in induction of malignant melanoma." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(14): 6666-6670.
- Sherburn, T. E., J. M. Gale, et al. (1998). "Cloning and characterization of the CDKN2A and p19ARF genes from *Monodelphis domestica*." DNA Cell Biol **17**(11): 975-981.
- Shindo, Y., E. Witt, et al. (1993). "Antioxidant defense mechanisms in murine epidermis and dermis and their responses to ultraviolet light." J Invest Dermatol **100**(3): 260-265.
- Sinha, R. P. and D. P. Hader (2002). "Life under solar UV radiation in aquatic organisms." Adv Space Res **30**(6): 1547-1556.
- Smith, M. E., U. Kaulmann, et al. (2006). "A colorimetric assay for screening transketolase activity." Bioorg Med Chem **14**(20): 7062-7065.
- Sonveaux, P., F. Vegran, et al. (2008). "Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice." The Journal of clinical investigation **118**(12): 3930-3942.
- Sorrell, J. M. and A. I. Caplan (2004). "Fibroblast heterogeneity: more than skin deep." Journal of cell science **117**(Pt 5): 667-675.
- Spielmann, H., M. Liebsch, et al. (1994). "[First results of an EC/COLIPA validation project of in vitro phototoxicity testing methods]." ALTEX **11**(1): 22-31.
- Stahl, J. M., A. Sharma, et al. (2004). "Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma." Cancer research **64**(19): 7002-7010.
- Stahl, J. M., A. Sharma, et al. (2004). "Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma." Cancer Res **64**(19): 7002-7010.
- Staiger, W. I., J. F. Coy, et al. (2006). "Expression of the mutated transketolase TKTL1, a molecular marker in gastric cancer." Oncology reports **16**(4): 657-661.
- Strickland, F. M., H. K. Muller, et al. (2000). "Induction of primary cutaneous melanomas in C3H mice by combined treatment with ultraviolet radiation, ethanol and aloe emodin." Photochem Photobiol **72**(3): 407-414.
- Taddei, M. L., E. Giannoni, et al. (2012). "Mitochondrial Oxidative Stress due to Complex I Dysfunction Promotes Fibroblast Activation and Melanoma Cell Invasiveness." Journal of signal transduction **2012**: 684592.

- Tadokoro, T., N. Kobayashi, et al. (2003). "UV-induced DNA damage and melanin content in human skin differing in racial/ethnic origin." FASEB J **17**(9): 1177-1179.
- Tafoya, G. B., J. M. Gale, et al. (1997). "Photorepair of ultraviolet radiation (UVR)-induced pyrimidine dimers in lens epithelial DNA of *Monodelphis domestica*." Photochem Photobiol **65**(1): 125-128.
- Terranova, V. P., E. S. Hujanen, et al. (1986). "Use of a reconstituted basement membrane to measure cell invasiveness and select for highly invasive tumor cells." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(2): 465-469.
- Thierbach, R., T. J. Schulz, et al. (2005). "Targeted disruption of hepatic frataxin expression causes impaired mitochondrial function, decreased life span and tumor growth in mice." Hum Mol Genet **14**(24): 3857-3864.
- Tikhomirova, N. K. and G. A. Kochetov (1990). "Purification of transketolase from baker's yeast by an immunoadsorbent." Biochem Int **22**(1): 31-36.
- Tjaderhane, L., H. Larjava, et al. (1998). "The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions." J Dent Res **77**(8): 1622-1629.
- Tommasi, S., M. F. Denissenko, et al. (1997). "Sunlight induces pyrimidine dimers preferentially at 5-methylcytosine bases." Cancer Res **57**(21): 4727-4730.
- Tong, X., F. Zhao, et al. (2009). "The molecular determinants of de novo nucleotide biosynthesis in cancer cells." Current opinion in genetics & development **19**(1): 32-37.
- Toyokuni, S., K. Okamoto, et al. (1995). "Persistent oxidative stress in cancer." FEBS Lett **358**(1): 1-3.
- Tucker, M. A. and A. M. Goldstein (2003). "Melanoma etiology: where are we?" Oncogene **22**(20): 3042-3052.
- Tucker, M. A., A. Halpern, et al. (1997). "Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma." JAMA : the journal of the American Medical Association **277**(18): 1439-1444.
- van den Oord, J. J., L. Paemen, et al. (1997). "Expression of gelatinase B and the extracellular matrix metalloproteinase inducer EMMPRIN in benign and malignant pigment cell lesions of the skin." The American journal of pathology **151**(3): 665-670.

- van Schanke, A., M. J. Jongsma, et al. (2005). "Single UVB overexposure stimulates melanocyte proliferation in murine skin, in contrast to fractionated or UVA-1 exposure." J Invest Dermatol **124**(1): 241-247.
- Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley, et al. (2009). "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." Science **324**(5930): 1029-1033.
- Vander Heiden, M. G., N. S. Chandel, et al. (1999). "Bcl-xL prevents cell death following growth factor withdrawal by facilitating mitochondrial ATP/ADP exchange." Molecular cell **3**(2): 159-167.
- Vivanco, I. and C. L. Sawyers (2002). "The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer." Nature reviews. Cancer **2**(7): 489-501.
- Volker, H. U., C. Hagemann, et al. (2008). "Expression of transketolase-like 1 and activation of Akt in grade IV glioblastomas compared with grades II and III astrocytic gliomas." American journal of clinical pathology **130**(1): 50-57.
- Volker, H. U., M. Scheich, et al. (2007). "Overexpression of transketolase TKTL1 is associated with shorter survival in laryngeal squamous cell carcinomas." European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies **264**(12): 1431-1436.
- von Thaler, A. K., Y. Kamenisch, et al. (2010). "The role of ultraviolet radiation in melanomagenesis." Experimental dermatology **19**(2): 81-88.
- Walenta, S., T. V. Chau, et al. (2003). "Metabolic classification of human rectal adenocarcinomas: a novel guideline for clinical oncologists?" Journal of cancer research and clinical oncology **129**(6): 321-326.
- Walenta, S., A. Salameh, et al. (1997). "Correlation of high lactate levels in head and neck tumors with incidence of metastasis." The American journal of pathology **150**(2): 409-415.
- Walenta, S., M. Wetterling, et al. (2000). "High lactate levels predict likelihood of metastases, tumor recurrence, and restricted patient survival in human cervical cancers." Cancer research **60**(4): 916-921.
- Walter, R. B. and S. Kazianis (2001). "Xiphophorus interspecies hybrids as genetic models of induced neoplasia." Ilar J **42**(4): 299-321.
- Wang, L. E., P. Xiong, et al. (2005). "In vitro sensitivity to ultraviolet B light and skin cancer risk: a case-control analysis." J Natl Cancer Inst **97**(24): 1822-1831.

- Wang, X. and C. G. Proud (2006). "The mTOR pathway in the control of protein synthesis." Physiology (Bethesda) **21**: 362-369.
- Warburg, O. (1956). "On respiratory impairment in cancer cells." Science **124**(3215): 269-270.
- Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." Science **123**(3191): 309-314.
- Warburg, O., F. Wind, et al. (1927). "The Metabolism of Tumors in the Body." The Journal of general physiology **8**(6): 519-530.
- Wasco, M. J., R. T. Pu, et al. (2008). "Expression of gamma-H2AX in melanocytic lesions." Human pathology **39**(11): 1614-1620.
- Wehner, J. and G. Horneck (1995). "Effects of vacuum UV and UVC radiation on dry E. coli plasmid pUC19. I. Inactivation, lacZ- mutation induction and strand breaks." J Photochem Photobiol B **28**(1): 77-85.
- Weinberger, M., A. Mesquita, et al. (2010). "Growth signaling promotes chronological aging in budding yeast by inducing superoxide anions that inhibit quiescence." Aging **2**(10): 709-726.
- Weinhouse, S. (1976). "The Warburg hypothesis fifty years later." Zeitschrift fur Krebsforschung und klinische Onkologie. Cancer research and clinical oncology **87**(2): 115-126.
- Wellbrock, C., A. Gomez, et al. (1997). "Signal transduction by the oncogenic receptor tyrosine kinase Xmrk in melanoma formation of Xiphophorus." Pigment Cell Res **10**(1-2): 34-40.
- Wenczl, E., G. P. Van der Schans, et al. (1998). "(Pheo)melanin photosensitizes UVA-induced DNA damage in cultured human melanocytes." J Invest Dermatol **111**(4): 678-682.
- Wilhelm, S. M., Z. H. Shao, et al. (1993). "Matrix metalloproteinase-3 (stromelysin-1). Identification as the cartilage acid metalloprotease and effect of pH on catalytic properties and calcium affinity." The Journal of biological chemistry **268**(29): 21906-21913.
- Wood, S. R., M. Berwick, et al. (2006). "UV causation of melanoma in Xiphophorus is dominated by melanin photosensitized oxidant production." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(11): 4111-4115.
- Wu, H. T., N. Allie, et al. (2009). "Anaplastic nephroblastomas express transketolase-like enzyme 1." Journal of clinical pathology **62**(5): 460-463.

- Yang, J. H., H. C. Lee, et al. (1994). "A specific 4977-bp deletion of mitochondrial DNA in human ageing skin." Arch Dermatol Res **286**(7): 386-390.
- Yaromina, A., D. Zips, et al. (2006). "Pimonidazole labelling and response to fractionated irradiation of five human squamous cell carcinoma (hSCC) lines in nude mice: the need for a multivariate approach in biomarker studies." Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology **81**(2): 122-129.
- Zerilli, M., M. C. Amato, et al. (2008). "Increased expression of transketolase-like-1 in papillary thyroid carcinomas smaller than 1.5 cm in diameter is associated with lymph-node metastases." Cancer **113**(5): 936-944.
- Zha, X., Q. Sun, et al. (2011). "mTOR upregulation of glycolytic enzymes promotes tumor development." Cell cycle **10**(7): 1015-1016.
- Zha, X., F. Wang, et al. (2011). "Lactate dehydrogenase B is critical for hyperactive mTOR-mediated tumorigenesis." Cancer research **71**(1): 13-18.
- Zhang, S., J. H. Yang, et al. (2007). "Gene silencing of TKTL1 by RNAi inhibits cell proliferation in human hepatoma cells." Cancer letters **253**(1): 108-114.
- Zhang, S., J. X. Yue, et al. (2008). "Overexpression of transketolase protein TKTL1 is associated with occurrence and progression in nasopharyngeal carcinoma: a potential therapeutic target in nasopharyngeal carcinoma." Cancer biology & therapy **7**(4): 517-522.
- Zuo, L., J. Weger, et al. (1996). "Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma." Nature genetics **12**(1): 97-99.



## H. Anhang

### 1. Erklärung zum Eigenanteil

#### **1.1 Effekt von UVA auf die Physiologie von Melanomzellen**

- Abb. D-1 und D-2: Die Arbeiten (Planung und Ausführung) wurden überwiegend von Anna-Katharina von Thaler durchgeführt, mit Unterstützung von York Kamenisch.
- Abb. D-3 bis D-15: Die Arbeiten (Planung und Ausführung) wurden von Anna-Katharina von Thaler durchgeführt.
- Abb. D-16: Die Arbeiten (Planung und Ausführung) wurden überwiegend von Anna-Katharina von Thaler durchgeführt, mit Unterstützung von Birgit Sauer.
- Abb. D-17 und D-18: Die Arbeiten (Planung und Ausführung) wurden überwiegend von Anna-Katharina von Thaler mit Unterstützung von York Kamenisch durchgeführt.

#### **2.1 Der Effekt von UVA auf ein humanes Hautäquivalenzmodell**

- Abb. D-19 und D-20: Die Arbeiten (Planung und Ausführung) wurden überwiegend von Anna-Katharina von Thaler durchgeführt, mit Unterstützung von Tobias Sinnberg und York Kamenisch.
- Abb. D-21 bis D-24: Die Arbeiten (Planung und Ausführungen) wurden überwiegend von Anna-Katharina von Thaler durchgeführt, mit Unterstützung von Tobias Sinnberg.

#### **3.1 Diskussion**

- Abb. E-1: Diese Grafik wurde von Anna-Katharina von Thaler erstellt.