

**Aus der Universitäts-Hautklinik Tübingen
Sektion Dermatologische Onkologie**

**Expression und Funktion von
Relaxin-2 bei melanozytären Naevi
und Melanomen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

**Grosse-Jahn, Patricia Christine Alexandra
geb. Grosse**

2019

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Garbe
2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Möhle

Tag der Disputation: 18.12.2018

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Malignes Melanom.....	1
1.2	Relaxin-2	3
2	Material und Methoden	6
2.1	Immunhistochemische Färbungen.....	6
2.2	Zelllinien	6
2.3	Relaxin-2	6
2.4	Zellkultur.....	6
2.5	Herstellung der shRNA-Klone.....	7
2.5.1	Puromycin-Vorversuche.....	8
2.5.2	Transfektion des shRNA Plasmids.....	8
2.6	Herstellung von Lysaten für Western Blots	9
2.7	Proteinbestimmung für Western Blots	10
2.8	Western-Blots.....	11
2.9	Zellzahl.....	13
2.9.1	SBCL2	13
2.9.2	BLM	14
2.10	Migrationsassay.....	14
2.10.1	SBCL2	14
2.10.2	BLM	15
2.11	Adhäsionsassay	15
2.12	MUH-Assay	16
3	Ergebnisse.....	18
3.1	Immunhistochemische Färbungen.....	19
3.1.1	RXFP-1	20
3.1.2	RXFP-2.....	22
3.1.3	Relaxin-2	23
3.2	Auswahl der Zelllinien.....	25
3.3	Herstellung der Klone – Überprüfung mit Western Blot	26
3.4	Zellzahl.....	27

3.4.1	SBCL2	27
3.4.2	BLM	28
3.5	MUH-Assay	30
3.6	Migrationsassay	32
3.6.1	SBCL2	32
3.6.2	BLM	34
3.7	Adhäsionsassay	35
3.7.1	SBCL2	36
3.7.2	BLM	37
4	Diskussion	40
4.1	Auswahl der Zelllinien	40
4.2	Immunhistochemische Färbungen	40
4.3	Zellzahl	42
4.4	MUH-Assay	43
4.5	Migrationsassay	44
4.6	Adhäsionsassay	45
5	Zusammenfassung und Ausblick	49
6	Literaturverzeichnis	52
7	Erklärung zum Eigenanteil	56
8	Danksagung	57

Abkürzungsverzeichnis

AJCC	<u>A</u> merican <u>J</u> oint <u>C</u> ommittee on <u>C</u> ancer
ANOVA	<u>a</u> nalysis of <u>v</u> ariances
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumin
cAMP	<u>c</u> yclisches <u>A</u> denosin <u>m</u> onophosphat
CAS	<u>C</u> hemical <u>A</u> bstracts <u>S</u> ervice
CFSE	<u>C</u> arboxyfluorescein <u>s</u> uccinimidyl <u>e</u> ster
CTLA-4	<u>c</u> ytotoxic <u>T</u> -lymphocyte- <u>a</u> ssociated <u>P</u> rotein <u>4</u>
DNA	<u>d</u> eoxyribonucleic <u>a</u> cid
ECL	<u>e</u> nhanced <u>c</u> hemiluminescence
EDTA	<u>e</u> thylene <u>d</u> iamine <u>t</u> etraacetic <u>a</u> cid
FBS	<u>F</u> etal <u>B</u> ovine <u>S</u> erum
H1	human relaxin gene H1
H2	human relaxin gene H2
H3	human relaxin gene H3
HRP	<u>H</u> orseradish <u>P</u> eroxidase
IGF 1	<u>i</u> nsulin-like <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>1</u>
IGF 2	<u>i</u> nsulin-like <u>g</u> rowth <u>f</u> actor <u>2</u>
IgG	<u>I</u> mmunglobulin <u>G</u>
IQR	<u>i</u> nterquartile <u>r</u> ange
INSL3	<u>i</u> nsulin <u>l</u> ike <u>3</u>
INSL4	<u>i</u> nsulin <u>l</u> ike <u>4</u>
INSL5	<u>i</u> nsulin <u>l</u> ike <u>5</u>
INSL6	<u>i</u> nsulin <u>l</u> ike <u>6</u>
L15	<u>L</u> eibovitz <u>M</u> edium
LGR7	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 7
LGR8	leucine-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 8
MCDB	<u>M</u> olecular, <u>C</u> ellular, and <u>D</u> evelopmental <u>B</u> iology
MMP	<u>M</u> atrixmetalloproteinase
mRNA	messenger RNA
MUH	<u>4</u> - <u>M</u> ethylumbelliferyl <u>h</u> eptanoate
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
PD-1	<u>p</u> rogrammed <u>c</u> ell <u>d</u> eath <u>p</u> rotein <u>1</u>
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
PI3K	<u>P</u> hosphoinositid- <u>3</u> - <u>K</u> inase
PKA	<u>P</u> roteinkinase <u>A</u>
RGP	<u>r</u> adial <u>g</u> rowth <u>p</u> hase
Rlx-2	<u>R</u> elaxin- <u>2</u>
RNA	<u>r</u> ibonucleic <u>a</u> cid
RPMI	<u>R</u> oswell <u>P</u> ark <u>M</u> emorial <u>I</u> nstitute
RXFP1	<u>R</u> elaxin(/insulin like) <u>f</u> amily <u>p</u> eptide <u>r</u> eceptor <u>1</u>
RXFP2	<u>R</u> elaxin(/insulin like) <u>f</u> amily <u>p</u> eptide <u>r</u> eceptor <u>2</u>

SDS	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate
shRNA	<u>S</u> mall- <u>h</u> airpin- <u>R</u> NA
SSM	<u>S</u> uperfiziell <u>s</u> preitendes <u>M</u> elanom
TBS	<u>T</u> ris- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline
TBS-T	1x TBS mit 0,1% Tween20
TIMP	<u>t</u> issue <u>i</u> nhibitor of <u>M</u> MP
Tris	<u>T</u> ris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton	<u>T</u> riton X-100 = Octoxinol-9
UICC	<u>U</u> nion <u>i</u> nternationale <u>c</u> ontre le <u>c</u> ancer

1 Einleitung

1.1 Malignes Melanom

Die medizinische Entwicklung der letzten Jahrzehnte ermöglicht eine breite und gute Versorgung, teils auch Prävention vieler alltäglicher Erkrankungen, wie beispielsweise des kardiovaskulären Formenkreises. Auch im Bereich der Onkologie konnten in der jüngeren Vergangenheit immense Fortschritte erzielt werden, wie die gesunkenen Mortalitätsraten beispielsweise beim kolorektalen Karzinom oder Mammakarzinom vermuten lassen [1, 2]. Doch trotz aller Errungenschaften sind die bisherigen Möglichkeiten nicht ausreichend um den Patienten aller Tumorerkrankungen in allen Stadien der Erkrankung eine adäquate oder sogar kurative Therapie zu ermöglichen. Die Fortführung einer intensiven Forschung in allen Bereichen der Onkologie ist somit unerlässlich. Einen wichtigen Platz nimmt hierbei auch die dermatologische Onkologie ein, zu deren Hauptbereichen das maligne Melanom, der schwarze Hautkrebs, gehört.

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor der Haut, der seinen Ursprung in melanozytären Zellen hat [3, 4]. Die häufigste Lokalisation ist bei Frauen die untere Extremität, bei Männern der Rücken [5]. Die Inzidenz des malignen Melanoms nimmt seit Jahrzehnten zu und betrifft vor allem hellhäutige Menschen [4, 6, 7].

Das gefährliche Potential dieses Tumors wird deutlich bei näherer Betrachtung des Zusammenhangs von Tumordicke und Metastasierungsrisiko und der damit verbundenen Überlebensrate. Vor Einsatz der neuen Therapien wie Ipilimumab und Nivolumab ergab sich bei einer Tumordicke $\leq 0,75$ mm eine 10-Jahres-Überlebensrate von 97%, bei >4 mm nur noch von 43%. Bei Fernmetastasen lag die 10-Jahres-Überlebensrate gerade einmal bei 3-5% [4].

Forschner et al. [8] zeigten in einer prospektiven Studie eine deutliche Zunahme des Gesamtüberlebens unter Immuntherapie. Das mediane Gesamtüberleben verbesserte sich von 11 Monaten unter Chemotherapie auf 33 Monate unter Immuntherapie.

Diese Zahlen zeigen, wie immens wichtig eine frühzeitige Diagnose für die Patienten ist. Eine vom Robert Koch Institut veröffentlichte Statistik der Inzidenz- und Mortalitätsraten in Deutschland lässt sowohl bei Frauen als auch bei Männern eine Zunahme der Inzidenz bei ungefähr gleichbleibender Mortalität erkennen [9]. Garbe und Leiter erklären dies mit einer Veränderung von Sonnenexposition und Sonnenbrand bei jüngeren Generationen, sowie einer verbesserten und früheren Diagnose von kutanen Melanomen [7].

Klassifikation und Staging des malignen Melanoms erfolgen anhand der AJCC Klassifikation, welche auf dem UICC TNM-System basiert [10, 11]. Hierbei werden prognostische Faktoren wie die Tumordicke, eine mögliche Ulzeration sowie die Mitoserate des Tumors berücksichtigt [10]. Risikofaktoren, welche das Risiko einer Melanomentstehung erhöhen, sind unter anderem UV-Strahlung, Sonnenbrände in der Kindheit, genetische Faktoren, heller Hauttyp, sowie ein erhöhtes Vorkommen an Naevi [4].

Es gibt verschiedene histopathologische Subtypen des Melanoms [7]: Mit ca. 59% ist das superfiziell spreitende Melanom (SSM) die häufigste Form. Das noduläre Melanom macht knapp 21%, das lentigo-maligna-Melanom etwa 11% und das akrolentiginöse Melanom 4% aus.

Die Metastasierung eines malignen Melanoms kann sowohl auf hämatogenem als auch auf lymphogenem Wege entstehen. 70% der Erstmetastasen finden sich in den regionären Lymphknoten, wohingegen hämatogene Fernmetastasen vor allem in Leber, Lunge, zentralem Nervensystem und Knochen auftreten [4].

Der wichtigste Schritt in der Therapie des malignen Melanoms ist die chirurgische Resektion, welche mit Sicherheitsabstand, adaptiert an die Tumordicke des Primarius und der anatomischen Lokalisation, erfolgen sollte. Bei Nachweis einer lymphogenen Metastasierung (Wächterlymphknoten) kann die betroffene Lymphknotenstation ebenfalls reseziert werden. Dieses Vorgehen wird jedoch zunehmend in Frage gestellt. So haben beispielweise Leiter et al. in einer multizentrischen, randomisierten Phase-3-Studie gezeigt, dass die Lymphknotendisektion keinen Überlebensvorteil im Vergleich zur Observation erbrachte [12].

Singuläre Fernmetastasen werden wenn möglich operativ versorgt [4, 13]. Liegt bei Melanomen mit einer Tumordicke von mehr als zwei Millimetern keine Metastasierung im Wächterlymphknoten oder anderen Organen vor, so kann eine additive Therapie mit Interferon- α durchgeführt werden [4]. Des Weiteren kann eine Radiotherapie angewendet werden, beispielsweise bei ossären Metastasen [14].

Bei Fernmetastasierung und Inoperabilität wurde bis vor wenigen Jahren in der Routine eine Chemotherapie mit Dacarbazin appliziert [4]. Etwa 60% der Melanome weisen eine BRAF-Mutation auf [15, 16]. Liegt diese vor, so erfolgt heutzutage eine Kombinationstherapie mit BRAF- und MEK-Inhibitoren wie beispielsweise Vemurafenib/Cobimetinib oder Dabrafenib/Trametinib [17, 18].

In den letzten Jahren wurden neben den oben genannten Möglichkeiten weitere neue Therapieansätze für das metastasierte Melanom entwickelt. Mit diesen neuen Immuntherapien wie z.B. Ipilimumab, einem anti-CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4) Antikörper oder Nivolumab, einem anti-PD-1 (programmed cell death protein 1) Antikörper konnte das Gesamtüberleben beim metastasierten malignen Melanom wie bereits oben angeführt (siehe Forschner et al. [8]) verbessert werden [19-21].

1.2 Relaxin-2

Relaxin-2 ist ein sehr vielfältiges Hormon. Eine relaxierende Wirkung auf das Ligamentum pubicum bei Meerschweinchen durch Injektion von Seren trächtiger Hasen oder Meerschweinchen wurde erstmals von Frederick Hisaw im Jahre 1926 beschrieben. Er vermutete, dass hierbei u.a. die Ovarien eine wichtige Rolle spielen [22]. Einige Jahre später nannten er und Fevold das hierfür zuständige Hormon aufgrund seiner relaxierenden Wirkung „Relaxin“ [23].

Das Peptidhormon Relaxin-2 weist eine Molekülmasse von 6 kDa auf und besteht aus zwei Ketten [24]. Es ist Teil der Insulin/Relaxin-Superfamilie [25]. Neben Insulin und Relaxin-2 gehören dieser Familie auch Relaxin-1, Relaxin-3 [26], IGF 1 und IGF 2 (insulin-like growth factor 1/2) [27], INSL3 [28], INSL4 [29], INSL5 [30] und INSL6 [31] (insulin like 3-6) an. Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen den beiden Peptidhormonen Insulin und Relaxin zeigt sich u.a. durch eine identische Lokalisation der Disulfidbrücken [32].

Hudson et al [33] [34] haben in den 80er-Jahren gezeigt, dass das menschliche Genom über zwei Relaxin-Gene (H1 und H2, human relaxin gene H1/2) verfügt. Diese beiden Gene sind auf dem Chromosom 9 lokalisiert [35]. Bathgate et al entdeckten vor einigen Jahren ein drittes Relaxin-Gen (H3, human relaxin gene H3) auf Chromosom 19 des menschlichen Genoms [26].

Gunnarsen et al. [36] zeigten eine Expressierung des humanen H2-Relaxin-Genes in menschlichen Geweben von Plazenta, Ovar, Dezidua und Prostata, für das humane H1-Gen wurde ebenfalls eine Expressierung in der Prostata nachgewiesen. Im menschlichen Körper wird jedoch nur das vom H2-Gen stammende Relaxin in den Blutkreislauf sezerniert [37].

Es gibt verschieden Rezeptoren für Relaxin: Der Hauptrezeptor ist RXFP1 (Relaxin(/insulin like) family peptide receptor 1), welcher auch als LGR7 (Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 7) bezeichnet wird. An ihn bindet vor allem Relaxin-2, aber auch Relaxin-1 und -3 sowie INSL3. Agonist für RXFP2 (Relaxin(/insulin like) family peptide receptor 2), auch unter LGR8 (Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 8) bekannt, ist INSL3, aber auch Relaxin-2, -1 und -3 [37]. Sowohl RXFP1 als auch RXFP2 sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, welche durch Bindung von Relaxin zu einer erhöhten Produktion von cAMP (cyclisches Adenosinmonophosphat) führen [38].

Neben den wichtigen physiologischen Fähigkeiten von Relaxin-2 während Schwangerschaft und Geburt, welche u.a. von Downing et al. in diversen Studien bei Ratten untersucht wurden [39, 40], spielt Relaxin-2 auch in anderen Bereichen eine wichtige Rolle. Ein weiterer interessanter Aspekt ist der antifibrotische Effekt, welcher vom Hormon Relaxin-2 ausgeht und in den vergangenen Jahrzehnten bereits intensiv untersucht wurde u.a. von Unemori et al. [41]. Matrixmetalloproteinasen (MMPs) können Extrazellulärmatrix abbauen [42]. Unemori et al. zeigten, dass Relaxin-2 die Expression der Metalloproteinase Prokollagenase in dermalen Fibroblasten stimulierte [43]. In einer weiteren Publikation konnte in einem Mausmodell Bleomycin-induzierte Lungenfibrose durch Applikation von Relaxin-2 deutlich verbessert werden [41].

Im Laufe der Zeit wurden auch onkologische Aspekte von Relaxin-2 erforscht: Andere Krebsarten wie beispielsweise das Prostatakarzinom wurden bezüglich eines Einflusses von Relaxin-2 bereits untersucht. So zeigten die Ergebnisse von Feng et al. eine deutliche Auswirkung von Relaxin-2 auf die Proliferation, Invasion und Adhäsion der malignen Zellen [44]. Auch in Geweben von Schilddrüsenkarzinomen wurden Relaxin und LGR7 nachgewiesen sowie eine Zunahme der Migration unter Zugabe von Relaxin-2 [45].

In Anbetracht dieser bereits existierenden Daten zu diversen onkologischen Erkrankungen sowie der antifibrotischen Fähigkeit von Relaxin-2 stellte sich die Frage, ob Relaxin-2 ebenfalls eine Rolle im Tumorgeschehen maligner Melanome spielt.

2 Material und Methoden

2.1 Immunhistochemische Färbungen

Die Bilder der immunhistochemischen Färbungen wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn PD Dr. med. Christian Busch. Es handelt sich hierbei um Gewebe aus Naevi, Primärmelanomen und Melanometastasen. Die immunhistochemische Färbung erfolgte wie bei Adams et al. [46] beschrieben.

Für die Auswertung wurde die jeweilige Farbintensität der Relaxin-2-, RXFP1-, oder RXFP2-Färbung beurteilt. Es wurde unterschieden 1 = keine Färbung, 2 = leichte Färbung, 3 = mittlere Färbung und 4 = starke Färbung.

2.2 Zelllinien

Für die Experimente wurden die humanen Melanomzelllinien BLM (van Muijen, University Hospital Nijmegen, Nijmegen, Niederlande) und SBCL2 (Dr. Giovanelli, St. Joseph Hospital, Houston, Texas, USA) verwendet.

2.3 Relaxin-2

Das verwendete Relaxin-2 stammt von R&D Systems (Recombinant Human Relaxin-2 (B-33/A-24), R&D-Systems, Abingdon, OX14 3NB, Großbritannien).

2.4 Zellkultur

Für die Kultur der SBCL2 Zelllinie wurde T2-Medium verwendet, wobei auf 200 ml Basis-Medium 5 ml FBS (Fetal Bovine Serum) (FBS Superior, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland), 50 ml L15 (Leibovitz Medium) (L15, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland), 250 µl Insulin (Insulin human (I3536) recombinant, expressed in yeast, γ -irradiated, suitable for cell culture, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) und 250 µl Gentamicin (Gentamicin Solution, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) hinzugefügt wurden.

Für das Basis-Medium wurde MCDB-Pulver (Molecular, Cellular, and Developmental Biology) (MCDB 153 Medium, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutsch-

land)) zusammen mit 1,176 g Natriumbicarbonat in 1 l destilliertem Wasser gelöst und die pH-Einstellung auf 7,4 mittels Natriumhydroxid vorgenommen.

Die Zelllinie BLM wurde mit RPMI-Medium (Roswell Park Memorial Institute) (RPMI-Medium 1640 (1X), Gibco, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland)) kultiviert. 500 ml RPMI-Medium wurden mit 50 ml FBS (FBS Superior, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland), 5 ml Penicillin/Streptomycin (Penicillin/Streptomycin, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland), sowie 5 ml L-Glutamine (L-Glutamine, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) vervollständigt.

Im Gegensatz zu den unveränderten BLM-Zellen bekamen die generierten Klone zusätzlich eine Erhaltungsdosis Puromycin (Puromycin dihydrochloride (CAS (engl. Chemical Abstracts Service) 58-58-2), Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland) von 0,25 µg/ml.

Die Kultivierung der Zellen (75 cm²/25 cm², Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) erfolgte im Brutschrank bei 37°C mit 95% Sauerstoff und 5% CO₂.

Die Dichte des Zellrasens wurde täglich mikroskopisch kontrolliert (Olympus IX50, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland). Bei einer Dichte von 80-90% wurden die Zellen gesplittet. Hierzu wurde das verbrauchte Medium abgesaugt, anschließend wurden die Zellen mit ca. 5ml PBS (Phosphate Buffered Saline) (PBS Dulbecco, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) gewaschen. Nach Absaugen des PBS wurde 1 ml Trypsin (Trypsin/EDTA Solution, Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland) in die Zellkulturflasche gegeben, um die Zellen vom Boden der Flasche zu lösen. Um die Wirkung des Trypsins zu verbessern, wurde die Zellkulturflasche für einige Minuten in den Inkubator gestellt. Nach dem Ablösen wurden die Zellen in frischem RPMI-Medium aufgenommen und zentrifugiert. Die Zellen wurden in einem Verhältnis 1:10 verdünnt und weiterkultiviert.

2.5 Herstellung der shRNA-Klone

Um die Expression von Relaxin-2 in BLM-Zellen zu inhibieren, wurde ein Relaxin-2 shRNA Plasmid (Small-hairpin-RNA (engl. ribonucleic acid)) (h) (Relaxin-2 shRNA

Plasmid (h) (sc-63336-SH), Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland) verwendet.

2.5.1 Puromycin-Vorversuche

Das im Plasmid enthaltene Puromycin-Resistenz-Gen ermöglicht nach erfolgreicher Transfektion eine Selektion der sh-RNA exprimierenden Zellen.

In Vorversuchen (E. Holtorf) mit Puromycin wurde die geringste Puromycin-Konzentration ermittelt, bei der alle Zellen sterben. Hierfür wurden je 500.000 Zellen (BLM) in 6-Well-Platten (CELLSTAR 6 Well Cell Culture Multiwell Plates Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät und am folgenden Tag mit Puromycin in den folgenden Konzentrationen behandelt: 1 µg/ml, 2,5 µg/ml, 5 µg/ml, 7,5 µg/ml und 10 µg/ml. Alle zwei Tage erfolgte ein Mediumwechsel mit Puromycin. Die Vorversuche ergaben für BLM eine Puromycin-Konzentration von 2,5 µg/ml, als geringste Konzentration, die eine Selektion ermöglicht.

2.5.2 Transfektion des shRNA Plasmids

Für die Transfektion wurden zusätzlich ein Transfektionsreagenz, sowie ein Transfektionsmedium benötigt ((shRNA Plasmid Transfection Reagent (sc-108061), Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland) und (shRNA Plasmid Transfection Medium (sc-108062), Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland)).

Die lyophilisierte shRNA plasmid DNA (engl. desoxyribonucleic acid) wurde in 200 µl mitgeliefertem deionisiertem Wasser resuspendiert. Dies ergab eine Endkonzentration von 0,1 µg/µl in einer 10 mM Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan), 1 mM EDTA (engl. ethylene diamine tetraacetic acid) gepufferten Lösung. Das Verhältnis von shRNA Plasmid DNA zu shRNA Plasmid Transfection Reagent lag bei einem Mischverhältnis von 1 µg:3 µl.

Die folgenden Mengenangaben beziehen sich jeweils auf ein Well einer 6-Well-Platte. Die Transfektion wurde nach dem shRNA Transfection Protocol [47], welches im Folgenden wiedergegeben wird, durchgeführt.

Es wurden zwei Lösungen hergestellt: Lösung A und Lösung B. Lösung A enthielt 10 µl der resuspendierten shRNA Plasmid DNA (entsprechend 1 µg shRNA Plasmid

DNA), sowie 90 μ l shRNA Plasmid Transfection Medium. Lösung B enthielt neben 3 μ l shRNA Plasmid Transfection Reagent weiterhin 97 μ l shRNA Plasmid Transfection Medium. Die beiden Lösungen wurden mittels einer Pipette direkt gemischt. Nach vorsichtigem Vermengen wurde die Mischung für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Zellen zweimal mit je 2 ml shRNA Plasmid Transfection Medium gewaschen wurden, wurde das Medium abgesaugt. In jedes Well wurden 0,8 ml shRNA Plasmid Transfection Medium pipettiert. Anschließend wurden 200 μ l der Mischung aus Lösung A und B tröpfchenweise in jedes Well gegeben, sodass die gesamte Oberfläche damit bedeckt wurde. Die 6-Well Platte wurde vorsichtig geschüttelt, um die Zellschicht vollständig mit der Lösung zu bedecken. Nach einer fünfstündigen Inkubationszeit im Brutschrank wurde 1 ml normales Medium dazugegeben, allerdings mit zweifachem Gehalt an FBS Superior und Penicillin/Streptomycin. Anschließend wurden die Zellen wieder im Brutschrank inkubiert. 48 Stunden nach der Transfektion wurde das Medium abgesaugt und durch Medium mit Puromycin ersetzt. Basierend auf den Vorversuchen betrug die Puromycin Konzentration 2,5 μ g/ml. Dieses Medium wurde alle zwei Tage gewechselt, bis vereinzelte Kolonien sichtbar wurden, die „gepickt“ werden und in neue Wells übertragen werden konnten.

Anschließend wurde dieses Medium durch ein Erhaltungsmedium mit einer Puromycin Konzentration von 0,25 μ g/ml ersetzt.

Das Kontrollplasmid (Control shRNA Plasmid-A (sc-108060); Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland) wurde mit dem gleichen Verfahren in die Zellen eingebracht.

2.6 Herstellung von Lysaten für Western Blots

Zunächst wurden die Zellen vom Boden der Wells gelöst. Hierfür wurde das Medium in den Wells abgesaugt und die Zellen einmal mit 1 ml PBS pro Well gewaschen. Nach einer Gabe von einigen Tropfen Trypsin wurden die Platten für fünf Minuten im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgte die Aufnahme in 2 ml Medium und das Pipettieren in ein Falcon (CELLSTAR Polypropylen Röhrchen (15 ml) (Katalognummer 188271), Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland). Bei 1500 Umdrehungen pro Minute wurden die Zellen für fünf Minuten zentrifugiert (ROTIXA/RP, Andre-

as Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen mit 1 ml PBS resuspendiert und in ein Eppendorf-Cup (Eppendorf Safe-Lock Tubes (1,5 ml), Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) übertragen und weitere fünf Minuten (5000rpm) zentrifugiert. (Centrifuge 5424, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) Der Überstand wurde abermals abgesaugt und die Zellen in 20 µl Lysepuffer (10mM Tris-HCl pH 7,4; 200mM NaCl); 1mM EDTA; 10% Triton (Triton X-100 = Octoxinol-9) resuspendiert. Nach 20 Minuten im Eis, wurden die Eppendorf-Cups für 15 Minuten im Kühlraum bei 13000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Biofuge 13, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland). Der hierbei erhaltene Überstand war das Proteinlysate der jeweiligen Zellen. Dieser Überstand wurde in einen neuen Eppendorf-Cup pipettiert und bei -20°C eingefroren, das Pellet wurde verworfen.

2.7 Proteinbestimmung für Western Blots

Für die Proteinbestimmung wurde zunächst eine Verdünnungsreihe in acht Eppendorf Cups hergestellt. Im ersten befanden sich eine BSA-Konzentration von 10 µg/ml (in bidestilliertem Wasser) (Albumin Fraktion V, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland). Aufgrund der exponentiellen Abnahme der Konzentration in der Verdünnungsreihe, befand sich im zweiten Eppendorf Cup eine BSA-Konzentration von 5 µg/ml. Der dritte Cup enthielt 2,5 µg/ml, der vierte 1,25 µg/ml, der fünfte 0,625 µg/ml, der sechste 0,3125 µg/ml, der siebte 0,15625 µg/ml und der achte schließlich nur noch PBS, als Kontrolle.

Im Anschluss wurde eine 96-Well-Platte (96 Well Polystyrene Cell Culture Microplate (clear), Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) mit je 10 µl PBS pro Well gefüllt. Dazu wurde 1 µl der Verdünnungsreihe oder der Lysate pipettiert. Anschließend wurden 100 µl einer Bradford-Reagenz-PBS-Mischung (400 µl Bradford Reagenz: 1600 µl PBS) in jedes Well gegeben. Bradford-Reagenz (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland).

Nach fünf Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte im Mikropplattenleser (SLT SPECTRA, SLT Labinstrumente Deutschland GmbH, Crailsheim, Deutsch-

land) bei 620 nm ohne Reagenzfilter gemessen. Die Berechnung des Proteingehaltes erfolgte in Excel anhand der Verdünnungsreihe als Standard.

2.8 Western-Blots

Für die Durchführung der Western Blots wurden zuvor wie oben beschrieben Proteinbestimmungen mittels Bradford-Reagenz durchgeführt. Danach wurden jeweils 30 µg Protein mit jeweils 2,5 µl Loading Buffer (NuPAGE LDS Sample Buffer (4X), Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) und 1 µl Reducing Agent (NuPAGE Sample Reducing Agent (10X), Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) mit einem Endvolumen von 10 µl in kleine PCR-Gefäße (polymerase chain reaction) (Multiply-Pro Gefäß 0,5 ml, PP, Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) pipettiert. Diese wurden für fünf Minuten auf 95°C in der PCR-Maschine (PTC-200 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Inc., Waltham, MA, USA) erhitzt und danach kurz abzentrifugiert (Centrifuge 5424, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland).

Parallel hierzu wurde die Elektrophoresekammer (XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System, (Invitrogen), Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) vorbereitet. Das Gel (NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel, (Novex), Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) wurde in der Kammer fixiert, anschließend wurden die Kammern befüllt. Die kleine Kammer erhielt 10 ml SDS (sodium dodecyl sulfate) Running Buffer (NuPAGE MES SDS Running Buffer (20X), (Novex), Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland), 190 ml bidestilliertes Wasser, sowie 500 µl NuPAGE Antioxidant (NuPAGE Antioxidant (Novex), Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland). In die große Kammer wurden 570 ml bidestilliertes Wasser und 30 ml SDS Running Buffer gefüllt. Anschließend wurde vorsichtig der Steg des Gels gezogen.

In die erste Tasche des Gels wurden 6 µl des Markers PageRuler Prestained Protein Ladder (PageRuler Prestained Protein Ladder, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland), bzw. PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) pipettiert. Die übrigen Taschen wurden mit den zuvor vorbereiteten Proben gefüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V und 125 mA ca. eine Stunde lang.

Das anschließende Blotten wurde mittels iBlot Gel Transfer Device (iBlot Gel Transfer Device, (Invitrogen), Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Hierfür wurde die im Folgenden wiedergegebene Kurzübersicht des Herstellers befolgt [48].

Für oben genanntes System wurden iBlot Gel Transfer Stacks (iBlot Transfer Stack, nitrocellulose, regular size, (Novex), Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland) benötigt. Die Anode wurde (in ihrer Plastikschaale) auf dem Boden des iBlot Gel Transfer Device platziert und das Gel auf der Transfermembran der Anode positioniert. Danach wurde das zuvor in deionisiertem Wasser getränkte iBlot Filterpapier auf das Gel gelegt und eventuelle Blasen mit dem Blotting Roller entfernt. Schließlich wurde die Kathode mit der Elektrodenseite nach oben auf dem Filterpapier angebracht und mögliche Blasen wie im vorherigen Schritt entfernt. Der Schwamm wurde mit dem Metallkontakt nach oben rechts zeigend im Deckel des iBlot Gel Transfer Device befestigt und das Gerät anschließend geschlossen. Das ausgewählte Programm P3 lief für sieben Minuten bei 20 V.

Nach dem Blotten wurden die Membranen für eine Stunde geblockt (5% Magermilchpulver (Nonfat Dry Milk, Cell Signaling Technology Europe, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) in TBS-T (1x TBS (Tris-buffered saline), 0,1% Tween20 (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland))). Im Anschluss wurden die Membranen mit dem ersten Antikörper inkubiert. Als Kontrolle wurde β -Actin (β -Actin Antibody, Cell Signaling Technology Europe, New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland) verwendet. Die Verdünnung betrug 1: 1000, folglich wurden 5 μ l in 5 ml Milch verdünnt. Der Relaxin 1/2 Antikörper (Relaxin 1/2 Antikörper (N-18), Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland, Konzentration 200 μ g/ml) wurde 1:200 verdünnt, somit wurden 25 μ l auf 5 ml Milch gegeben. Die zuvor durchtrennten Membranen wurden mit der jeweiligen Antikörper-Verdünnung in ein 50 ml Falcon (CELLSTAR Polypropylen Röhren (50 ml) (Katalognummer 227261), Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) gegeben und über Nacht im Kühlraum auf einem sich permanent drehenden Rollenmischer (RM 5-40, CAT Ingenieurbüro M. Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland) gelagert. Am nächsten

Tag erfolgte ein dreimaliges Waschen der Membranen mit TBS-T für jeweils zehn Minuten.

Um TBS (10X) zu erhalten, wurden 60,57 g Tris und 87,66 g NaCl in 800 ml dd H₂O gelöst und anschließend der pH mit HCl (Chlorwasserstoff) auf 7,5 eingestellt. Abschließend wurde die Mischung noch mit bidestilliertem Wasser auf einen Liter aufgefüllt.

Danach wurden die jeweiligen Sekundärantikörper für mindestens eine Stunde zugegeben.

Bei den Zweit-Antikörpern handelte es sich für β -Actin um „Anti-Rabbit“ (ECL-Peroxidase (enhanced chemiluminescence) labelled anti-rabbit antibody, GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) und für Relaxin 1/2 um „Anti-Goat“ (donkey anti-goat IgG (Immunglobulin G) -HRP (Horseradish Peroxidase), Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland). Der „Anti-Rabbit“-Antikörper wurde 1:10.000 verdünnt (2,5 μ l auf 25 ml Milch), für den „Anti-Goat“-Antikörper wurde eine 1:2000 Verdünnung (12,5 μ l auf 25 ml Milch) vorgenommen. Anschließend wurden die Membranen erneut dreimal mit TBS-T für je zehn Minuten gewaschen.

Danach wurden die Zweit-Antikörper mittels ECL (Pierce ECL Western Blotting Substrate, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland) sichtbar gemacht. Hierfür wurden die beiden Substanzen gleichermaßen vermischt und auf die Membranen aufgetragen, sodass diese bedeckt waren. Nach einer Minute wurde die Flüssigkeit mittels Löschpapier sorgfältig entfernt und die Membranen in eine dünne, durchsichtige Plastikfolie gelegt und anschließend entwickelt (FUJI Super RX, FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland).

2.9 Zellzahl

2.9.1 SBCL2

Für diesen Versuch wurden 10^5 Zellen pro Well in eine 24-Well-Platte (CELLSTAR 24 Well Cell Culture Multiwell Plates, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) ausgesät und nach 24 Stunden im Brutschrank mit Relaxin-2 in folgenden Konzentrationen behandelt: unbehandelt, 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml.

Nach weiteren 24 Stunden im Brutschrank wurde die Platte ausgezählt. Hierfür wurde das Medium abgesaugt, die Wells mit je einem ml PBS gewaschen, mit 150 μ l Trypsin gelöst und anschließend in 500 μ l Medium wieder aufgenommen. Die Gesamtzellzahl wurde mittels einer Neubauer Zählkammer ermittelt.

2.9.2 BLM

Für diese Zelllinie, sowie für den generierten Klon und das Kontrollplasmid, erfolgte der Versuch gleichermaßen, allerdings erfolgte 24 Stunden nach dem Aussäen keine Relaxin-2-Behandlung, sondern direkt die Auszählung der Platte.

2.10 Migrationsassay

2.10.1 SBCL2

Um die Migrationsfähigkeit der Zellen unter Relaxin-2 zu analysieren, wurden die Zellen zunächst trypsiniert, in einer Neubauer Zählkammer gezählt und anschließend auf $5 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt. Anschließend wurden je 70 μ l der Zellsuspension in zuvor vorbereitete Kammern pipettiert. Hierbei handelt es sich um μ -Slides 8 Well (μ -Slide 8 Well, ibidi GmbH, Planegg/Martinsried, Deutschland), in welche sogenannte Culture Inserts (Culture Inserts, ibidi GmbH, Planegg/Martinsried, Deutschland) eingesetzt wurden. Diese Culture Inserts aus Silikon sind durch einen Steg in zwei Kammern unterteilt, wobei in jede Kammer 70 μ l der Zellsuspension ausgesät wurden. Nach 24 Stunden im Brutschrank, welche dem Anheften der Zellen am Boden der Wells diente, wurden die Culture Inserts mittels Pinzette entfernt, das alte Medium abgesaugt und durch 250 μ l frisches Medium ersetzt. Nachfolgend wurden unterschiedliche Relaxin-2-Konzentrationen zugegeben, sodass folgende Behandlungsgruppen vorhanden waren: unbehandelt, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml.

Anschließend erfolgten die Aufnahmen zum Zeitpunkt Null. Hierzu wurden die Slides mit vierzigfacher Vergrößerung unter dem Mikroskop (Olympus CK40, Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) mithilfe der Software Tsview 7 fotografiert.

Nachdem die Zellen weitere 24 Stunden im Brutschrank aufbewahrt wurden, erfolgten die Aufnahmen 24 Stunden nach Behandlung.

Die Auswertung der Bilder wurde mit dem Programm ImageJ durchgeführt. Gemessen wurden auf jedem Bild die Fläche (in Pixel) zwischen den beiden Zellrasen, sowie die Gesamtgröße der Bilder. Daraus wurde die prozentuale Reduktion der freien Fläche über 24 Stunden berechnet.

2.10.2 BLM

Für diese Zelllinie, ihren Klon und ihr Kontrollplasmid wurde der Versuch gleichermaßen durchgeführt, allerdings wurde nach Entfernung der Culture Inserts nur das Medium ersetzt, es erfolgte keine Behandlung mit Relaxin-2. Die Anzahl der Zellen betrug für BLM $3 \cdot 10^5$.

2.11 Adhäsionsassay

Für diesen Versuch wurden Kollagenplatten benötigt, die wie folgt hergestellt wurden. Für die Kollagenplatten wurde eine Lösung aus 50 µg Kollagen/ml (Collagen Type I (Rat Tail), Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) in 20 mM Essigsäure hergestellt. Von dieser Kollagenverdünnung wurden je 100 µl in jedes Well pipettiert und die 96-Well-Platte für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die überschüssige Lösung vorsichtig abgenommen und einmal mit je 150 µl PBS pro Well gewaschen. Je nach Bedarf wurden die Platten sofort verwendet oder getrocknet und im Kühlschrank aufbewahrt.

Für diesen Versuch wurden die Zellen zunächst gefärbt. Hierzu wurden sie in der Zentrifuge ROTIXA/RP für fünf Minuten bei 1500 rpm abzentrifugiert, anschließend mit 3 ml PBS gewaschen und nochmals abzentrifugiert. In jeden Falcon wurden nun 3 ml einer PBS/CFSE (Carboxyfluorescein succinimidyl ester) -Mischung gegeben (10 ml PBS, 4 µl CFSE (5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland). Für eine optimale Färbung wurden die Zellen für 20 Minuten in den Brutschrank gestellt und danach abermals abzentrifugiert, gewaschen und nochmals abzentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen in ca. 3 ml Medium ohne FBS, mit 0,5% BSA (Bovine Serum Albumin) aufgenommen.

Die Zelllinie BLM unterschied sich von der SBCL2-Zelllinie bezüglich des weiteren Procedere dieses Versuches: Die BLM-Zellen erhielten nach der CFSE-Färbung Medium ohne FBS und mit 0,5% BSA und wurden im Anschluss sofort wie unten beschrie-

ben gezählt und ausgesät. Die SBCL2-Zellen wurden zunächst in drei 25 cm² Zellkulturflaschen mit normalem Medium ausgesät, um eine ausreichende Zellzahl zu erhalten.

Nach einer 24-stündigen Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen einmal mit je 3 ml PBS und zweimal mit je 3 ml FBS-freiem Medium gewaschen und anschließend auch mit FBS-freiem Medium versorgt. Danach erfolgte eine Zugabe von Relaxin-2, sodass es folgende Behandlungsgruppen gab: unbehandelt, 50 ng/ml, 100 ng/ml. Nach weiteren 24 Stunden im Brutschrank wurden die Zellen gelöst und wie nachfolgend beschrieben ausgesät.

Dieser letzte Versuchsabschnitt gestaltete sich nun wieder für alle Zelllinien gleich. Nach der Zählung mittels einer Neubauer Zählkammer, wurden die Zellen auf die zuvor angefertigte Kollagenplatte ausgesät. Hierbei wurde eine Standardreihe angelegt mit jeweils 20.000, 10.000, 5.000, 2.500 und 1.250 Zellen, sowie die jeweiligen Behandlungsgruppen. Für BLM waren dies die Kontrolle, Klon und Kontrollplasmid. Für SBCL2 ergaben sich folgende Relaxin-2-Konzentrationen: unbehandelt, 50 ng/ml und 100 ng/ml.

Nach einer Stunde im Brutschrank wurde das Medium mit einer Mehrkanalpipette abgesaugt und je 150 µl PBS in die Wells gegeben. Die Messung erfolgte direkt im Anschluss mit dem Mikroplattenleser (TriStar LB 941 Multimode Mikroplattenleser, Berthold Technologies GmbH & Co. KG, Bad Wildbad, Deutschland) und dem Programm MikroWin 2000.

Für die Standardreihe wurden die jeweiligen Mittelwerte gebildet und ein Punktediagramm mit interpolierten Linien und Datenpunkten erstellt. In die lineare Trendlinie wurden die unterschiedlichen Werte der verschiedenen Behandlungsgruppen bzw. Klone eingesetzt und diese dann nach x aufgelöst. Aus den hierbei berechneten Werten wurden die Mittelwerte gebildet, welche anschließend verglichen werden konnten.

2.12 MUH-Assay

Dieser Versuch wurde mit der Zelllinie BLM, sowie deren Klon und Kontrollplasmid durchgeführt. Hierfür wurden in eine 96-Well-Platte je 2500 Zellen pro Well in 50 µl Medium ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium ausgeschlagen und die Platte

zweimal mit je 150 μ l PBS pro Well gewaschen. Nach dem zweiten Waschen wurde die Platte kurz „getrocknet“. Im Anschluss wurde in jedes Well 100 μ l der MUH-PBS-Mischung (4-Methylumbelliferyl heptanoate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) (Mischung: 10 ml PBS und 100 μ l MUH) gegeben. Nach einer einstündigen Inkubation im Brutschrank wurde die Platte direkt im Mikroplattenleser mit dem Programm MikroWin 2000 gemessen.

Um die Proliferation der jeweiligen Gruppen vergleichen zu können wurde der prozentuale Anteil der einzelnen Werte zum Mittelwert der Kontrolle berechnet.

3 Ergebnisse

Die statistische Auswertung erfolgte mittels *IBM SPSS Statistics v24*. Zur Darstellung der Messwerte wurde auf Boxplots zurückgegriffen. Hierbei befinden sich 50% der Werte innerhalb der Box, in welcher auch der Median als horizontale Markierung angezeigt wird. Das 1. und 4. Quartil werden durch Antennen nach oben und unten begrenzt, die bis zum 1,5-fachen Interquartilsabstand (IQR, engl. interquartile range) reichen. Werte zwischen dem 1,5-fachen und 3-fachen IQR werden als einfache Ausreißer, Werte größer als der 3-fache IQR als extreme Ausreißer bezeichnet. Kreise symbolisieren einfache, Sterne extreme Ausreißer.

Die Bewertung der immunhistochemischen Bilder erfolgte anhand diskreter Werte (1-4), weshalb eine Darstellung über Boxplots nicht sinnvoll ist. Die Verschiebung der Färbungsintensitäten zwischen den verschiedenen Geweben lässt sich aus gruppierten Balkendiagrammen einfacher erkennen.

Die Daten wurden einer einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, engl. analysis of variances) mit Bonferroni-Korrektur unterzogen. Die ANOVA führt T-Tests zwischen allen Gruppen des Versuchs durch. Das Signifikanzniveau ist in dieser Arbeit auf 5% festgelegt, da sich dieser Wert in der Wissenschaft etabliert hat. Dies bedeutet, dass der akzeptierte Alpha-Fehler (die Irrtumswahrscheinlichkeit) bei 5% liegt. Werden nun mehrere Gruppen miteinander verglichen, d.h. mehrere T-Tests durchgeführt, kumulieren die Alpha-Fehler. Die Bonferroni-Korrektur wirkt diesem Effekt entgegen, sodass die korrigierten Ergebnisse wieder gegen 5% getestet werden können. Bei p-Werten bis 10% wird eine Tendenz angenommen.

Zur Berechnung der Effektstärke wurde Cohens d herangezogen. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 1.

Tabelle 1: Cohens d und zugehörige Effektstärke

Cohens d	Effektstärke
$d < 0,2$	kein Effekt
$0,2 \leq d < 0,5$	kleiner Effekt
$0,5 \leq d < 0,8$	mittlerer Effekt
$d \geq 0,8$	großer Effekt

3.1 Immunhistochemische Färbungen

Die immunhistochemischen Färbungen wurden extern in Vorversuchen angefertigt. Untersucht wurden Relaxin-2, sowie die Rezeptoren RXFP1 (=LGR7) und RXFP2 (=LGR8) in Naevi, Melanomen und Melanommetastasen. Die Intensität der Färbung wurde in den unterschiedlichen Geweben überprüft um zu zeigen, ob zwischen Naevus, Melanom und Melanommetastase ein signifikanter Unterschied besteht.

Abbildung 1 zeigt eine Übersicht der drei Färbungen der unterschiedlichen melanozytären Gewebe. Es ist mit bloßem Auge eine Zunahme der Färbungsintensität für Relaxin-2, RXFP1 und RXFP2 bei Melanom und Melanommetastase im Vergleich zum Naevus erkennbar. Ob sich dieses Verhalten verallgemeinern lässt, wurde in einer ausführlichen Untersuchung weiterer immunhistochemischer Bilder überprüft.

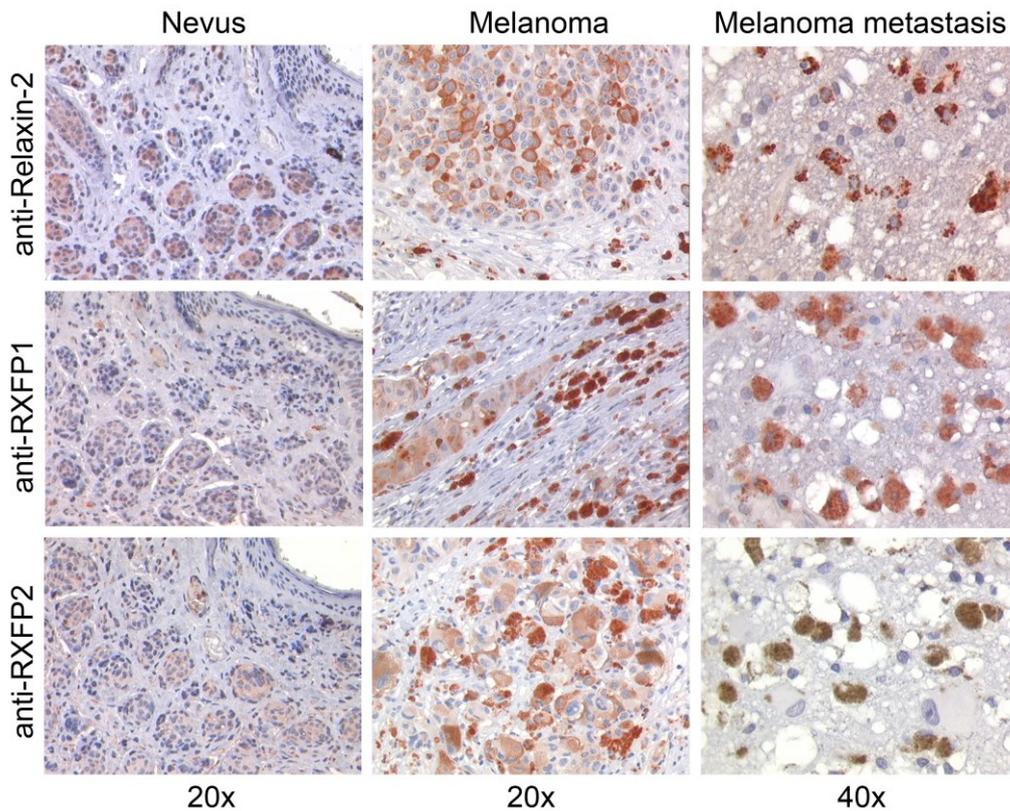


Abbildung 1: Histologie von melanozytären Geweben mit immunhistochemischen Färbungen von Relaxin-2, RXFP1, RXFP2 [49].

Die zur Auswertung verwendeten immunhistochemisch gefärbten Präparate wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. med. Christian Busch. Die Beurteilung der Färbungsintensität erfolgte visuell nach dem Vieraugenprinzip mit einer Bewertungsskala von 1-4:

- 1 = keine Färbung
- 2 = leichte Färbung
- 3 = mittlere Färbung
- 4 = starke Färbung

3.1.1 RXFP-1

Es ergab sich im Falle des Relaxin-2-Rezeptors RXFP-1 die erwartete Zunahme der Färbungsintensität bei Primärmelanomen und Melanommetastasen, wie in Abbildung 2 und Tabelle 2 zu sehen ist. Insbesondere von Naevi zu Melanommetastasen zeigt sich eine deutliche Verschiebung hin zu höheren Färbungsintensitäten.

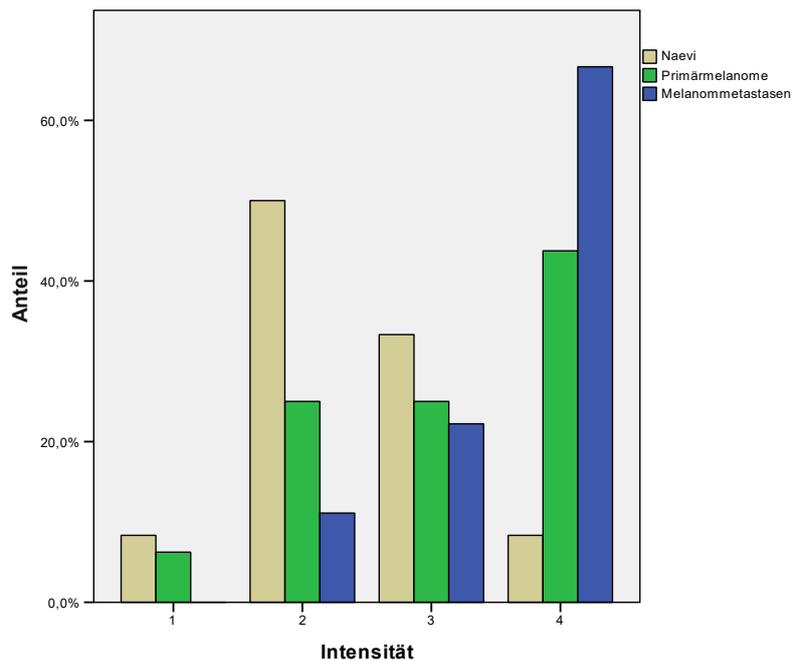


Abbildung 2: Prozentuale Verteilung der Färbungsintensität von melanozytären Geweben für RXFP-1

Tabelle 2: Ergebnisse immunhistochemische Färbungen RXFP1

	Stichprobengröße N	Mittelwert
Naevi	12	2,42
Primärmelanome	16	3,06
Melanommetastasen	9	3,56

Die Zunahme der Färbungsintensität von Naevi zu Melanommetastasen um 47% fällt hierbei mit einem p-Wert von 0,017 statistisch signifikant aus. Nach Cohen ergibt sich mit $d=1,50$ eine große Effektstärke. In den anderen beiden Vergleichen sind Zunahmen von 26% respektive 16% erkennbar, welche jedoch statistisch nicht signifikant ausfallen (vgl. Tabelle 3).

Tabelle 3: Statistische Auswertung über die Paarvergleiche der immunhistochemischen Färbung für RXFP-1. Alle Werte sind bereits nach Bonferroni korrigiert.

Gruppenvergleich	p-Wert	Signifikanz	standardisierte Differenz <i>d</i>	Effektstärke
Naevi vs. Primärmelanome	0,186	Nein	0,71	mittel
Naevi vs. Melanommetastasen	0,017	Ja	1,50	groß
Primärmelanome vs. Melanommetastasen	0,557	Nein	0,58	mittel

3.1.2 RXFP-2

Abbildung 3 und Tabelle 4 zeigen die Veränderung der Färbungsintensität für den Relaxin-2-Rezeptor RXFP-2. Für Primärmelanome ist eine deutliche, für Melanommetastasen eine noch größere Steigerung erkennbar.

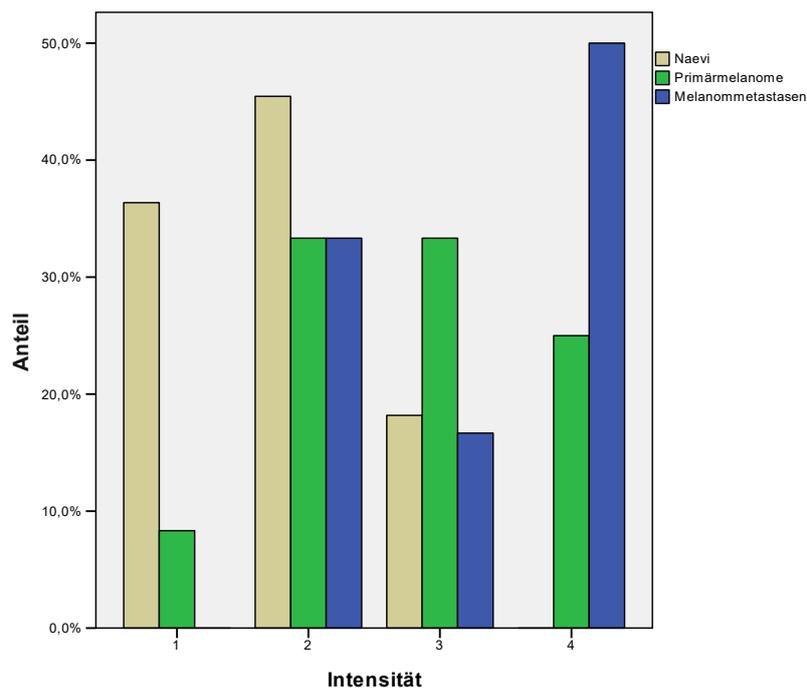


Abbildung 3: Prozentuale Verteilung der Färbungsintensität von melanozytären Geweben für RXFP-2

Tabelle 4: Ergebnisse immunhistochemische Färbungen RXFP-2

	Stichprobengröße N	Mittelwert
Naevi	11	1,82
Primärmelanome	12	2,75
Melanometastasen	6	3,17

Ein Anstieg der Färbungsintensität um 51% zeigt sich von Naevi zu Primärmelanomen, welcher mit einem p-Wert von 0,057 zwar keine Signifikanz, jedoch eine Tendenz aufweist. Der Vergleich von Naevi zu Melanometastasen ist mit einer Zunahme von 74% und einem p-Wert von 0,019 ein statistisch signifikantes Ergebnis großer Effektstärke ($d=1,55$). Die vollständige Auswertung findet sich in Tabelle 5.

Tabelle 5: Statistische Auswertung über die Paarvergleiche der immunhistochemischen Färbung für RXFP-2. Alle Werte sind bereits nach Bonferroni korrigiert.

Gruppenvergleich	p-Wert	Signifikanz	standardisierte Differenz d	Effektstärke
Naevi vs. Primärmelanome	0,057	Tendenz	1,08	groß
Naevi vs. Melanometastasen	0,019	Ja	1,55	groß
Primärmelanome vs. Melanometastasen	1,000	Nein	0,43	klein

3.1.3 Relaxin-2

Wie in Abbildung 4 und Tabelle 6 ersichtlich, ergibt die Auswertung der immunhistochemischen Färbung mit Relaxin-2 ebenfalls eine Erhöhung der Färbungsintensität bei Primärmelanomen und Melanometastasen, welche für beide Gruppen annähernd die gleiche Größe annimmt. Der Intensitätsunterschied der Melanomgewebe zu den Naevi ist dabei etwas schwächer ausgeprägt als bei RXFP-1 und RXFP-2, was auf die relativ starke Grundfärbung der Naevi für Relaxin-2 zurückzuführen ist.

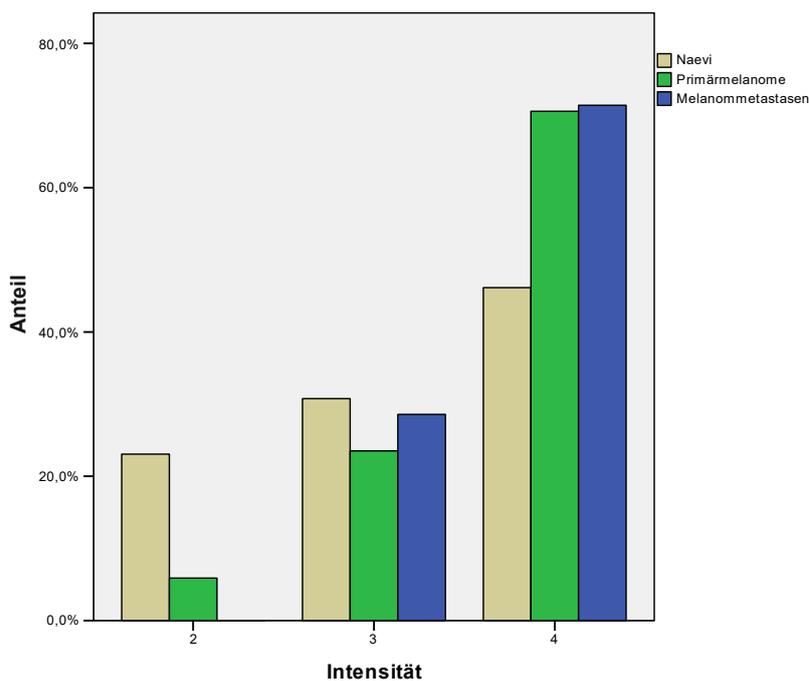


Abbildung 4: Prozentuale Verteilung der Färbungsintensität von melanozytären Geweben für Relaxin-2

Tabelle 6: Ergebnisse immunhistochemische Färbungen Relaxin-2

	Stichprobengröße N	Mittelwert
Naevi	13	3,23
Primärmelanome	17	3,65
Melanommetastasen	7	3,71

Für die Färbung der melanozytären Gewebe mit Relaxin-2 zeigt sich mit p-Werten von 0,412 und 0,314 sowohl für Primärmelanome als auch für Melanommetastasen keine statistisch signifikante Zunahme der Färbungsintensität im Vergleich zur Gruppe der Naevi (vgl. Tabelle 7). Allerdings ist bei den Primärmelanomen eine Steigerung um 13% und bei den Melanommetastasen um knapp 15% im Vergleich zu den Naevi zu verzeichnen.

Tabelle 7: Statistische Auswertung über die Paarvergleiche der immunhistochemischen Färbung für Relaxin-2. Alle Werte sind bereits nach Bonferroni korrigiert.

Gruppenvergleich	p-Wert	Signifikanz	standardisierte Differenz d	Effektstärke
Naevi vs. Primärmelanome	0,314	Nein	0,58	mittel
Naevi vs. Melanommetastasen	0,412	Nein	0,73	mittel
Primärmelanome vs. Melanommetastasen	1,000	Nein	0,11	keine

Grosse et al. [49] untersuchten neben den unterschiedlichen melanozytären Geweben auch die intratumorale Lokalisation der Relaxin-2-Expression in Melanomen. Das Vorkommen von Relaxin-2 wurde hier bevorzugt im Randbereich der Melanome festgestellt, was in Abbildung 5 gut zu erkennen ist.

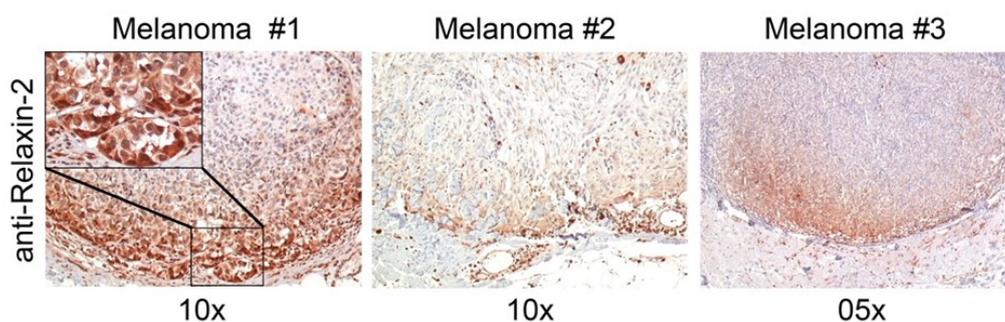


Abbildung 5: Histologie von Melanomen mit starker immunhistochemischer Expression von Relaxin-2 im Randbereich [49]

3.2 Auswahl der Zelllinien

In Vorversuchen wurde die Expression von Relaxin-2, sowie der Relaxin-Rezeptoren RXFP1 und RXFP2 unterschiedlicher Melanomzelllinien mittels Western Blot untersucht (vgl. Abbildung 6). Für das weitere experimentelle Vorgehen wurde schließlich BLM ausgewählt, da diese Zelllinie eine starke Bande für Relaxin-2 zeigte und aus humanem metastatischem Melanomgewebe stammt [50, 51]. Mittels Transfektion wurde ein Plasmid mit entsprechender Gensequenz (shRNA) in die Zellen gebracht, um zielgerichtet die Expression von Relaxin-2 zu inhibieren. Die Selektion der Zelllinie SBCL2 erfolgte aufgrund ihrer schwachen Relaxin-2-Bande, um Kontrollversuche, d.h. mit Zu-

gabe von Relaxin-2, durchzuführen. Zudem handelt es sich bei SBCL2 um humane Melanomzellen, welche einem radialen Wachstumsmuster folgen [52].

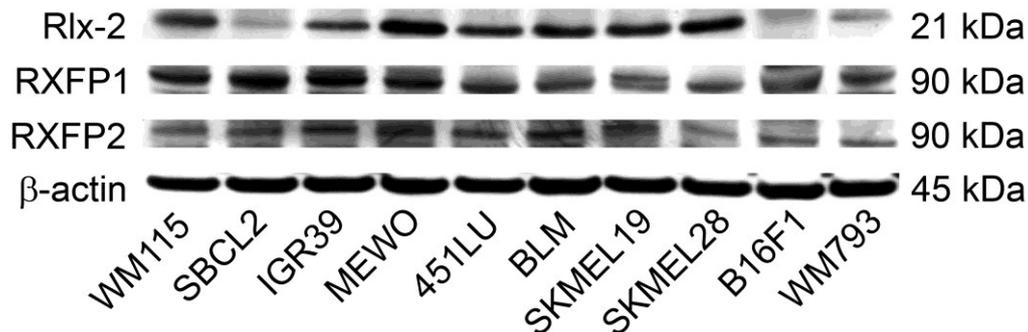


Abbildung 6: Western Blot diverser Melanomzelllinien für Rlx-2 (Relaxin-2), RXFP1 und RXFP2 [49]

3.3 Herstellung der Klone – Überprüfung mit Western Blot

BLM Zellen wurden zum einen mit Relaxin-2 shRNA transfiziert und zum anderen mit einer funktionslosen Variante, um Kontrollklone zu generieren.

Mittels Western Blot wurden die generierten Klone analysiert und für weitere Versuche jeweils der beste Klon ausgewählt. Im Western Blot wurden die Proteinlysate der jeweiligen Klone zusammen mit den unbehandelten Kontrollen, d.h. den Proteinlysaten der ursprünglichen Zelllinien aufgetragen. Die β -Actin-Bande (ca. 45 kDa) diente hierbei als Ladekontrolle für die Proteinlysate. Die Bande für Relaxin-2 lag bei ca. 21 kDa. Eine starke Expression von Relaxin-2 in den Zellen führt zu einer deutlich sichtbaren, dunklen Bande.

In Abbildung 7 sind Klon und Kontrollplasmid, welche für die weiteren Versuche ausgewählt wurden, dargestellt.

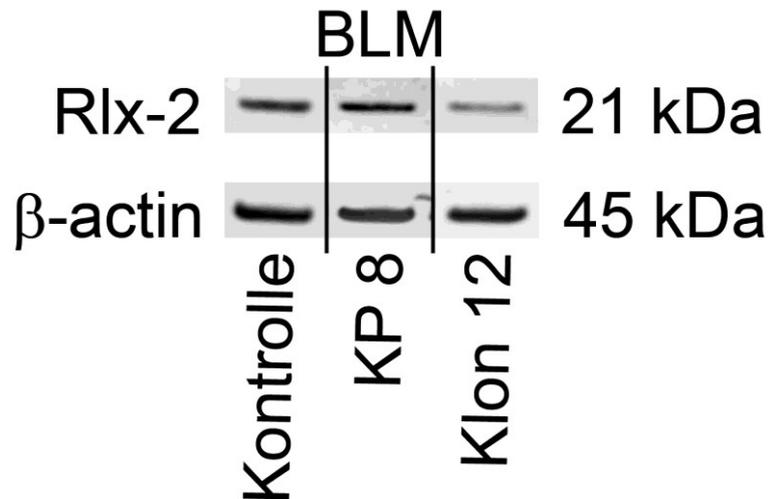


Abbildung 7: Western Blot der Zelllinie BLM mit Bande für Rlx-2 (Relaxin-2) bei Kontrolle und den shRNA-Plasmiden Kontrollplasmid 8 und Klon 12

3.4 Zellzahl

Dieser Versuch sollte untersuchen, welchen Einfluss Relaxin-2 auf die Proliferation der verschiedenen Melanomzelllinien hat. Der Versuch wurde je dreimal für beide Zelllinien durchgeführt. Als Kontrollen dienten zum einen die unbehandelten Zellen (SBCL2), und zum anderen die ursprüngliche Zelllinie (BLM).

3.4.1 SBCL2

SBCL2-Zellen wurden mit einer aufsteigenden Dosierung Relaxin-2 stimuliert und nach 24 h die Proliferation anhand der absoluten Zellzahl bestimmt. Die Stichprobengröße betrug hierbei in allen Gruppen N=48. Der Boxplot in Abbildung 8 sowie die Werte in Tabelle 8 zeigen in etwa eine Verdopplung der Zellzahlen unter allen Relaxin-2-Dosierungen, wobei sich die Zunahme nicht konzentrationsabhängig darstellt. Die statistische Auswertung ergab mit p-Werten von 0,000 für die Vergleiche der Gruppen zur Kontrolle signifikante Ergebnisse, die Vergleiche der Relaxin-2-Gruppen untereinander ergaben keinen signifikanten Unterschied. Mit einer standardisierten Differenz d zwischen 1,59 und 1,97 wiesen alle Gruppenvergleiche gegen die Kontrolle eine große Effektstärke auf.

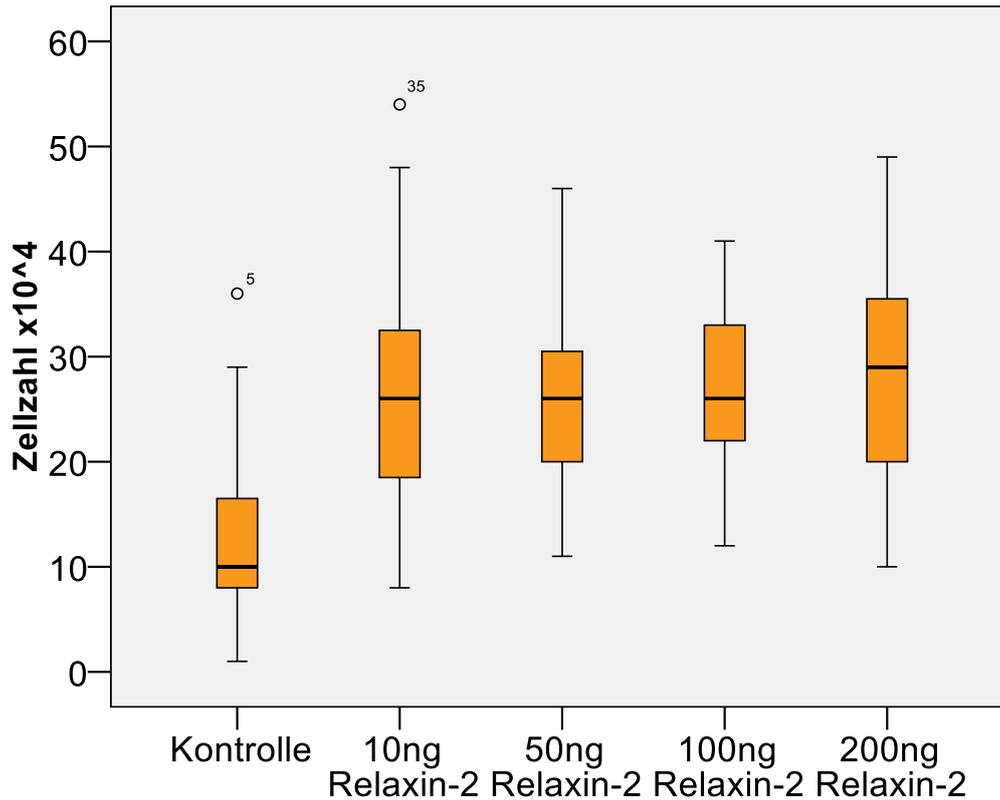


Abbildung 8: Boxplot zum Einfluss von Relaxin-2 auf die Zellzahl der Zelllinie SBCL2

Tabelle 8: Statistische Auswertung über die Zellzahl der Zelllinie SBCL2. p-Werte beziehen sich auf den Vergleich mit der Kontrolle, alle Werte nach Bonferroni korrigiert, signifikante Werte mit * markiert.

	Mittelwert [x10 ⁴]	p-Wert	Standardisierte Differenz <i>d</i>	Effektstärke
Kontrolle	12,5	-	-	-
10 ng/ml	26,7	0,000*	1,59	groß
50 ng/ml	26,3	0,000*	1,82	groß
100 ng/ml	26,9	0,000*	1,97	groß
200 ng/ml	28,5	0,000*	1,85	groß

3.4.2 BLM

Für diese Zelllinie erfolgte 24 Stunden nach Aussaat die Ermittlung der absoluten Zellzahl und somit die Bestimmung der Proliferation. Die Stichprobengröße betrug auch hier bei allen Gruppen N=48. Der in Abbildung 9 mittels Boxplot dargestellte Vergleich

von Kontrolle, Kontrollplasmid 8 und Klon 12 zeigt eine leichte Abnahme der Zellzahl bei Kontrollplasmid 8 und Klon 12 welcher in Tabelle 9 quantifiziert wird.

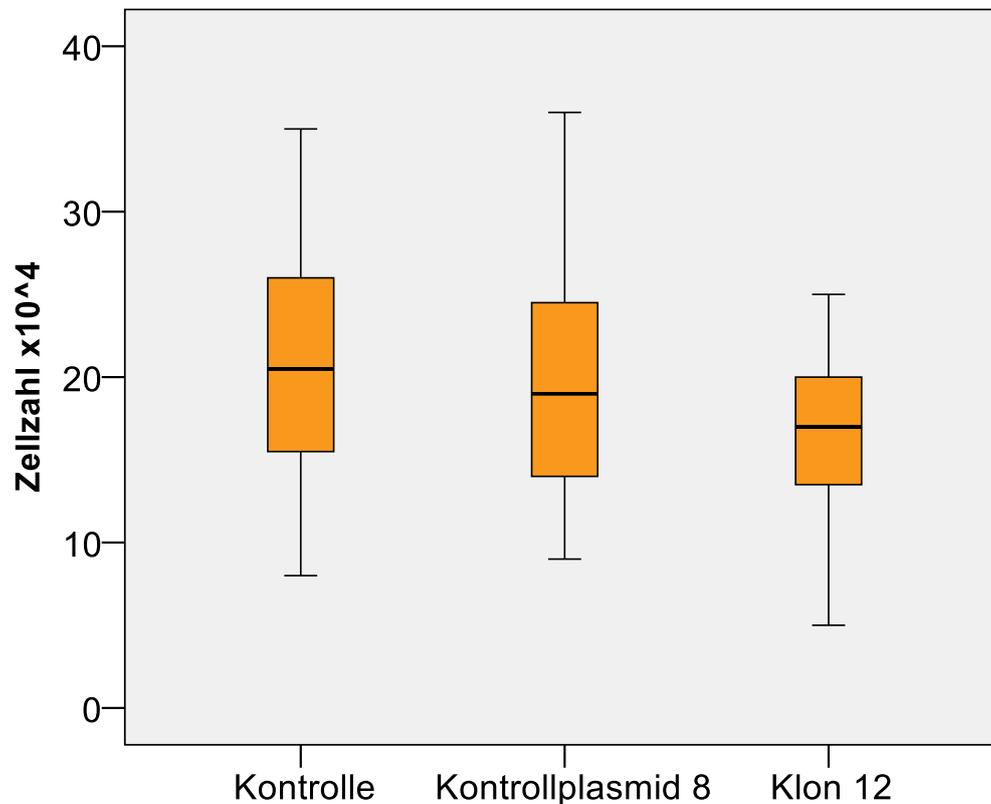


Abbildung 9: Boxplot zum Einfluss von Relaxin-2 durch shRNA auf die Zelllinie BLM

Tabelle 9: Ergebnisse Zellzahl BLM

	Stichprobengröße N	Mittelwert
Kontrolle	48	21,35
Kontrollplasmid 8	48	19,96
Klon 12	48	16,73

Wie in Tabelle 10 zu sehen, fällt der Unterschied zwischen Kontrolle und Kontrollplasmid 8 statistisch nicht signifikant aus. Der Vergleich von Kontrolle und Klon 12 hingegen ergibt mit einem p-Wert von 0,001 und einer Abnahme von 22% eine statistisch signifikante Verminderung der Zellzahl. Von Kontrollplasmid 8 zu Klon 12 besteht mit $p=0,040$ ebenfalls eine statistisch signifikante Reduktion um 16%. Mit einer

standardisierten Differenz d von 0,79 bzw. 0,56 weisen die signifikanten Gruppenvergleiche somit eine mittlere Effektstärke auf.

Tabelle 10: Statistische Auswertung über die Zellzahl der Zelllinie BLM. Alle Werte nach Bonferroni korrigiert, signifikante Werte mit * markiert.

Gruppenvergleich	p-Wert	Standardisierte Differenz d	Effektstärke
Kontrolle vs. Kontrollplasmid 8	0,841	0,198	keine
Kontrolle vs. Klon 12	0,001*	0,792	mittel
Kontrollplasmid 8 vs. Klon 12	0,040*	0,560	mittel

3.5 MUH-Assay

Für eine genauere Untersuchung der Proliferation unter Einfluss von Relaxin-2 wurde im Anschluss an den Zellzahlversuch ein MUH-Assay für die Zelllinie BLM durchgeführt.

Der Mittelwert der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt. Verglichen hiermit weist das Kontrollplasmid 8 eine Abnahme der Proliferation mit großer Streubreite der Werte auf (siehe Abbildung 10 und Tabelle 11). Für Klon 12 besteht eine starke Proliferationsreduktion auf knapp 65%. Der Versuch erfolgte für BLM dreimal mit einer Stichprobengröße von $N=24$ in allen Gruppen.

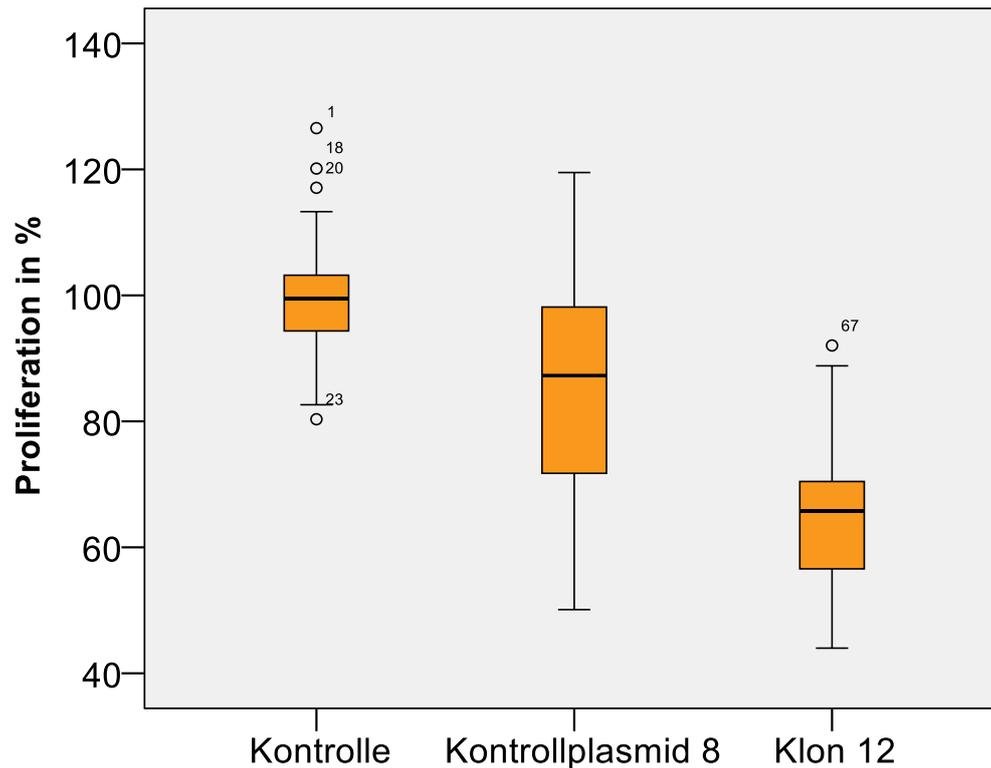


Abbildung 10: Boxplot zum Einfluss von Relaxin-2 auf die Proliferation der Zelllinie BLM

Tabelle 11: Ergebnisse MUH-Assay BLM

	Stichprobengröße N	Mittelwert
Kontrolle	24	100,0
Kontrollplasmid 8	24	86,0
Klon 12	24	64,8

Im MUH-Assay zeigten sich mit p-Werten von 0,003 und 0,000 statistisch hoch signifikante Unterschiede in allen Gruppenvergleichen. Für den Unterschied von Kontrolle zu Klon 12 ergab sich mit $d=3,15$ eine große Effektstärke. Diese zeigte sich auch bei den anderen Vergleichen, allerdings fielen hier die Werte für die standardisierte Differenz mit $d=0,93$ und $d=1,42$ deutlich kleiner aus.

Tabelle 12: Statistische Auswertung des MUH-Assays der Zelllinie BLM. Alle Werte nach Bonferroni korrigiert, signifikante Werte mit * markiert.

Gruppenvergleich	p-Wert	Standardisierte Differenz <i>d</i>	Effektstärke
Kontrolle vs. Kontrollplasmid 8	0,003*	0,93	groß
Kontrolle vs. Klon 12	0,000*	3,15	groß
Kontrollplasmid 8 vs. Klon 12	0,000*	1,42	groß

3.6 Migrationsassay

Ziel dieses Versuches war die Untersuchung des Einflusses von Relaxin-2 auf die Migrationsfähigkeit der Melanomzelllinien. Der Migrationsassay erfolgte viermal für die Zelllinie SBCL2 und dreimal für BLM. Unbehandelte SBCL2-Zellen, sowie die ursprüngliche BLM-Zelllinie stellten die Kontrollen dar.

3.6.1 SBCL2

Die Migrationsfähigkeit der SBCL2-Zellen wurde unmittelbar nach der Relaxin-2-Behandlung und nach 24 Stunden untersucht. Abbildung 11 und Tabelle 13 zeigen eine konzentrationsabhängige Zunahme der Flächenreduktion mit steigender Relaxin-2 Dosisierung bis zu einer Menge von 100 ng. Für 200 ng Relaxin-2 ist hingegen eine deutliche Abnahme zu verzeichnen, mit Annäherung an den Ausgangswert der Kontrolle. Die Stichprobengröße betrug jeweils N=8 bzw. N=7 für die höchste Relaxin-2-Dosierung.

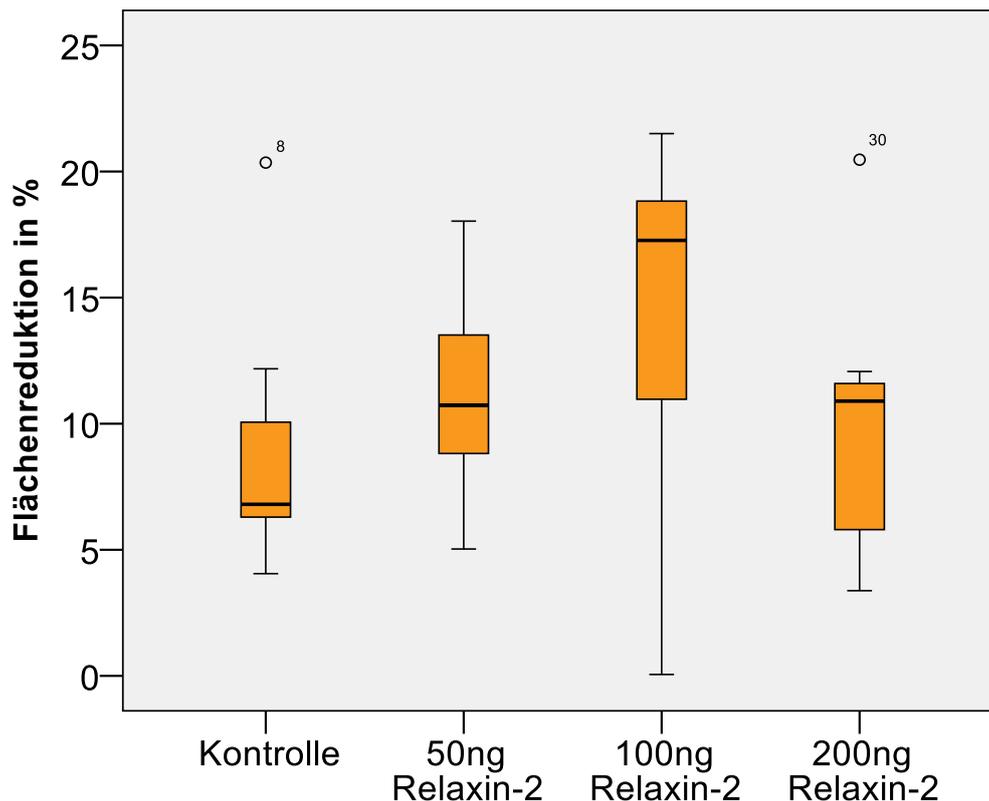


Abbildung 11: Boxplot zum Einfluss von Relaxin-2 auf die Migrationsfähigkeit der Zelllinie SBCL2

Tabelle 13: Ergebnisse Migrationsassay SBCL2

	Stichprobengröße N	Mittelwert
Kontrolle	8	8,84
50 ng	8	11,15
100 ng	8	14,46
200 ng	7	9,93

Die statistische Auswertung ergab trotz Zunahmen von 26,1% respektive 63,6% für keinen der Gruppenvergleiche einen statistisch signifikanten Unterschied. Außer den in Tabelle 14 gezeigten Vergleichen mit p-Werten von 0,337 und 0,793 ergaben alle anderen Vergleiche p-Werte von 1,000. Die Steigerung der Flächenreduktion von Kontrolle zu 100 ng Relaxin-2 weist nach Cohen mit $d=0,91$ eine große Effektstärke auf. Für die Abnahme der Flächenreduktion von 100 zu 200 ng Relaxin-2 besteht mit $d=0,70$ eine mittlere Effektstärke.

Tabelle 14: Auszug aus der statistischen Auswertung des Migrationsassays der Zelllinie SBCL2. Alle Werte nach Bonferroni korrigiert.

Gruppenvergleich	p-Wert	Standardisierte Differenz d	Effektstärke
Kontrolle vs. 100 ng	0,337	0,91	groß
100 ng vs. 200 ng	0,793	0,70	mittel

3.6.2 BLM

Die Untersuchung der Migrationsfähigkeit der BLM-Zelllinie erfolgte ebenfalls direkt und 24 Stunden nach Entfernung der Culture Inserts. In Abbildung 12 und Tabelle 15 sind eine leichte Abnahme von Kontrollplasmid zur Kontrolle, sowie eine deutlichere Abnahme für Klon 12 erkennbar. Für alle Gruppen lag die Stichprobengröße bei N=6.

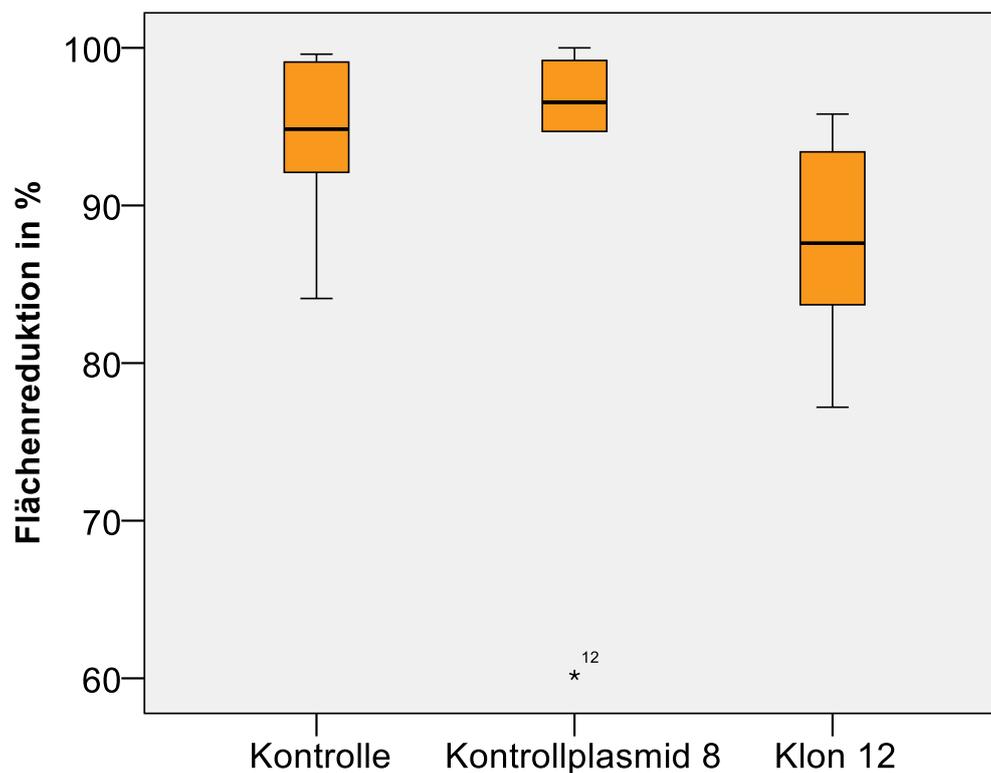


Abbildung 12: Boxplot zum Einfluss von Relaxin-2 auf die Migrationsfähigkeit der Zelllinie BLM

Tabelle 15: Ergebnisse Migrationsassay BLM

	Stichprobengröße N	Mittelwert
Kontrolle	6	94,1
Kontrollplasmid 8	6	91,2
Klon 12	6	87,6

Die in Tabelle 16 dargestellte statistische Auswertung ergab mit $p=1,000$ sowohl zwischen Kontrolle und Kontrollplasmid (3,1% Abnahme), als auch zwischen Kontrollplasmid 8 und Klon12 mit 3,9% Abnahme keinen statistisch signifikanten Unterschied. Der Gruppenvergleich von Kontrolle zu Klon 12 wies mit einer Abnahme von 6,9% und $p=0,870$ ebenfalls keine signifikante Verringerung der Flächenreduktion auf, allerdings zeigt sich hier mit $d=1,00$ eine große Effektstärke.

Tabelle 16: Statistische Auswertung des Migrationsassays der Zelllinie BLM. Alle Werte nach Bonferroni korrigiert.

Gruppenvergleich	p-Wert	Standardisierte Differenz d	Effektstärke
Kontrolle vs. Kontrollplasmid 8	1,000	0,27	klein
Kontrolle vs. Klon 12	0,870	1,00	groß
Kontrollplasmid 8 vs. Klon 12	1,000	0,32	klein

3.7 Adhäsionsassay

Mit dem Adhäsionsassay wird die Eigenschaft von Relaxin-2, die Spaltung von Kollagen anzuregen, überprüft. Durch die Spaltung der Kollagenbeschichtung in den Wells ist zu vermuten, dass Zellen, welche über Relaxin-2 verfügen, während der einstündigen Inkubation langsamer adhären, als Zellen ohne Relaxin-2. Der Versuch wurde für beide Zelllinien dreimal durchgeführt.

3.7.1 SBCL2

Wie in Abbildung 13 und Tabelle 17 zu sehen, besteht eine konzentrationsabhängige Abnahme der adhärennten Zellen mit steigender Zugabe von Relaxin-2. Die Größe der Stichproben lag zwischen N=22 und N=24.

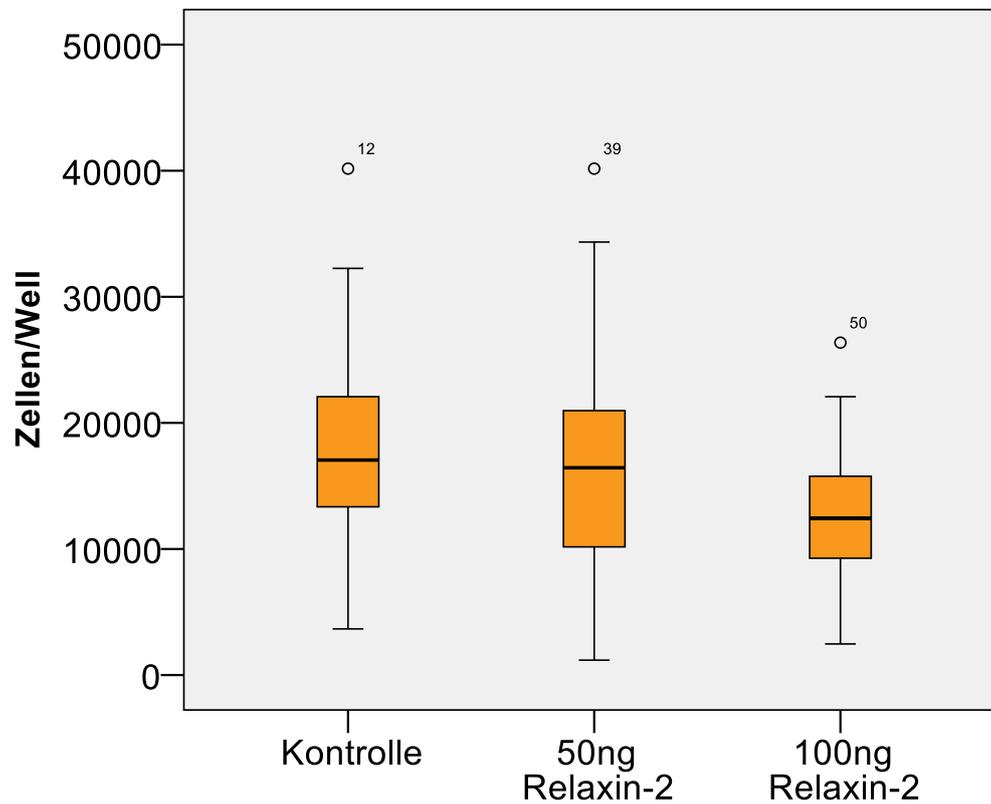


Abbildung 13: Boxplot zum Einfluss von Relaxin-2 auf die Kollagenspaltung/Adhäsion der Zelllinie SBCL2

Tabelle 17: Ergebnisse Adhäsionsassay SBCL2

	Stichprobengröße N	Mittelwert
Kontrolle	24	17.850
50 ng	23	15.872
100 ng	22	12.438

Mit $p=1,000$ und einer Abnahme um 11,1% ist das Ergebnis von Kontrolle zu 50 ng Relaxin-2 statistisch nicht signifikant. Ebenso zeigt sich im Gruppenvergleich von 50 ng zu 100 ng Relaxin-2 mit 21,6% Abnahme und $p=0,516$ kein statistisch signifikan-

ter Unterschied. Zwischen Kontrolle und 100 ng Relaxin-2 lässt sich jedoch mit $p=0,094$ eine Tendenz aufzeigen. Nach Cohen ergibt sich für diese Abnahme um 30,3% mit $d=0,74$ eine mittlere Effektstärke.

Tabelle 18: Statistische Auswertung des Adhäsionsassays der Zelllinie SBCL2. Alle Werte nach Bonferroni korrigiert.

Gruppenvergleich	p-Wert	Standardisierte Differenz <i>d</i>	Effektstärke
Kontrolle vs. 50 ng	1,000	0,22	klein
Kontrolle vs. 100 ng	0,094	0,74	mittel
50 ng vs. 100 ng	0,516	0,42	klein

3.7.2 BLM

Für BLM ergibt sich wie in Abbildung 14 und Tabelle 19 ersichtlich eine Abnahme der adhärennten Zellen bei Klon 12 im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen. Trotz vergleichbaren Mittelwerten weist das Kontrollplasmid eine deutlich größere Streubreite auf, als die Kontrollwerte. Die Stichprobengröße betrug $N=24$ bzw. $N=23$ für Klon 12.

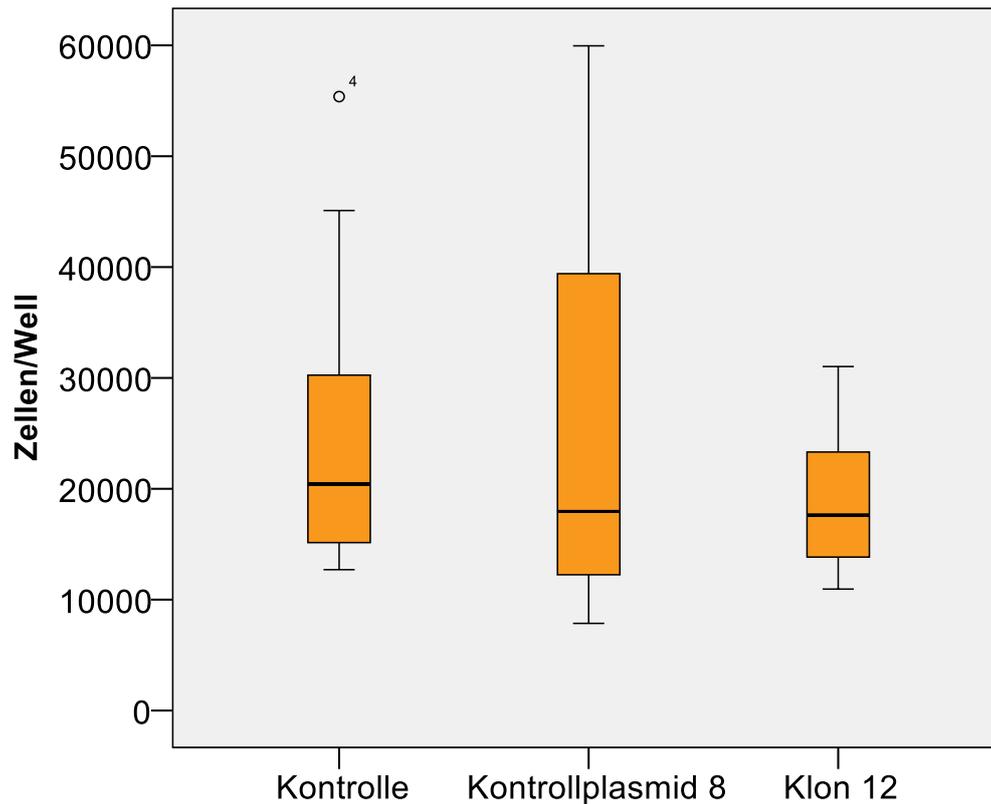


Abbildung 14: Boxplot zum Einfluss von Relaxin-2 auf die Kollagenspaltung/Adhäsion der Zelllinie BLM

Tabelle 19: Ergebnisse Adhäsionsassay BLM

	Stichprobengröße N	Mittelwert
Kontrolle	24	24.112
Kontrollplasmid 8	24	24.530
Klon 12	23	18.524

Die in Tabelle 20 dargestellte statistische Auswertung ergibt mit $p=1,000$ keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen Kontrolle und Kontrollplasmid. Mit einer Abnahme um 23,2% bzw. 24,5%, sowie $p=0,335$ und $p=0,263$ zeigen die Vergleiche von Klon 12 zu Kontrolle bzw. Kontrollplasmid ebenfalls keine statistische Signifikanz. Hier besteht jedoch mit einer standardisierten Differenz von $d=0,65$ und $d=0,54$ eine mittlere Effektstärke.

Tabelle 20: Statistische Auswertung des Adhäsionsassays der Zelllinie BLM. Alle Werte nach Bonferroni korrigiert.

Gruppenvergleich	p-Wert	Standardisierte Differenz <i>d</i>	Effektstärke
Kontrolle vs. Kontrollplasmid 8	1,000	0,03	keine
Kontrolle vs. Klon 12	0,335	0,65	mittel
Kontrollplasmid 8 vs. Klon 12	0,263	0,54	mittel

4 Diskussion

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit geht hervor, dass Relaxin-2 das Verhalten der Melanomzelllinien BLM und SBCL2 bezüglich Proliferation und teilweise Invasion beeinflusst, wobei sich Unterschiede zwischen den Zelllinien ergaben. Bereits in anderen Arbeiten wurde die Expression von Relaxin-2 in malignen Tumoren unterschiedlicher Organe wie z.B. Prostata [44], Schilddrüse [45] oder Brustgewebe [53] beschrieben.

4.1 Auswahl der Zelllinien

Die Auswahl der Zelllinien erfolgte wie bereits beschrieben aufgrund ihrer starken Relaxin-2-Expression im Western Blot für BLM und der schwachen Expression für SBCL2. Die BLM-Zelllinie ist eine Unterlinie der Zelllinie BRO, isoliert aus einer Lungenmetastase nach subkutaner Inokulation von BRO-Zellen [50]. Die Zelllinie BRO wurde aus einem humanen primären Melanom gewonnen [51]. SBCL2-Zellen folgen als „RGP-like cells“ ([52]) einem horizontalen Wachstumsmuster. Radiale Wachstumsphase (RGP, engl. radial growth phase) bedeutet ein größtenteils auf die Epidermis beschränktes Wachstum nach lateral ([54]). Somit ist bei SBCL2-Zellen, im Gegensatz zu BLM-Zellen, ein geringeres invasives Verhalten anzunehmen.

Da Relaxin-2 wie bei Feng et al. ([44]) beschrieben die Invasion, Proliferation und Adhäsion von Krebszellen beeinflusst, war anzunehmen, dass bei BLM-Zellen durch die Inhibition bzw. eine Verminderung der Expression des Hormons eine Reduktion der Proliferation, der Migration, sowie der Invasion zur Folge hat. Umgekehrt wurde bei der SBCL2-Zelllinie eine Zunahme dieser Parameter bei externer Zugabe von Relaxin-2 erwartet.

4.2 Immunhistochemische Färbungen

Die Färbung der unterschiedlichen melanozytären Gewebe erfolgte mit Antikörpern gegen Relaxin-2, sowie gegen die Rezeptoren RXFP1 und RXFP2. Die Durchführung erfolgte um Expression und intratumorale Lokalisation der Proteine zu untersuchen. Wie unter 4.6 ausgeführt, besitzt Relaxin-2 die Fähigkeit, MMPs zu aktivieren und so-

mit über den Abbau von extrazellulärer Matrix die Invasion maligner Zellen zu begünstigen.

Dies legte die Vermutung nahe, dass sich die Expression von Relaxin-2 vor allem auf den Randbereich der Melanome konzentrierte. Diese Hypothese wird durch Abbildung 5 bestärkt. Es zeigt sich eine starke rotbräunliche Färbung bevorzugt im Randbereich der untersuchten Melanome. Es ist anzunehmen, dass die enge räumliche Nähe von im Randbereich des Melanoms exprimierten Relaxin-2 und dem umliegenden gesunden Gewebe die Invasion des Tumors erleichtert.

Eine weitere Hypothese war die Veränderung der Expression von Relaxin-2, RXFP1 und RXFP2 in unterschiedlichen melanozytären Geweben. Hierbei ergab die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen von Naevi, Melanomen und Melanommetastasen signifikante Unterschiede für die Rezeptoren RXFP1 und RXFP2 bezüglich des Vergleichs von Naevi zu Melanommetastasen. Für Relaxin-2 ließ sich keine statistisch signifikante Zunahme feststellen.

Auch wenn die Zunahme der Färbungsintensität zwischen Melanomen und Melanommetastasen nicht signifikant ist, so lässt sich dennoch vermuten, dass die Zunahme systematisch ist. Die Ursache ist möglicherweise in der Art der untersuchten Melanome zu finden. Bei diesen handelt es sich zu einem großen Teil (ca.2/3) um superfiziell-spreitende Melanome. Superfiziell-spreitende Melanome können unterschiedliche Wachstumsmuster aufweisen. Wie bei Röcken et al. beschrieben, kann ein superfiziell spreitendes Melanom über Jahre einem horizontalen Wachstumsmuster folgen, bevor es schließlich in ein vertikales Wachstum übergeht [4]. Eine schwächere Färbung könnte somit mit einem wenig invasiveren, d.h. einem horizontalen Wachstum zusammenhängen. Für die ausgewerteten Melanome liegen bezüglich der Wachstumsphasen allerdings keine weiteren Informationen vor. Um dieser Vermutung nachzugehen, wäre eine Wiederholung dieses Versuches mit einer größeren Stichprobe sinnvoll.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich auch bei Marioni et al. [55]. Hier wurde die Relaxin-2 Expression in Plattenepithelkarzinomen des Schläfenbeins untersucht. Wenig differenzierte Tumorgebiete zeigten eine schwache oder teils auch keine Färbung für Relaxin-2. Deutlicher differenzierte Tumorgebiete wiesen eine diffuse Färbung für Re-

laxin-2 auf. Generell war die Färbungsintensität im Zytoplasma der Karzinomzellen höher als im umliegenden normalen Gewebe. Hier sind Parallelen zu den immunhistochemischen Färbungen von Naevi, Melanomen und Melanommetastasen zu erkennen. In beiden Fällen war die Färbung im normalen, gesunden Gewebe schwächer als im tumorösen Gewebe. Allerdings ist zu beachten, dass bei Marioni et al. die Färbungsintensität mit abnehmender Differenzierung des Tumors abnahm, wohingegen die Färbung von Melanom zur Melanommetastase zunahm, allerdings ohne statistische Signifikanz.

Interessante Ergebnisse zeigten sich auch in den immunhistochemischen Färbungen verschiedener Schilddrüsenkarzinomgewebe bei Hombach-Klonisch et al. Die unterschiedlichen Karzinomgewebe wiesen im Gegensatz zu karzinomfreien Geweben eine Färbung für Relaxin-2 auf. Für den Rezeptor LGR7 zeigte sich vom karzinomfreien Gewebe hin zu den karzinomhaltigen Geweben eine zunehmende Färbung [45]. Im Vergleich von gesundem zu malignem Gewebe scheint es folglich generell einen Unterschied in der Expression von Relaxin-2 zu geben.

4.3 Zellzahl

Dieser Versuch wurde durchgeführt, um den Einfluss von Relaxin-2 auf die Zellzahl zu ermitteln. Bei Bigazzi et al. wird eine mitogene Wirkung von Relaxin auf Brustkrebszellen genannt, es beeinflusst die Rekrutierung ruhender Zellen in den Zellzyklus [56]. Wie bei Feng, S., et al. [44] beschrieben, steigert Relaxin [1ng/ml] 48 h nach Behandlung die Proliferation von Prostatakrebszellen signifikant. Es gab Unterschiede in der Signifikanzstärke bezüglich der verschiedenen Relaxinkonzentrationen. Zudem wurde auch mithilfe von siRNA die Expression von Relaxin-2 kurzzeitig gehemmt, was eine leichte, jedoch signifikante Reduktion der Zellproliferation bewirkte [44]. Diese Effekte von Relaxin-2 auf die Zellproliferation wurden auch in dieser Arbeit untersucht. Es wurde bei externer Zugabe von Relaxin-2 eine Zunahme der Zellzahl, bei Inhibition der Expression jedoch eine Abnahme der Zellzahl erwartet.

Für die SBCL2-Zelllinie ließ sich dieser vermutete Effekt sehr gut nachweisen. Eine Steigerung der Proliferation ließ sich bereits bei der niedrigsten Relaxin-2-Dosis (10 ng/ml) beobachten. Im Vergleich zu oben genannter Arbeit ließ sich hierbei aller-

dings kein Unterschied zwischen den eingesetzten Konzentrationen feststellen. Des Weiteren hat sich die Anzahl der SBCL2-Zellen unter Relaxin-2 etwa verdoppelt, bei Feng et al. fällt die Zunahme jedoch geringer aus (20-60%). Ein interessanter Aspekt, der noch zu untersuchen bleibt, ist der direkte Vergleich der Relaxin-2 Rezeptoren RXFP1 und RXFP2 (bzw. LGR7 und LGR8) bei SBCL2 und den bei Feng et al. verwendeten Prostatakrebszelllinien. In Abbildung 6 ist für SBCL2 eine sehr starke Expression für RXFP1, sowie eine mittelstarke Expression für RXFP2 zu sehen. Diese starke Expression des Rezeptors könnte als eine Ursache für das starke Ansprechen der SBCL2-Zellen auf die Behandlung mit Relaxin-2 angesehen werden.

Die BLM-Zelllinie zeigte ebenfalls signifikante Ergebnisse bezüglich der Proliferation. Wie erwartet ist bei shRNA-Klon 12 eine signifikant niedrigere Zellzahl als bei Kontrolle und Kontrollplasmid zu sehen. Betrachtet man in Abbildung 6 die Western Blot-Bande für RXFP1, so ist zwar eine starke, im Vergleich zu SBCL2 jedoch schwächere Bande zu sehen. Für RXFP2 ist genau das Gegenteil zu beobachten. RXFP1 kann als der Hauptrezeptor für Relaxin angesehen werden, wobei auch RXFP2 durch Relaxin aktiviert werden kann [37]. Laut Cernaro et al. [57] bestand bisher allerdings kein Anhalt für eine physiologische Wirkung durch die Bindung von Relaxin-2 an RXFP2. Somit ist für diese Arbeit vor allem RXFP1 als Rezeptor für Relaxin interessant. Vergleicht man die Ergebnisse der Zelllinien SBCL2 und BLM, sowie die RXFP1-Banden im Western Blot, so lässt sich Folgendes feststellen: Eine starke Expression für RXFP1 geht mit einem starken Einfluss von Relaxin-2 auf die Proliferation einher.

Diese Ergebnisse bestätigen die in der Literatur genannte proliferationssteigernde Wirkung von Relaxin-2 auf Tumorzellen.

4.4 MUH-Assay

Mithilfe des MUH-Versuches sollte noch einmal der Einfluss von Relaxin-2 auf die Proliferation von BLM-Zellen untersucht werden. Fluorescein-Ester diffundieren leicht in die Zellen und werden durch Esterasen hydrolysiert wodurch es zur Produktion von Fluorescein kommt [58]. In diesem Versuch wurde hierfür als Substrat MUH (4-methylumbelliferyl heptanoat) [59] verwendet. Da es nur in lebenden Zellen zur Fluoreszenz kommen kann, spiegelt dieser Versuch die Zellproliferation deutlich wieder.

Für BLM ergaben sich signifikante Ergebnisse, es gab eine deutliche Proliferationsabnahme für den shRNA-Klon. Allerdings wies auch der Gruppenvergleich von Kontrolle zu Kontrollplasmid eine signifikante Reduktion der Proliferation auf, wenngleich diese, im Gegensatz zu den anderen Gruppenvergleichen, geringer war. Dies unterstützt die Vermutung, dass Relaxin-2 die Proliferation von Melanomzellen fördert und unterstützt somit die Befunde aus den Zellzahl Experimenten. Da die Proliferationsfähigkeit des Kontrollplasmides ebenfalls herabgesetzt wurde, ist eine Beeinflussung des Zellverhaltens durch das Kontrollplasmid nicht ausgeschlossen.

4.5 Migrationsassay

Relaxin-2 fördert die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) in renalen, kardialen und hepatischen Systemen [60]. Durch die Aktivierung des RXFP1-Rezeptors kommt es zum einen zu einer Akkumulation von cAMP und zum anderen zu einer Produktion von NO. Dies geschieht einerseits über PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase), andererseits über eine cAMP/PKA (Proteinkinase A)-vermittelte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells) [57]. Jadeski et al. [61] konnten zeigen, dass von Tumorzellen stammendes NO u.a. die Migration fördert.

Laut Bours et al. [62] kann NF- κ B eine wichtige Rolle in Entstehung von Krebs und Metastasen haben. Ein Zusammenhang von aberranter Aktivierung von NF- κ B und Brustkrebs wurde bei Sovak et al. [63] nachgewiesen.

Aufgrund der proliferations- und migrationssteigernden Wirkung von Relaxin-2, wurde für den Migrationsassay eine schnelle Reduktion der freien Fläche zwischen den beiden Zellrasen unter Einfluss von Relaxin-2 erwartet. Folglich wurde ohne Relaxin-2 eine verlangsamte Flächenreduktion vermutet. Für den Klon der Zelllinie BLM wurde dementsprechend eine langsamere, für die Zelllinie SBCL2 bei Zugabe von Relaxin-2 eine schnellere Flächenreduktion angenommen.

Die erzielten Ergebnisse können diese Annahme nicht bestätigen. Für SBCL2 zeigt sich eine nicht signifikante Zunahme der Migration unter Relaxin-2. Allerdings ist die Veränderung der Migrationsfähigkeit konzentrationsabhängig. Eine Abhängigkeit von der Relaxin-2-Konzentration wurde auch bei Bigazzi et al. [56] beschrieben. Dort wurde

jedoch nur die Proliferation der Brustkrebszelllinie MCF-7 untersucht. Hierbei zeigten sich eine Proliferationszunahme bei niedriger Konzentration und eine -abnahme bei hoher Konzentration. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Untersuchungsziele der beiden Arbeiten, kann die Annahme getroffen werden, dass die Konzentration von Relaxin-2 auch eine Rolle bei der Migration von SBCL2-Zellen spielt. Aufgrund der kleinen Stichproben bei den SBCL2-Zellen und der trotz fehlender statistischer Signifikanz dennoch vorhandenen teils großen Effektstärke, könnte bei Wiederholung des Versuches mit größeren Stichproben ein statistisch signifikantes Ergebnis erzielt werden. Hierbei wäre ebenfalls interessant, ob eine hohe Konzentration die Migration limitiert.

Ähnliche Ergebnisse finden sich bei Hombach-Klonisch et al. [45]. Dort wurde die Migration von Karzinomzellen der menschlichen Schilddrüse unter Einfluss von Relaxin-2 untersucht. Es wurde eine signifikante Steigerung der Migration unter Relaxin-2 beobachtet, sowohl für extern zugegebenes Relaxin-2, als auch für stabil transfizierte Zellen mit einer Überexpression von pro-Relaxin-2. Der Versuchsaufbau unterscheidet sich von dieser Arbeit, da die Schilddrüsenkarzinomzellen durch eine Elastinmatrix migrieren mussten. Es zeigte sich eine gesteigerte lytische Aktivität für Elastin der Schilddrüsenkarzinomzellen unter Relaxin-2.

Wie bei SBCL2 ergeben sich für BLM beim Migrationsassay keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Es zeigt sich eine nicht signifikante Abnahme der Migration für Klon 12. Aufgrund der kleinen Stichprobe und der teils großen Effektstärke könnte jedoch eine erneute Durchführung des Versuches mit größeren Stichproben zu einem signifikanten Ergebnis führen. Eine andere mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte, wie in Abbildung 7 zu sehen, die unvollständige Herunterregulierung der Genexpression sein, welche eventuell nicht ausreichend ist, um die Migration entscheidend zu beeinflussen. Es ist jedoch ein Hinweis, welcher Effekt bei einer starken Unterdrückung der Relaxin-2-Expression zu erwarten wäre. Eine Wiederholung der Transfektion würde hierüber Aufschluss bringen.

4.6 Adhäsionsassay

Relaxin-2 besitzt die Fähigkeit, die Invasion von malignen Brustkrebszellen *in vitro* zu fördern [64]. Ein wichtiger Aspekt für das invasive Wachstum von Tumorzellen ist die

Auflösung des umliegenden Gewebes. Hierfür sind die Matrixmetalloproteinasen (MMP) von großer Bedeutung, da sie die extrazelluläre Matrix abbauen, sowie ihre Gegenspieler (TIMP, engl. tissue inhibitors of MMP) [42]. Matrixmetalloproteinasen spielen eine Rolle bei der Metastasierung. Dies zeigten u.a. Schultz et al. [65] und Hua et al. [66] in in vivo Säugetiermodellen.

Binder et al zeigten, dass Brustkrebszelllinien nach Relaxinexposition (porcine relaxin) eine starke Hochregulation der Matrixmetalloproteinasen, besonders MMP-2, -9, -13 und -14, auf mRNA (engl. messenger RNA)-Ebene aufwiesen. Auf Proteinebene handelte es sich vor allem um MMP-2, -7 und -9. Zudem wurde gezeigt, dass Relaxin zu einer vermehrten Invasion der Zelllinien SK-BR3 und MCF-7 durch eine künstliche Basalmembran führte [64].

Mit dem Adhäsionsassay wurde überprüft, ob diese Eigenschaften von Relaxin-2 bezüglich Invasion und Hochregulation der MMP-Expression auch auf Melanomzelllinien zutreffen. Die Kollagenbeschichtung der 96-Well-Platte sollte das an das Melanom angrenzende Gewebe „darstellen“. Unter Relaxin-2-Einfluss sollte es folglich zu einem vermehrten Abbau des Kollagens durch die aktivierten Matrix-Metalloproteinasen kommen. Die Kollagenschicht bietet den Zellen eine gute Adhäsionsmöglichkeit, im Vergleich zur unbeschichteten 96-Well-Platte. Die Zellen ohne (bzw. mit wenig) Relaxin-2 sollten demnach an der Kollagenschicht anheften. Zellen mit Relaxin-2 sollten sich ebenfalls an der Kollagenschicht anheften, diese allerdings im Verlauf abbauen. Somit steht diesen Zellen keine oder nur eine verringerte Kollagenschicht zur Adhäsion zur Verfügung und die Zahl der angehefteten Zellen nimmt ab. Da die Zellen nur für eine Stunde auf der Kollagenschicht belassen wurden, konnten die nicht adhärenen Zellen zusammen mit dem Medium wieder abgenommen werden.

Dieser Versuch wurde in Anlehnung an den Zelladhäsionsassay von Feng et al [44] durchgeführt. Für SBCL2 zeigte sich eine Tendenz in die erwartete Richtung mit einer Abnahme der adhärenen Zellen bei steigender Relaxin-2-Konzentration. Dies lässt einen vermehrten Abbau der Kollagenschicht vermuten, da sonst eine vermehrte Adhäsion stattgefunden hätte. Es ist anzunehmen, dass Relaxin-2 auch bei der Melanomzelllinie SBCL2 die Expression von Matrixmetalloproteinasen hochreguliert. Bei Feng et al. [44] ergab sich diesbezüglich allerdings eine gegenteilige Wirkung von Relaxin. Die

Zelladhäsion der verwendeten Prostatakrebszellen wurde gesteigert. Dies widerspricht den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen bezüglich Relaxin-2 und dessen Wirkung auf die Adhäsion von Tumorzellen.

Für die hier gezeigten Ergebnisse spricht ein Versuch von Silvertown, Geddes und Summerlee [53]. Sie führten einen Migrationsversuch mit CF33.MT, einer vom Hund stammenden Brustkrebszelllinie, durch, mit Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von rekombinantem humanem H2 Präprorelaxin. Hierbei mussten die Zellen durch eine mit Laminin beschichtete poröse Membran einer Transwell-Kammer migrieren. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängige Steigerung der Migration, welche bei 250 ng/ml signifikant war. Als Grund hierfür vermuten Silvertown et al. eine Relaxin-induzierte Hochregulation der MMPs. Diese können die Laminin-Beschichtung, welche ein Bestandteil der Basallamina darstellt, abbauen und den Zellen so den Zugang zu den Poren in der Membran ermöglichen.

Zwar sind Laminin und das in dieser Arbeit verwendete Kollagen 1 nicht identisch, aber auch Kollagen 1 ist als fibrilläres Kollagen Teil des menschlichen Körpers, da es ein wichtiger Bestandteil der Dermis ist. Neben der Dermis ist es auch in Sehnen und Knochen vorhanden [67]. Kollagen 1 wird gespalten durch MMP-1 [68].

Relaxin verfügt über die Fähigkeit, die Synthese mancher Matrixmetalloproteinasen zu erhöhen. Dies wurde u.a. nachgewiesen von Unemori et al. [41] für MMP-1 bei humanen Fibroblasten, von Qin et al. [69] für MMP-3 (humanes Gewebe), sowie von Lenhart et al. [70] für MMP-2 und -9 in Schweinegewebe. Binder et al. [64] selbst konnten für Brustkrebszelllinien (MCF-7 und SK-BR3) auf mRNA-Ebene keine Beeinflussung der MMP-1 durch Relaxin nachweisen. Da es sich um unterschiedliche Zelllinien handelt, ist ein anderes Ergebnis für Melanomzelllinien jedoch nicht ausgeschlossen.

Bei SBCL2 wurde der Einfluss von Relaxin-2 auf MMP-1 zwar nicht getestet, jedoch lassen die Ergebnisse des Adhäsionsassays Rückschlüsse auf eine Beeinflussung der Expression von MMP-1 durch Relaxin-2 zu.

Für BLM ergaben sich nicht die erwarteten Resultate. Der sh-RNA-Klon wies zwar keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle auf, jedoch adhärierte er deutlich weni-

ger als die Kontrolle und zeigt somit ein gegensätzliches Verhalten, als zuvor angenommen. Eine eventuell zu schwache Herunterregulierung der Genexpression ist vermutlich nicht als Ursache anzusehen. In diesem Fall wäre der Unterschied wahrscheinlich nicht so deutlich gewesen. Der partielle Verlust von Relaxin-2 scheint bei BLM-Zellen zu einem vermehrten Abbau des umliegenden Gewebes zu führen, möglicherweise durch eine vermehrte Aktivierung oder Abnahme der Inhibition von MMP-1.

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des Peptidhormones Relaxin-2 in verschiedenen melanozytären Geweben, sowie dessen Einfluss auf Melanomzelllinien, untersucht. Neben der Auswertung immunhistochemischer Färbungen wurden für Versuche die Zelllinien BLM und SBCL2 aufgrund ihrer unterschiedlichen Relaxin-2 Expression ausgewählt. Während für BLM Klone mittels Transfektion eines sh-RNA-Plasmides generiert wurden mit dem Ziel, die Expression von Relaxin-2 zu inhibieren bzw. zu reduzieren, erfolgte für SBCL2 eine externe Zugabe von Relaxin-2.

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate (Naevi, Primärmelanoma, sowie Melanommetastasen) erbrachte eine statistisch signifikante Zunahme der Färbungsintensität für die beiden Relaxin-2 Rezeptoren RXFP1/LGR7 und RXFP2/LGR8, jedoch keine Signifikanz bezüglich Relaxin-2. Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen anderer Publikationen, wie beispielsweise Hombach-Klonisch et al. [45], so lassen sich Gemeinsamkeiten erkennen. Auch bei Schilddrüsenkarzinomgeweben wurde eine Zunahme der Färbungsintensität für LGR7 und Relaxin-2 vom normalen zum malignen Gewebe festgestellt. Die hiermit nachgewiesene vermehrte Anwesenheit von Relaxin-2 in malignen Geweben unterstützt die Annahme, dass Relaxin dort auch einen verstärkten Einfluss hat. Interessant wäre eine weitergehende Untersuchung, in wie weit sich das Vorkommen von Relaxin bei den unterschiedlichen Wachstumsphasen der Melanome verhält. Aufgrund des invasiveren Wachstums in der vertikalen Wachstumsphase [52], wäre in diesem Fall ein gesteigertes Vorkommen an Relaxin-2 anzunehmen.

Der bereits durch andere Publikationen nachgewiesene Zusammenhang zwischen Relaxin-2 und Steigerung der Proliferation maligner Zellen [44] konnte auch in dieser Arbeit bestätigt werden. Relaxin-2 hat einen statistisch signifikanten Einfluss auf die Proliferation der Melanomzelllinien, d.h. in Anwesenheit von Relaxin-2 ist eine höhere Proliferationsaktivität zu verzeichnen. Für beide Zelllinien zeigten sich statistisch signifikante Ergebnisse. Vor allem bei SBCL2 konnte unter Relaxin-2 mehr als eine Verdopplung der Zellzahl erreicht werden.

Der in der Literatur beschriebene Effekt von Relaxin-2 auf die Migration maligner Zellen [45] konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine statistisch nicht signifikante Zunahme der Migrationsfähigkeit der Melanomzellen unter Einfluss von Relaxin-2. Aufgrund der teils großen Effektstärke bei kleinen Stichproben könnte eine erneute Versuchsdurchführung mit größerer Probenanzahl aufschlussreichere Ergebnisse liefern.

In anderen Arbeiten wurde bereits nachgewiesen, dass eine Exposition mit Relaxin zu einer Hochregulierung von MMPs führt [64]. MMPs wiederum können die Extrazellulärmatrix abbauen [42].

Auch diese Eigenschaft von Relaxin wurde für Melanomzelllinien untersucht. Für SBCL2 zeigte sich hierfür keine statistische Signifikanz, jedoch eine Tendenz, dass die Zugabe von Relaxin-2 eine stärkere Kollagenspaltung mit konsekutiv geringerer Adhärenz der Zellen bewirkt. Die verminderte Expression von Relaxin-2 bewirkt bei BLM eine Abnahme der adhärenzierten Zellen, was einen Widerspruch zu den Ergebnissen der SBCL2-Zellen darstellt. Hier scheint der partielle Mangel an Relaxin-2 eine vermehrte Spaltung des Kollagens zu verursachen, allerdings bleibt unklar, ob dies aus einer vermehrten Aktivierung oder verminderten Inhibition von MMP-1 hervorgeht. Auch wenn die Ergebnisse der in dieser Arbeit untersuchten Melanomzelllinien differieren, so ist trotzdem eine Auswirkung auf die kollagenolytische Fähigkeit in Abhängigkeit der Relaxin-2-Menge zu verzeichnen, wenngleich keine statistische Signifikanz vorliegt. Um genauere Aussagen über den Einfluss von Relaxin-2 auf die Expression von Matrixmetalloproteinasen in melanozytärem Gewebe treffen zu können, wäre eine Erweiterung der Versuche auf weitere Melanomzelllinien sowie weitere Bestandteile der Extrazellulärmatrix sinnvoll.

Ebenfalls in Betracht gezogen werden muss die Tatsache, dass in dieser Arbeit nur zwei verschiedene Melanomzelllinien untersucht wurden. Zur weiteren Festigung der hier gewonnenen Erkenntnisse wäre die Versuchswiederholung mit anderen Melanomzelllinien wie beispielsweise MEWO oder B16F1 dienlich. Die teils unzureichenden, statistisch nicht signifikanten Ergebnisse der transfizierten BLM-Zellen könnten wie bereits oben beschrieben ihre Ursache in einer nicht suffizienten Herunterregulation der Relaxinexpression haben. Daher ist eine erneute Transfektion zur weiteren Abklärung

empfohlen. Auch eine erneute Transfektion des Kontrollplasmides wäre interessant, da im MUH-Assay ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Kontrollplasmid erkennbar ist und somit ein Einfluss der Kontroll-Transfektion nicht ausgeschlossen werden kann.

Ein interessanter Ausblick für die Zukunft wäre die Untersuchung der Relaxin-2-Konzentrationen in Seren von Melanompatienten. Binder et al. [71] haben die Seren von Brustkrebspatientinnen auf Relaxin untersucht und gezeigt, dass diese einen höheren Relaxin-Spiegel aufweisen, als die Kontrollgruppe. Des Weiteren zeigte sich bei metastasierten eine höhere Relaxin-Konzentration als bei nicht metastasierten Patienten. Sollten sich diese Ergebnisse auch bei Melanompatienten nachweisen lassen, so könnte erforscht werden, ob die Bestimmung von Relaxin-2 im Serum als Teil der Nachsorgeuntersuchung sinnvoll ist und eventuell ein Marker für ein Melanomrezidiv sein könnte.

6 Literaturverzeichnis

1. DeSantis, C., et al., *Breast cancer statistics, 2013*. CA Cancer J Clin, 2014. **64**(1): p. 52-62.
2. Siegel, R.L., et al., *Colorectal cancer statistics, 2017*. CA Cancer J Clin, 2017. **67**(3): p. 177-193.
3. McNeal, A.S., et al., *CDKN2B Loss Promotes Progression from Benign Melanocytic Nevus to Melanoma*. Cancer Discov, 2015. **5**(10): p. 1072-85.
4. Röcken, M., et al., *Taschenatlas Dermatologie*. 2010, Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG.
5. Buettner, P.G., et al. *Development of prognostic factors and survival in cutaneous melanoma over 25 years An analysis of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society*, Cancer Volume 103, Issue 3. Cancer, 2005. **103**, 616-624.
6. Held, L., et al., *Oncogenetics of melanoma: basis for molecular diagnostics and therapy*. J Dtsch Dermatol Ges, 2011. **9**(7): p. 510-6.
7. Garbe, C. and U. Leiter, *Melanoma epidemiology and trends*. Clin Dermatol, 2009. **27**(1): p. 3-9.
8. Forschner, A., et al., *Improvement of overall survival in stage IV melanoma patients during 2011-2014: analysis of real-world data in 441 patients of the German Central Malignant Melanoma Registry (CMMR)*. J Cancer Res Clin Oncol, 2017. **143**(3): p. 533-540.
9. Dr. Peter Kaatsch, D.C.S., Prof. Alexander Katalinic, Dr. Stefan Hentschel, Nadia Baras, Dr. Benjamin Barnes, Dr. Joachim Bertz, Dr. Stefan Dahm, Dr. Jörg Haberland, Dr. Klaus Kraywinkel, Antje Laudi, Dr. Ute Wolf *Cancer in Germany 2007/2008*. 2012, Berlin: Robert Koch Institut.
10. Balch, C.M., et al., *Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification*. J Clin Oncol, 2009. **27**(36): p. 6199-206.
11. Eigentler, T.K. and C. Garbe, *Malignant melanoma: classification and staging of malignant melanoma*. Front Radiat Ther Oncol, 2006. **39**: p. 149-58.
12. Leiter, U., et al., *Complete lymph node dissection versus no dissection in patients with sentinel lymph node biopsy positive melanoma (DeCOG-SLT): a multicentre, randomised, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2016. **17**(6): p. 757-767.
13. Testori, A., et al., *Surgery and radiotherapy in the treatment of cutaneous melanoma*. Ann Oncol, 2009. **20 Suppl 6**: p. vi22-9.
14. Forschner, A., et al., *The role of radiotherapy in the overall treatment of melanoma*. Clin Dermatol, 2013. **31**(3): p. 282-9.
15. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
16. Omholt, K., et al., *NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(17): p. 6483-8.
17. Larkin, J., et al., *Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma*. N Engl J Med, 2014. **371**(20): p. 1867-76.
18. Long, G.V., et al., *Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma*. N Engl J Med, 2014. **371**(20): p. 1877-88.

19. Robert, C. and F. Ghiringhelli, *What is the role of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma?* *Oncologist*, 2009. **14**(8): p. 848-61.
20. Robert, C., et al., *Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma*. *N Engl J Med*, 2011. **364**(26): p. 2517-26.
21. Robert, C., et al., *Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation*. *N Engl J Med*, 2015. **372**(4): p. 320-30.
22. Hisaw, F.L., *Experimental relaxation of the pubic ligament of the guinea pig*. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 1926. **23**(8): p. 661-663.
23. Fevold, H.L., F.L. Hisaw, and R.K. Meyer, *The Relaxative Hormone of the Corpus Luteum. Its Purification and Concentration*. *J. Am. Chem. Soc.*, 1930. **52**(8): p. 3340-3348.
24. Sethi, A., et al., *The complex binding mode of the peptide hormone H2 relaxin to its receptor RXFP1*. *Nat Commun*, 2016. **7**: p. 11344.
25. Sherwood, O.D., *Relaxin's physiological roles and other diverse actions*. *Endocr Rev*, 2004. **25**(2): p. 205-34.
26. Bathgate, R.A., et al., *Human relaxin gene 3 (H3) and the equivalent mouse relaxin (M3) gene. Novel members of the relaxin peptide family*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(2): p. 1148-57.
27. Blundell, T.L. and R.E. Humbel, *Hormone families: pancreatic hormones and homologous growth factors*. *Nature*, 1980. **287**(5785): p. 781-7.
28. Adham, I.M., et al., *Cloning of a cDNA for a novel insulin-like peptide of the testicular Leydig cells*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(35): p. 26668-72.
29. Chassin, D., et al., *Cloning of a new member of the insulin gene superfamily (INSL4) expressed in human placenta*. *Genomics*, 1995. **29**(2): p. 465-70.
30. Conklin, D., et al., *Identification of INSL5, a new member of the insulin superfamily*. *Genomics*, 1999. **60**(1): p. 50-6.
31. Lok, S., et al., *Identification of INSL6, a new member of the insulin family that is expressed in the testis of the human and rat*. *Biol Reprod*, 2000. **62**(6): p. 1593-9.
32. Schwabe, C. and J.K. McDonald, *Relaxin: a disulfide homolog of insulin*. *Science*, 1977. **197**(4306): p. 914-5.
33. Hudson, P., et al., *Structure of a genomic clone encoding biologically active human relaxin*. *Nature*, 1983. **301**(5901): p. 628-31.
34. Hudson, P., et al., *Relaxin gene expression in human ovaries and the predicted structure of a human preprorelaxin by analysis of cDNA clones*. *EMBO J*, 1984. **3**(10): p. 2333-9.
35. Crawford, R.J., et al., *Two human relaxin genes are on chromosome 9*. *EMBO J*, 1984. **3**(10): p. 2341-5.
36. Gunnarsen, J.M., et al., *Expression of human relaxin genes: characterization of a novel alternatively-spliced human relaxin mRNA species*. *Mol Cell Endocrinol*, 1996. **118**(1-2): p. 85-94.
37. Bathgate, R.A., et al., *International Union of Pharmacology LVII: recommendations for the nomenclature of receptors for relaxin family peptides*. *Pharmacol Rev*, 2006. **58**(1): p. 7-31.
38. Hsu, S.Y., et al., *Activation of orphan receptors by the hormone relaxin*. *Science*, 2002. **295**(5555): p. 671-4.

39. Downing, S.J. and O.D. Sherwood, *The physiological role of relaxin in the pregnant rat. I. The influence of relaxin on parturition*. Endocrinology, 1985. **116**(3): p. 1200-5.
40. Downing, S.J. and O.D. Sherwood, *The physiological role of relaxin in the pregnant rat. III. The influence of relaxin on cervical extensibility*. Endocrinology, 1985. **116**(3): p. 1215-20.
41. Unemori, E.N., et al., *Relaxin induces an extracellular matrix-degrading phenotype in human lung fibroblasts in vitro and inhibits lung fibrosis in a murine model in vivo*. J Clin Invest, 1996. **98**(12): p. 2739-45.
42. Vu, T.H. and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology*. Genes Dev, 2000. **14**(17): p. 2123-33.
43. Unemori, E.N. and E.P. Amento, *Relaxin modulates synthesis and secretion of procollagenase and collagen by human dermal fibroblasts*. J Biol Chem, 1990. **265**(18): p. 10681-5.
44. Feng, S., et al., *Relaxin promotes prostate cancer progression*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(6): p. 1695-702.
45. Hombach-Klonisch, S., et al., *Relaxin enhances the oncogenic potential of human thyroid carcinoma cells*. Am J Pathol, 2006. **169**(2): p. 617-32.
46. Adams, J., et al., *A novel role for relaxin-2 in the pathogenesis of primary varicosis*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e39021.
47. Santa Cruz Biotechnology, I., *shRNA Transfection Protocol*. 2016.
48. life technologies, *iBlot Dry Blotting System*, l. technologies, Editor. 2011: Carlsbad, CA, USA.
49. Grosse, P., et al. *Novel expression of relaxin-2 and its receptors in melanocytic tissues and their role for melanoma cell invasion*. in *41. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung e.V.* 2014. Köln.
50. Van Muijen, G.N., et al., *Antigen expression of metastasizing and non-metastasizing human melanoma cells xenografted into nude mice*. Clin Exp Metastasis, 1991. **9**(3): p. 259-72.
51. Lockshin, A., et al., *Exceptional lethality for nude mice of cells derived from a primary human melanoma*. Cancer Res, 1985. **45**(1): p. 345-50.
52. Meier, F., et al., *Human melanoma progression in skin reconstructs : biological significance of bFGF*. Am J Pathol, 2000. **156**(1): p. 193-200.
53. Silvertown, J.D., B.J. Geddes, and A.J.S. Summerlee, *Adenovirus-Mediated Expression of Human Prorelaxin Promotes the Invasive Potential of Canine Mammary Cancer Cells*. Endocrinology, 2003. **144**(8): p. 3683-3691.
54. Chin, L., *The genetics of malignant melanoma: lessons from mouse and man*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(8): p. 559-70.
55. Marioni, G., et al., *Relaxin-2 expression in temporal bone carcinoma*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2015. **272**(11): p. 3225-32.
56. Bigazzi, M., et al., *Relaxin influences the growth of MCF-7 breast cancer cells. Mitogenic and antimitogenic action depends on peptide concentration*. Cancer, 1992. **70**(3): p. 639-43.
57. Cernaro, V., et al. *Relaxin New Pathophysiological Aspects and Pharmacological Perspectives for an Old Protein, Medicinal Research Reviews Volume 34, Issue 1*. Medicinal Research Reviews, 2014. **34**, 77-105.

58. Rotman, B. and B.W. Papermaster, *Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1966. **55**(1): p. 134-41.
59. Sigma-Aldrich. 4-Methylumbelliferyl heptanoate. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/2/m2514pis.pdf. Accessed 25.02.2018.
60. Nair, V.B., et al., *Human relaxin-2: historical perspectives and role in cancer biology*. Amino Acids, 2012. **43**(3): p. 1131-40.
61. Jadeski, L.C., et al., *Nitric oxide promotes murine mammary tumour growth and metastasis by stimulating tumour cell migration, invasiveness and angiogenesis*. Int J Cancer, 2000. **86**(1): p. 30-9.
62. Bours, V., et al., *The NF-kappa B transcription factor and cancer: high expression of NF-kappa B- and I kappa B-related proteins in tumor cell lines*. Biochem Pharmacol, 1994. **47**(1): p. 145-9.
63. Sovak, M.A., et al., *Aberrant nuclear factor-kappaB/Rel expression and the pathogenesis of breast cancer*. J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 2952-60.
64. Binder, C., et al., *Relaxin enhances in-vitro invasiveness of breast cancer cell lines by up-regulation of matrix metalloproteinases*. Mol Hum Reprod, 2002. **8**(9): p. 789-96.
65. Schultz, R.M., et al., *Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases of human amnion invasion and lung colonization by murine B16-F10 melanoma cells*. Cancer Res, 1988. **48**(19): p. 5539-45.
66. Hua, J. and R.J. Muschel, *Inhibition of matrix metalloproteinase 9 expression by a ribozyme blocks metastasis in a rat sarcoma model system*. Cancer Res, 1996. **56**(22): p. 5279-84.
67. Fang, M., et al., *Type I collagen D-spacing in fibril bundles of dermis, tendon, and bone: bridging between nano- and micro-level tissue hierarchy*. ACS Nano, 2012. **6**(11): p. 9503-14.
68. NCBI. MMP1 matrix metalloproteinase 1 [Homo sapiens (human)]. 2015; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4312>. Accessed 11.10.2015, 12:25h.
69. Qin, X., et al., *An autocrine/paracrine role of human decidual relaxin. II. Stromelysin-1 (MMP-3) and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1)*. Biol Reprod, 1997. **56**(4): p. 812-20.
70. Lenhart, J.A., et al., *Relaxin increases secretion of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 during uterine and cervical growth and remodeling in the pig*. Endocrinology, 2001. **142**(9): p. 3941-9.
71. Binder, C., et al., *Elevated concentrations of serum relaxin are associated with metastatic disease in breast cancer patients*. Breast Cancer Research and Treatment, 2004. **87**(2): p. 157-166.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Universitäts-Hautklinik Tübingen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. Claus Garbe durchgeführt. Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn PD Dr. med Christian Busch in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Seema Noor.

Die Versuche wurden (nach Einarbeitung durch Frau Eve Holtorf) von mir mit Unterstützung durch Frau Eve Holtorf, Frau Dr. Seema Noor und Herrn PD Dr. med. Christian Busch durchgeführt.

Die immunhistochemisch gefärbten Präparate wurden von Herrn PD Dr. med. Christian Busch zur Verfügung gestellt.

Die Puromycin-Vorversuche erfolgten durch Frau Eve Holtorf, ebenso ein Teil der Western Blots.

Die Erstellung von Abbildung 7 erfolgte nach gemeinsamer Auswahl durch Herrn PD Dr. med. Christian Busch.

Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den

8 Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. med Claus Garbe, der mir diese Dissertation ermöglicht hat.

Des Weiteren möchte ich Herrn PD Dr. med. Christian Busch für die Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Seema Noor, die mich all die Zeit in allen Fragen unterstützt hat und immer ein offenes Ohr für mich hatte.

Vielen Dank auch meinem Mann und meinen Eltern, die mir stets zur Seite standen. Ohne deren Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.