

Aus dem Department für Biomedizinische Wissenschaften
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Medizinische Biochemie

(Leiter: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Florian Grebien)

**Abhängigkeit der Vitalität von Melanomzellen von der Aktivität
der Hämoxygenase**

Diplomarbeit

Veterinärmedizinische Universität

vorgelegt von

Bianca Kern

Wien, im Oktober 2023

Betreuer*in: Dipl.-Biol. Dr. rer. nat. J. Catharina Duvigneau

Institut für Medizinische Biochemie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Dr. rer. nat. Torben Redmer

Medizinische Universität Wien

Begutachter: Ao. Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Lars Gille

Institut für Pharmakologie und Toxikologie

Veterinärmedizinische Universität Wien

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorgelegte Diplomarbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die erwähnten Hilfsmittel und Literaturstellen einbezogen wurden. Ich habe die entscheidenden Arbeiten selbst durchgeführt, und alle zuarbeitend Tätigen mit ihrem Beitrag zur Arbeit angeführt. Die Arbeit wurde nicht an anderer Stelle eingereicht oder veröffentlicht.

Wien, Oktober 2023

Bianca Kern

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während des Studiums unterstützt und begleitet haben.

Vor allem meiner Betreuerin Dipl.-Biol. Dr. rer. nat. J. Catharina Duvigneau und meinem Betreuer Dr. rer. nat. Torben Redmer möchte ich besonders meinen Dank aussprechen. Mit großem Engagement haben sie mich unterstützt und geleitet. Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Andrea Müllebner und Anna Vidal, MSc, die freundlicherweise die Kultivierung und Vorbereitung der Zellen übernommen haben. Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Freund und meinem Freundeskreis, die mir immer mit einem guten Rat zur Seite standen. Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Familie bedanken, die immer an mich geglaubt haben.

Zusammenfassung

Der schwarze Hautkrebs (Melanom) zählt zu den gefährlichsten Krebsformen beim Menschen. Die Hälfte der Patient*innen zeigen eine Mutation am Codon 600 der Serin/Threonin Kinase B-RAF (BRAF^{V600}), welche u.a. für die Regulation der Zellteilung zuständig ist. Durch die Therapie mit einem BRAF-Kinase-Inhibitor, wie z.B. Dabrafenib, kann ein fortschreitendes Wachstum unterbunden werden, jedoch kommt es bei vielen Fällen innerhalb eines Jahres zu Rezidiven, welche gegen den Inhibitor resistent sind. Um die Resistenzentwicklung zu unterdrücken, müssten bei einer initialen Behandlung möglichst viele Tumorzellen beseitigt werden. Daher wird eine Kombinations-Therapie eines BRAF-Kinase-Inhibitors mit Wirkstoffen, welche andere Signalwege beeinflussen, vorgeschlagen. Ein vielversprechender Ansatz ist die Einleitung der Ferroptose, einer Eisen-abhängigen Form des programmierten Zelltods. Da resistente Melanome oft erhöhte Spiegel der induzierbaren Form der Hämoxxygenase (HO-1) zeigen, welche Häm unter Eisen-Freisetzung abbaut, war das Ziel dieser Arbeit, herauszufinden, ob die HO-1 Induktion zur gezielten Eliminierung von Melanomzellen durch Ferroptose in Kombination mit Dabrafenib genutzt werden kann. Bereits bekannte Melanomzelllinien wurden zunächst allein mit dem Ferroptose-Induktor RAS-selective lethal 3 oder einem Endoperoxid Artemisinin zur Ermittlung der wirksamen Konzentration (mittlere inhibitorischen Konzentration, IC₅₀) auf die Zelldichte (IncuCyte[®]) behandelt. Dabei dienten Hämin, ein HO-Induktor, Zink-Protoporphyrin, ein HO-Hemmer, der Eisenchelator Deferoxamin und die externe Eisenquelle Eisen-Ammoniumcitrat als Kontrollsubstanzen. Nach der Inkubation wurde das Endprodukt des Hämabbaus, Bilirubin, aus dem Zellkulturüberstand extrahiert und quantifiziert. Als Maß für die HO-Aktivität wurde die erhaltene Bilirubin-Menge auf die zugrundeliegende Zelldichte normalisiert. Die wirksamen Konzentrationen wurden dann in Kombinationsversuchen mit Dabrafenib getestet. Unsere Daten zeigen, dass die Kombination von Dabrafenib mit RAS-selective lethal 3 zu einer höheren Zellreduktion führt, als durch die Einzelsubstanzen allein. Möglicherweise wurde also das Eisen aus der HO-Aktivität für die Induktion der Ferroptose genutzt. Jedoch wurden keine synergistischen Effekte erzielt und einige Zellen überlebten die Behandlung. Daher sind weitere Versuche mit anderen Wirkstoffen bzw. Kombinationen notwendig, um die Zellteilung nachhaltiger zu reduzieren, ohne zu einer Resistenzentwicklung beizutragen.

Abstract

Black skin cancer (melanoma) is one of the most dangerous forms of cancer in humans. Half of the patients show a mutation at codon 600 of the serine/threonine kinase B-RAF (BRAF^{V600}), which is responsible for the regulation of cell division. The therapy with a BRAF kinase inhibitor, such as dabrafenib, can prevent progressive growth, but many cases develop recurrences within a year, which are resistant to the inhibitor. In order to suppress the development of resistance, most cancer cells should be eliminated in an initial treatment. Therefore, a combination therapy of a BRAF kinase inhibitor with agents that influence other signaling pathways is proposed. One approach is the induction of ferroptosis, an iron-dependent form of programmed cell death. Resistant melanomas often show elevated levels of the inducible form of haem oxygenase (HO-1), which degrades haem with iron release, so the aim of this work was to find out if HO-1 induction can be used to eliminate melanoma cells by ferroptosis in combination with dabrafenib. Known melanoma cell lines were first treated alone with the ferroptosis inductor RAS-selective lethal 3 or the endoperoxide artemisinin to determine the effective concentration (mean inhibitory concentration, IC₅₀) on cell density (IncuCyte[®]). Haemin, an HO inducer, zinc protoporphyrin, an HO inhibitor, the iron chelator deferoxamine and the external iron source iron ammonium citrate are used as control substances. After incubation, the end product of haem degradation, bilirubin, was extracted from the cell culture supernatant and quantified. To represent the HO activity, the amount of bilirubin was normalised to the cell density. Then the effective concentrations were tested in combination with dabrafenib. Our data show that the combination of dabrafenib with RAS-selective lethal 3 leads to a higher cell reduction than by the single substances. It is possible that the iron from the HO activity was used for the induction of ferroptosis. However, no synergistic effects were obtained with the combination and some cells survived the treatment. Therefore, further trials with other agents or combinations are necessary to reduce cell division more sustainably without contributing to the development of resistance.

Abkürzungsverzeichnis

A	Artemisinin
AFC	Eisen-Ammoniumcitrat
BMC	brain metastasis derived cells
BR	Bilirubin
BRAFi	BRAF-Inhibitor
BV	Biliverdin
CO	Kohlenmonoxid
D	Dabrafenib
DFO	Deferoxamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
Fe²⁺	zweiwertiges Eisen
FSP1	Ferroptose-Suppressorprotein 1
GPX4	Glutathionperoxidase 4
H	Hämin
HO	Hämoxygenase
IC₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
OD	optische Dichte

ROS	reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species)
RSL3	RAS-selective lethal 3
ZKÜ	Zellkulturüberstand
ZnPP	Zink-Protoporphyrin
ZZÄ	Zellzahläquivalente

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung und Fragestellung	1
1.1 Das Melanom	1
1.2 Melanomzelllinien aus experimentellen <i>in vitro</i> Studien	1
1.3 Die Hämoxygenase	2
1.4 Ferroptose	3
1.5 Ferroptose in Krebszellen	4
1.6 Fragestellung	4
1.7 Herangehensweise.....	5
1.7.1 Dabrafenib, BRAF-Inhibitor	5
1.7.2 Hämin, HO-Substrat.....	6
1.7.3 Zink-Protoporphyrin, HO-Hemmer	6
1.7.4 Deferoxamin, Eisenchelator	6
1.7.5 Eisen-Ammoniumcitrat, externe Eisenquelle.....	7
1.7.6 RAS-selective lethal 3, Ferroptose-Induktor.....	7
1.7.7 Artemisinin, möglicher Ferroptose-Induktor	7
1.8 Hypothesen	7
2. Material und Methoden	9
2.1 Zelllinien	10
2.2 Zellkultivierung.....	10
2.3 Herstellung der Inkubationsmedien	11
2.4 Inkubation	12
2.5 Bestimmung der Zellteilungsraten.....	12
2.5.1 Bestimmung der Zellkonfluenz.....	13
2.5.2 Einfluss der Wirkstoffe auf die Zellteilungsrate (Dosis-Wirkungs-Beziehung)....	14
2.6 Ernte des Zellkulturmediums.....	15
2.7 Bestimmung der Zellzahläquivalente am Ende der Inkubation (Kristallviolett-Färbung).....	15

2.8	Bestimmung der <i>in situ</i> -HO-Aktivität	16
2.8.1	Extraktion des Bilirubins im Zellkulturüberstand.....	16
2.8.2	Ermittlung der Bilirubin-spezifischen Extinktion.....	17
2.8.3	Bestimmung der <i>in situ</i> HO-Aktivität unter Berücksichtigung der Konfluenzwerte.	17
2.9	Datenverarbeitung und Visualisierung	18
3.	Ergebnisse	19
3.1	Korrelation von Zellzahläquivalenten und Konfluenz.....	19
3.2	Dosis-Wirkungs-Beziehungen der eisenmodulierenden Substanzen.....	20
3.3	HO-Aktivitäten der eisenmodulierenden Substanzen.....	22
3.4	Effekt von Dabrafenib auf die Zelldichte und die <i>in situ</i> HO-Aktivität	24
3.5	Vergleich des Effekts der Eisen-Spiegel modulierenden Substanzen in Kombination mit Dabrafenib auf die Zelldichte	25
3.6	HO-Aktivitäten der eisenmodulierenden-Substanzen in Kombination mit Dabrafenib	27
4.	Diskussion	30
4.1	Zellzahlnormalisierung der <i>in situ</i> HO-Aktivität.....	30
4.2	IC ₅₀ -Werte der Eisenmodulatoren.....	31
4.3	Bedeutung der HO-Aktivität für die Melanomzellen	31
4.4	Effekte des BRAFi Dabrafenib auf die HO-Aktivität.....	32
4.5	Ferroptose-Induktoren.....	33
4.6	Kombinationsversuch	36
4.7	Ausblick und Conclusio.....	36
5.	Literaturverzeichnis.....	38
6.	Abbildungsverzeichnis	42

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Das Melanom

Das kutane Melanom (schwarze Hautkrebs) ist einer der aggressivsten und zugleich gefährlichsten Krebsformen beim Menschen. Der Tumor, welcher durch Mutationen in den Melanozyten entsteht, zeigt eine hohe Metastasierungsrate. Dabei können u.a. Lunge, Gehirn und Leber betroffen sein. Die Sterblichkeitsrate liegt bei zirka 75 %, dabei beträgt die mittlere Überlebenszeit ohne Therapieversuch acht Monate (1). Neben der klassischen Therapie (chirurgische Entfernung, Bestrahlung) ergibt sich bei 50 % der Patient*innen eine gezielte Behandlungsmöglichkeit. Die Hälfte der Fälle zeigen eine Punktmutation am Codon 600 der Serin/Threonin Kinase B-RAF (BRAF^{V600}), welche für die Regulation der Wachstumsprozesse zuständig ist (MAP-Kinase Signalweg). Durch die Mutation umgehen die Tumorzellen die Apoptose und sind auch vor dem Immunsystem geschützt (2). Dies führte zur Entwicklung der BRAF-Inhibitoren (BRAFi), wie z.B. Dabrafenib (D) und Vemurafenib. Diese Behandlungsmöglichkeit erhöhte die Überlebensrate, jedoch kommt es häufig zu Rezidiven, welche eine hohe Therapieresistenz gegenüber BRAFi zeigen. Das Melanom ist somit im späteren Stadium oft unheilbar, daher liegt der Schwerpunkt der aktuellen Forschung an der Identifikation der beteiligten Resistenzmechanismen (3). Zu diesem Ziel wurden Analysen mit Zelllinien, welche aus Tumorzellen abgeleitet wurden, herangezogen.

1.2 Melanomzelllinien aus experimentellen *in vitro* Studien

Um die Tumor- bzw. Resistenzentwicklung und deren molekularen Hintergrund zu erforschen, bieten sich besonders Zelllinien an, welche aus unterschiedlichen Gehirntumoren abgeleitet wurden. In einer Studie wurden BMC1-M1 und BMC1-M4 Zellen (brain metastasis derived cells) eingesetzt, welche von Melanommetastasen in unterschiedlichen Stadien aus dem Gehirn von Patient*innen in den Jahren 2018 und 2020 entfernt und abgeleitet wurden (BMC-Zellen). BMC1-M1 Zellen sind aus einer Melanom-Hirnmetastase etabliert, die keine BRAFi Therapie erhalten hatte, hingegen BMC1-M4 wurden aus einer Hirnmetastase etabliert, die unter BRAFi Therapie entstanden ist. Diese Zellen stammen daher aus einem bereits resistenten Subklon des Melanoms (4). Da zwischen der Etablierung beider Zelllinien ein Zeitraum von etwa zwei Jahren liegt, sind sie zur Beurteilung einer neuen möglichen Therapieform bzw. zur

Untersuchung zum Überwinden der Resistenz besonders geeignet. Es wird vermutet, dass bei der Entstehung der Resistenz die Hämoxigenase (HO) eine Rolle spielt, weil sie einen Schutz gegen die zytotoxischen Effekte der Therapeutika vermitteln kann (5).

1.3 Die Hämoxigenase

Die HO ist ein intrazelluläres Enzym und katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Hämabbaus unter Verbrauch von Sauerstoff in Kooperation mit NADPH-Zytochrom P450-Reduktase. Dabei entstehen in gleicher molekularer Menge Eisen (Fe^{2+}), Kohlenmonoxid (CO) und Biliverdin (BV), welches durch die Biliverdinreduktase weiter zu Bilirubin (BR) metabolisiert wird (6). Von der HO existieren zwei katalytisch aktive Isoformen: HO-1 ist induzierbar, während HO-2 konstitutiv exprimiert wird. In den meisten Zellen, mit Ausnahme von Niere und Milz, ist nur eine geringe HO-1-Expression zu finden; erst Stressoren (Hypoxie, Ischämie, Schwermetall, Entzündungsreaktionen oder das eigene Substrat Häm) führen zu einer vermehrten Expression. Die zweite Isoform, HO-2, wird nur wenig auf Expressionsebene reguliert und zeigt die höchsten Aktivitäten in neuralem Gewebe und im Hoden. Die allgemeine Annahme ist, dass die HO zytoprotektive Eigenschaften hat. Diese Effekte lassen sich durch zwei Mechanismen erklären: Zum einen durch den Abbau von Häm, welches, wenn in größerer Menge in der Zelle vorhanden, zu oxidativen Schäden, insbesondere an der Lipid-Wasser-Phase führt. Zum anderen wirkt sie über die gebildeten Produkte, von denen man für CO und BR in unterschiedlichen Signalwegen Schutzeffekte nachgewiesen hat (7). Die Rolle von Fe^{2+} , dem dritten Reaktionsprodukt, wird kontrovers diskutiert. Es wird vermutet, dass Fe^{2+} die Expression von Proteinen induziert, welche die toxischen Wirkungen von reaktivem Fe^{2+} abwehren können und damit ebenfalls zu einem anhaltenden Schutz gegen oxidativen Stress beiträgt (8). Andere Ergebnisse suggerieren aber, dass bei einer chronischen Überexpression der HO die erhöhten Fe^{2+} -Spiegel auch zu oxidativen Schäden führen können und dass das übermäßig freigesetzte Eisen die Schutzwirkung der HO aufhebt (9).

Um eine Aussage zur Rolle der HO in einem System zu erhalten, ist es daher essenziell eine Information über die tatsächliche katalytische Aktivität in den entsprechenden Zellen zu haben. Dabei kann einerseits die Kapazität von Gewebe- oder Zellhomogenat Häm zu degradieren quantifiziert werden. Dies geschieht über einen *in vitro* Assay, bei dem die in einer enzymatischen Reaktion generierten Produkte quantifiziert werden. Dies findet im Reagenzglas unter Zugabe aller Substrate im Überschuss (*in vitro* HO-Aktivität) statt. Andererseits kann

auch die tatsächlich im lebenden System stattgefundenene Aktivität gemessen werden, indem die in einem bestimmten Zeitintervall gebildeten Produkte gemessen werden. Dies ist jedoch nur möglich, wenn die Produkte akkumulieren und nicht weiter verstoffwechselt werden können. Für die Bestimmung der HO-Aktivität eignet sich dafür das BR, da es ein stabiles Endprodukt des Hämabbaus ist. Bei kultivierten Zellen reichert sich BR im Medium an und kann nach Extraktion quantifiziert werden und dient nach Bereinigung der zugrundeliegenden Zellzahl als Maß für die HO-Aktivität (*in situ*) (8). Zwar können auch Versuche, bei denen ein Hemmer der HO-Aktivität, z.B. Metalloporphyrine, eingesetzt wird, Hinweise auf eine Rolle der HO-Produkte in einem bestimmten System liefern, da man dann erkennen kann, dass z.B. Zellschäden vermehrt auftreten (5). Trotzdem erlauben diese Analysen keine Aussage über die Menge an generiertem Produkt in dem jeweiligen System. Die meisten Studien untersuchen nur die HO-Expression, d.h. die gemessenen mRNA- (5) oder Proteinspiegel (10) und aus diesen Daten wird indirekt auf eine zugrundeliegende Aktivität geschlossen. Aber nur Methoden, welche die tatsächliche HO-Aktivität erfassen, können herangezogen werden, um eine Aussage über die Menge an gebildetem Produkt zu erhalten. Studien, bei denen die HO-Expression in Melanomzellen untersucht wurden, suggerieren, dass dieses Enzym eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Resistenzen spielt (5, 10). Jedoch sind bisher keine Daten zur enzymatischen Aktivität und somit zur Menge an gebildetem Reaktionsprodukt vorhanden. Da die HO Fe^{2+} freisetzt, welches unter ungünstigen Bedingungen toxisch wirken kann, könnte eine induzierte Erhöhung der HO-Aktivität auch gezielt zur Tötung von Zellen durch Ferroptose ausgenutzt werden.

1.4 Ferroptose

Ferroptose ist eine spezielle Form des regulierten, nicht-apoptotischen Zelltods, welcher durch Oxidation der Membranlipide (Lipidperoxidation) ausgelöst wird und sich morphologisch und biochemisch von Apoptose, Nekrose und Autophagie unterscheidet. Erst 2012 wurde die Ferroptose als eigenständige Form des Zelltods definiert, da man Effektoren wie Erastin identifizierte, welche einen eisenabhängigen, programmierten Zelltod herbeiführen konnten (11). Ferroptose ist stark abhängig vom Eisenpool der Zelle. Das freie Fe^{2+} , welches aus Ferritin oder als Produkt der HO freigesetzt wird, bildet zusammen mit Wasserstoffperoxid Sauerstoffradikale in der Fenton-Reaktion. Diese reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) führen an mehrfach ungesättigten Membranlipiden zur Bildung von Phospholipidhydroperoxiden. Dieser

Vorgang findet in jeder Zelle in einem gewissen Ausmaß statt, jedoch können die oxidativen Veränderungen unter physiologischen Konditionen ausbalanciert werden (12). Dabei spielt die Glutathionperoxidase 4 (GPX4) zur Aufrechterhaltung der Redox-Hämostase eine zentrale Rolle. Die Lipidradikale, die im Zuge der Lipidperoxidation entstehen, werden durch GPX4 reduziert. GPX4 benötigt dafür Glutathion, welches durch seine oxidierbare Thiolfunktion als Reduktionsmittel fungiert. System x_c^- ist ein Aminosäuren-Antiporter, welcher Cystin im Austausch für Glutamat in die Zelle transportiert (13). Wird GPX4 gehemmt, wie z.B. bei der Behandlung mit RAS-selective lethal 3 (RSL3), kann diese Detoxifizierung nicht mehr stattfinden und Ferroptose wird induziert. Ferroptose kann aber auch über Hemmung des Systems x_c^- , durch eine Verarmung der Zelle an Cystein, ausgelöst werden, wie z.B. mit dem System x_c^- -Hemmer Erastin gezeigt wurde (14). Da Krebszellen häufig erhöhte Spiegel an Fe^{2+} aufweisen und gezielt durch Ferroptose getötet werden könnten, werden diese Wirkstoffe als neue adjunkte Krebstherapeutika diskutiert.

1.5 Ferroptose in Krebszellen

Krebszellen weisen einen beschleunigten Zellstoffwechsel auf und häufen größere Mengen an ROS an (15). Zwar wird die oxidative Wirkung durch anti-oxidative Entgiftungsmechanismen ausbalanciert, aber die Ferroptose könnte in diesen Zellen möglicherweise einen größeren Schaden anrichten. Bei Melanomzellen könnte die Ferroptose als Kombinationstherapie daher ein neuer Weg sein, mehr Zellen gezielt zu eliminieren, als durch die alleinige Therapie mit BRAFi möglich wäre. Aufgrund der Unterschiedlichkeit der Mechanismen der beiden Wirkstoffe erhofft man sich einen synergistischen Effekt, d.h. einen Effekt, der größer ist als die Summe beider Einzelsubstanzen allein. Es wurde bereits gezeigt, dass u.a. B-Zell Lymphome und Nierenzellkarzinome anfälliger gegenüber Erastin sind, als gesunde Zellen. Aber auch in Lungenkrebs- und Melanomzellen konnte Ferroptose bereits induziert werden (13).

1.6 Fragestellung

Melanomzellen können durch die Therapie mit dem BRAFi D eine Resistenz entwickeln. Daher muss das Ziel der Behandlung sein, möglichst viele Tumorzellen in einer Initialbehandlung zu eliminieren. Dies könnte durch Kombination von Wirkstoffen mit unterschiedlichen Tötungs-Mechanismen gelingen. Daher war unsere Idee die Krebszellen, welche die HO-1

hochregulieren und somit vermutlich höhere Fe^{2+} -Spiegel aufweisen, durch die Ferroptose-Induktion gezielt zu treffen.

1.7 Herangehensweise

Zur Dosisfindung der Eisenmodulatoren sollen Zellen der Linien BMC-M1 und M4 mit Eisenmodulator Hämin (H), HO-Hemmer Zink-Protoporphyrin (ZnPP), Eisenchelator Deferoxamin (DFO), externe Eisenquelle Eisen-Ammoniumcitrat (AFC), Ferroptose-Induktor RSL3 und möglichen Ferroptose-Aktivator Artemisinin (A) behandelt werden. Als kritischer Parameter soll die Zellzahl ausgelesen und diejenige Konzentration definiert werden, bei der die Zellzahl im Inkubationszeitraum auf 50 % reduziert wird (IC_{50}). Um die Zellzahl zu ermitteln, sollen die Zellen für einen längeren Inkubationszeitraum im IncuCyte[®] inkubiert und die erhaltenen Konfluenzwerte als Maß für die Zelldichte herangezogen werden. Die eisenmodulierenden Substanzen sollen für die Kombinationsversuche mit D in den Konzentrationsbereichen der IC_{50} eingesetzt werden, um mögliche synergistische Effekte herauszuarbeiten. Um eine Information über eine Erhöhung der HO-Aktivität zu erhalten, soll aus den Zellkulturüberständen die Menge an BR, dem stabilen Endprodukt des Hämabbaus, quantifiziert werden. Die erhaltenen BR-Mengen werden nach Normalisierung mit der Zelldichte als *in situ* HO-Aktivität angegeben, um die Aktivität verschiedener Zelllinien untereinander vergleichbar zu machen. Im Zuge der Arbeit sollen somit zwei wesentliche Kenngrößen herausgearbeitet werden, die eine Aussage zum Ansprechen der Melanomzellen auf Eisen-/HO-Modulatoren erlauben: Erstens die Auswirkung der Inkubation mit verschiedenen Eisenmodulatoren, Ferroptose-induzierende Substanzen, sowie D auf die Zellproliferation (Zellzahl) und zweitens die HO-Aktivität der Melanomzellen, die als Produktbildung während der Inkubation *in situ* gemessen werden soll. Zur Eignung einer Kombinationstherapie mit D sollen die Ferroptose-induzierenden Substanzen im Vergleich zu Hämin verwendet werden.

1.7.1 Dabrafenib, BRAF-Inhibitor

Da es das Ziel der Arbeit ist, herauszufinden, ob eine Kombination von BRAF mit Eisenmodulatoren bzw. Ferroptose-auslösenden Substanzen sinnvoll ist, wird D in den bereits zuvor bestimmten Konzentrationen eingesetzt (4). D blockiert die gesteigerte Aktivität der

BRAF-Kinase und verhindert somit eine weitere Zellteilung. Rezidive bzw. Therapie-resistente Subklone zeigen jedoch häufig kein Ansprechen mehr auf BRAFi (3).

1.7.2 Häm, HO-Substrat

Zur Untersuchung, ob die HO in unserem System induzierbar ist, wird H, das Oxidationsprodukt von Häm eingesetzt. Häm besteht aus einem Porphyrinring (Häm-Gruppe), welcher aus vier Pyrrol-Untereinheiten aufgebaut ist. Im Zentrum der Häm-Gruppe befindet sich ein zweiwertiges Eisenion, welches mit den Stickstoffatomen des Porphyrinrings verbunden ist. Häm ist Bestandteil vieler Proteine (u.a. Hämoglobin, Myoglobin) und spielt eine wichtige Rolle beim Sauerstofftransport sowie bei Redoxreaktionen. Beim H ist das Eisenion im Zentrum des Porphyrinringes dreiwertig und dadurch im Vergleich zum Häm reaktionsträger (16). H induziert seinen Abbau durch die HO, da es sonst die Bildung von ROS begünstigt und damit zur Zellschädigung beitragen kann. Die gebildeten Produkte BV/BR und CO wirken über verschiedene Mechanismen zytoprotektiv. Das freigesetzte Fe^{2+} wird zum Schutz vor oxidativem Stress dann entweder aus der Zelle exportiert oder intrazellulär in Ferritin komplexiert (8).

1.7.3 Zink-Protoporphyrin, HO-Hemmer

Um herauszufinden, ob die HO-Aktivität für die Zellproliferation wichtig ist, kann die HO-Aktivität und somit die Produktbildung durch die Verwendung eines kompetitiven Hemmers unterdrückt werden. ZnPP zählt zu den Metalloporphyrinen. Es stellt ein Analogon zu Häm dar, bei der das zentrale zweiwertige Eisenion durch ein zweiwertiges Zinkion ersetzt ist. ZnPP kann deswegen nicht durch die HO metabolisiert werden, blockiert aber das aktive Zentrum der HO. Damit ist ZnPP ein kompetitiver Hemmer der HO. Die Wirkung der kompetitiven Hemmer kann allerdings durch Superinduktion der HO im Laufe der Inkubation überwunden werden (17).

1.7.4 Deferoxamin, Eisenchelator

Ob Eisen im Zellsystem überhaupt eine wichtige Rolle spielt, kann überprüft werden, indem ein Eisenchelator eingesetzt wird. DFO ist eine chemische Verbindung, welche aus Hydroxamsäure aufgebaut ist und zweiwertige Eisenionen bindet. Durch Chelatbildung entsteht der eisengebundene Komplex, das Ferrioxamin. Dieser besitzt eine hohe chemische Stabilität und kann somit von der Zelle nicht mehr genutzt werden. DFO wird eine

antiproliferative Wirkung zugeschrieben, da es den intrazellulären Eisenpool, welcher für die DNA-Synthese und Zellteilung relevant ist, reduziert (18).

1.7.5 Eisen(III)-Ammoniumcitrat, externe Eisenquelle

Durch die Zugabe einer zusätzlichen Eisenquelle soll untersucht werden, ob dies die Ferroptose fördern kann. AFC ist ein Eisenpräparat und wird in der Lebensmittelindustrie als Nahrungsergänzungsmittel und bei der Behandlung von Eisenmangelanämie eingesetzt. Überdosiert kann es in Zellen die Bildung von oxidativem Stress begünstigen. In einem *in vitro* Versuch mit Lungenkarzinomzellen konnte AFC bereits die Zellproliferation durch Induktion von Ferroptose hemmen (19).

1.7.6 RAS-selective lethal 3, Ferroptose-Induktor

Da die Krebszellen vermutlich die HO-1 hochregulieren und somit höhere Eisen-Spiegel aufweisen könnten, soll durch die Kombination von D mit einem Ferroptose-Induktor die Zellen gezielt getroffen werden. RSL3 ist ein Ferroptose-Induktor, welcher über die direkte Hemmung des Enzyms GPX4 wirkt. Durch die Hemmung des Enzyms wird die Ferroptose induziert (20).

1.7.7 Artemisinin, möglicher Ferroptose-Induktor

Als ein weiterer möglicher Ferroptose-Induktor wurde A eingesetzt. A, welches aus der Pflanze *Artemisia annua* gewonnen wird, findet Anwendung in der traditionellen chinesischen Medizin als Heilpflanze. Zudem ist es ein bekanntes Medikament bei der Behandlung von Malaria. Bei *in vitro* Versuchen mit Zelllinien aus Ovarial-, Lungen- und Brustkarzinom, sowie Osteosarkom-Zellen des Hundes (21) und weiteren Veterinär-Tumorzelllinien (22) wurde festgestellt, dass A wachstumshemmend wirkt. Der genaue Wirkmechanismus von A ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Da A ein Endoperoxid ist, wird jedoch angenommen, dass es in Kombination mit Fe^{2+} die Bildung von ROS begünstigen und somit zur Ferroptose beitragen könnte (21).

1.8 Hypothesen

- Die HO-Aktivität wird durch Zellstress, der im Zuge der Behandlung mit D entsteht, hochreguliert. Durch die Hochregulierung der HO-Aktivität wird ein erhöhter Fe^{2+} -Spiegel in der Zelle erwartet.

- Substanzen, die einen Einfluss auf den zellulären Fe^{2+} -Spiegel haben, führen zur Änderung der Überlebensrate der Melanomzellen.
- Die Kombination von D mit RSL3 oder A zeigt einen synergistischen hemmenden Effekt auf die Proliferation.
- Weil die schneller wachsenden M4 Zellen bereits Mechanismen zum Zellschutz aktiviert haben, zeigen sie eine höhere HO-Induzierbarkeit, als die langsamer wachsenden M1 Zellen. M4 Zellen reagieren daher empfindlicher auf eine Behandlung mit Ferroptose-Induktoren.

2. Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen (siehe Kap. 2.1) wurden freundlicherweise von Frau Anna Vidal kultiviert und für die Versuche in 96-Well-Platten ausgesät. Die Herstellung der Inkubationsmedien und die Behandlung der so vorbereiteten Zellen (siehe Kap. 2.3) wurde freundlicherweise von Frau Andrea Müllechner übernommen.

Abb. 1 zeigt die vereinfachte schematische Darstellung des Aufbaus zur Bestimmung der Dosis-Wirkungsbeziehungen der Eisenmodulatoren, sowie die Bestimmung der *in situ* HO-Aktivität, welche in den folgenden Kapiteln genauer erläutert werden.

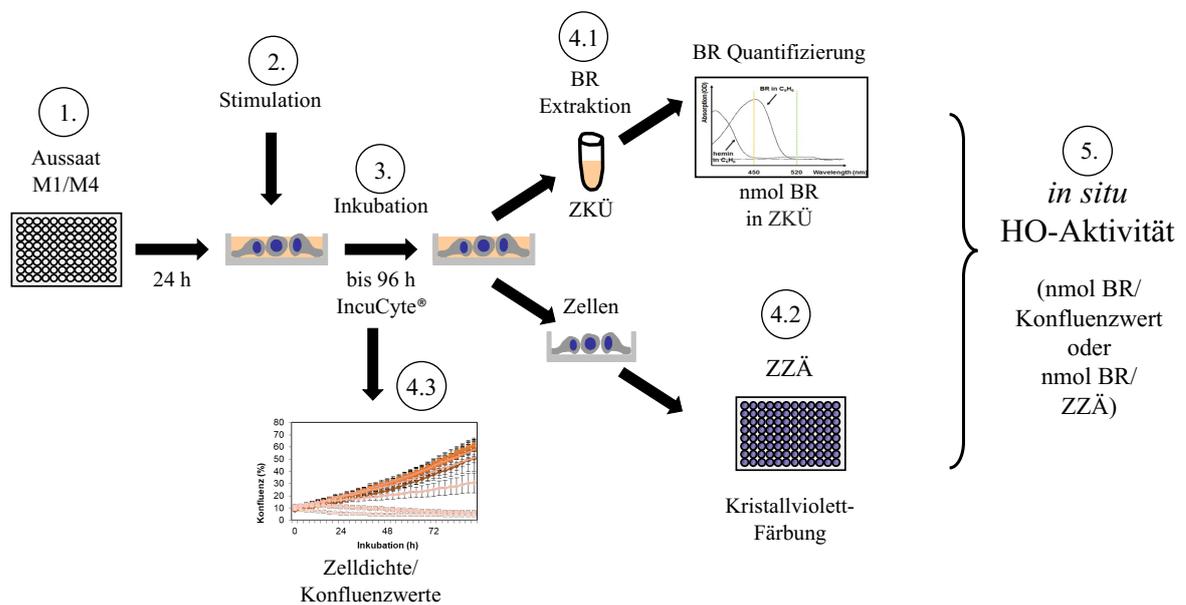


Abb. 1: Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Bestimmung der Dosis-Wirkungsbeziehung verschiedener Modulatoren der intrazellulären Eisen-Spiegel sowie zur Bestimmung der *in situ* HO-Aktivität von Melanomzellen der Linien BMC1-M1 und BMC1-M4. BMC-M1 und BMC-M4 Zellen (M1 und M4) wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät (Zellzahl: $7-10 \cdot 10^3$ /Well, 1.). Nach 24 Stunden wurde das Stimulationsmedium in 2 x Konzentration zugesetzt (2.). Der getestete Konzentrationsbereich deckte bei den Einzeltestungen für ZnPP, H, RSL3, A und DFO einen Bereich von 1 nM–30 μ M ab. Bei AFC wurde ein Konzentrationsbereich von 0,3 ng/ml–10 μ g/ml getestet. Die erhaltenen IC₅₀-Werte wurden als Richtwerte für spätere Kombinationsexperimente mit D verwendet. Bei M1 wurde D (300 nM) in Kombination mit H (3, 10 und 20 μ M), A (30, 100 und 300 μ M) RSL3 (0,1, 0,3 und 1 μ M) eingesetzt. Bei M4 wurde D (20 nM) mit H (3, 10 und 20 μ M), A (3, 100 und 300 μ M) RSL3 (0,3, 1 und 3 μ M) eingesetzt. Die Inkubation wurde im IncuCyte® durchgeführt (3.) und betrug 96 h bei den Einzeltestungen und 72 h bei den Kombinationsexperimenten. Während der Inkubation wurde die Zelldichte in den Wells alle 3 h automatisiert ausgelesen. Nach der Inkubation wurde der Zellkulturüberstand (ZKÜ) geerntet, BR daraus extrahiert (4.1) und BR-Menge

mittels Photometrie bestimmt. Die BR-Menge im ZKÜ wurde für die Berechnung der in situ HO-Aktivität einerseits mit der Zelldichte oder mit den Zellzahläquivalenten (ZZÄ) normalisiert (5.). Die ZZÄ wurden kolorimetrisch durch Färben des Zellrasens mit Kristallviolett bestimmt (4.2). Andererseits wurden als Zelldichte die Konfluenzwerte der IncuCyte[®]-Messungen nach 72 h herangezogen (4.3).

2.1 Zelllinien

Für diese Arbeit wurden Zellen der Linien BMC1-M1 und BMC1-M4 (im Weiteren M1 und M4 genannt) verwendet. Beide Zelllinien wurden im Jahr 2018 (BMC1-M1) und 2020 (BMC1-M4) aus jeweils einer humanen Hirnmetastase von Patient*innen in der Charité - Universitätsmedizin Berlin gewonnen. Dazu wurde der Tumor post OP auf Eis gelagert und anschließend unter sterilen Bedingungen mechanisch zerkleinert. Das zerkleinerte Gewebe wurde anschließend enzymatisch mit Trypsin (0,05 %) im Wasserbad bei 37 °C verdaut. Zur Entfernung unverdauter Gewebestücke, wurde die Suspension über ein Zellsieb (70 µm) gegeben und die Einzelzellsuspension bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in Zellkulturmedium aufgenommen und auf T25 Flaschen gesät. Expandierte Tumorzellen in kleiner Passage ($p < 10$) wurden gesammelt und zirka 2×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium (FBS, 10 % Dimethylsulfoxid, DMSO) bei -150 °C gelagert.

2.2 Zellkultivierung

Für die Kultivierung der Zellen wurde Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco) verwendet. Dem Medium wurden 10 % fötales Rinderserum (FBS), 1 % Glutamat und 1 % Antibiotikum (Penicillin/Streptomycin) zugesetzt. Die Zellen wurden bei 37 °C Umgebungstemperatur, 5 % CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 95 % im Brutschrank kultiviert. Das Medium wurde alle drei Tage gewechselt und die Zellen nach Bedarf im Verhältnis 1:3 (M1) bis 1:5 (M4) gesplittet. Die Ablösung der Zellen wurde mit Trypsin/EDTA (0,05 % Trypsin und 0,5 mM EDTA) durchgeführt. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer-Zählkammer in einer 10 µl Zellsuspension ermittelt. Der Verdünnungsfaktor war bei M4 größer, da diese eine höhere Zellteilungsrate aufwiesen.

Standardmäßig wurden die Zellen in 100 µl Medium pro Well in eine 96-Well-Platte (Greiner) ausgesät. Bei den Testreihen der Einzelsubstanzen waren die ausgesäten Zelldichten für M1 und M4 jeweils 10.000 Zellen/Well. Bei den Testreihen der Wirkstoffkombinationen wurde M1 in einer Dichte von 7.000 Zellen/Well, und M4 in einer Dichte von 10.000 Zellen/Well

ausgesät. Die Behandlung mit den jeweiligen Substanzen erfolgte 24 Stunden später. Für die Einzelsubstanzen wurden zwölf 96-Well-Mikrotiterplatten, für die Kombinationen sechs 96-Well-Mikrotiterplatten im Ganzen angesetzt und analysiert (eine Platte pro Einzelsubstanz/Kombination und Zelllinie).

2.3 Herstellung der Inkubationsmedien

Von den Testsubstanzen H (Fluka), A (VWR), RSL3 (Sigma), und ZnPP (Frontier Scientific) wurde zunächst mit DMSO (Sigma) als Vehikel eine Stammlösung hergestellt, sodass die höchste zu verwendende Konzentration maximal 1 Volumenprozent des Vehikels ausmachen würde. Die Stammlösungen wurden dann jeweils mit DMSO 1:3 verdünnt. Aus jeder Stammlösung und jeder der 1:3 Verdünnungen wurden nun seriell 1:10 Verdünnungsstufen mit DMSO hergestellt, um die folgenden Konzentrationsbereiche abzudecken: H, 1 nM–20 µM; A, 30 nM–1 mM; RSL3, 1 nM–30 µM und ZnPP, 1 nM–20 µM. Aus DFO (Novartis) und AFC (Sigma) wurde ebenfalls eine Stammlösung hergestellt, bei der H₂O als Vehikel verwendet wurde. Auch für diese beiden Substanzen wurde die Stammlösung so gewählt, dass die Inkubation der Zellen maximal 0,3 Volumenprozent des Vehikels (H₂O) ausmachen würde. Die Stammlösungen und die daraus hergestellten 1:3 Verdünnungen wurden, wie oben angegeben seriell 1:10 verdünnt, um folgende Konzentrationsbereiche (DFO: 10 nM–300 µM; AFC, 0,3 ng/ml–10 µg/ml) abzudecken. Für die Testung der Einzelsubstanzen wurden Zellen beider Linien, M1 und M4, mit den Wirkstoffen im selben Konzentrationsbereich getestet.

Um den Effekt der Wirkstoffe auf die D-vermittelte Wachstumsdepression zu ermitteln, wurden ausgewählte Konzentrationen der Einzelsubstanzen, die im Rahmen der Dosis-Wirkungs-Untersuchungen stimulierende oder hemmende Effekte auf die Zellteilungsrate aufwiesen, gemeinsam mit D getestet (Wirkstoffkombination). Für D (Tocris) wurde dabei die bereits zuvor experimentell ermittelten IC₅₀-Werte eingesetzt (M1: 300 nM, M4: 20 nM) (4). In den Wirkstoffkombinationen wurden die Zielkonzentrationen durch Mischungen von D (10 mM Stocklösung in DMSO) oder mit dem Vehikel DMSO mit entsprechenden Verdünnungsstufen der Einzelsubstanzen hergestellt. Die angestrebten Zielkonzentrationen waren 3, 10 und 20 µM für H und 30, 100 und 300 µM für A. Da die Zellzahl von M1 und M4 unterschiedlich stark auf RSL3 reagierte (siehe Kap. 3), wurde RSL3 für M1 in den Konzentrationen 100 nM, 300 nM und 1 µM und für M4 Zellen in den Konzentrationen 300 nM, 1 µM und 3 µM eingesetzt. Auch

bei den Kombinationsversuchen wurden maximal 0,45 Volumenprozent durch das Vehikel eingenommen.

2.4 Inkubation

Anschließend wurden die Inkubationsmedien den Zellen zugegeben. Die Substanzen wurden dazu in 100 µl Medium auf das bereits vorhandene Medium doppelt (2 x) konzentriert hinzugefügt, woraus sich pro Well 200 µl einer einfach konzentrierten Lösung in der oben angegebenen Zielkonzentration ergab.

Bei den Testungen der Einzelsubstanzen wurde eine horizontale Anordnung der Testbedingungen gewählt. Die Spalten 1 und 2 einer jeden Platte wurden für die Negativkontrollen verwendet (Spalte 1: Mediumkontrolle – kein Zusatz; Spalte 2: Vehikel-Kontrolle in entsprechendem Volumenprozent). In die Spalten 3 bis 10 wurden die unterschiedlichen Konzentrationen der Wirkstoffe in aufsteigender Konzentration pipettiert. Somit ergaben sich pro Kondition acht technische Replikate (acht Reihen je Platte).

Bei der Testung der Wirkstoffkombination wurde eine vertikale Anordnung der Testkonditionen gewählt. Dabei wurden folgende Kontrollen in die Reihen A und B pipettiert (Reihe A: Vehikel-Kontrolle, DMSO, in dem entsprechenden Volumenprozent, Reihe B: D alleine in der zellspezifischen Konzentration, M1: 300 nM und M4: 20 nM). Die Reihen C bis E wurden mit den Einzelsubstanzen in aufsteigender Reihenfolge der Konzentrationen befüllt. Die Reihen F bis H bildeten die Kombinationen der Einzelsubstanzen mit D. Da die Spalten 1 und 12 einer jeden Mikrotiterplatte nicht mit Zellen versetzt waren, ergaben sich pro Kondition der Wirkstoffkombination jeweils zehn Replikate je Platte.

Nach der Zugabe der Inkubationsmedien wurden die so vorbereiteten Platten in den Inkubator (IncuCyte[®] S3, Sartorius) zur optischen Analyse der Zellteilungsrate verbracht. Nach der Inkubationszeit wurden die Platten aus dem Inkubator entnommen und wie in Abschnitt 2.6 angegeben weiter prozessiert.

2.5 Bestimmung der Zellteilungsraten

Der IncuCyte[®] (IncuCyte[®] S3, Sartorius) ist ein Mikroskop, das in den Inkubator integriert wird und mit dem es möglich ist eine Live-Cell-Analyse von bis zu sechs Mikrotiterplatten gleichzeitig durchzuführen. Der rotierende Revolver ermöglicht die Aufnahme von einer definierten Anzahl von Bildern aus verschiedenen Regionen pro definierter Zeiteinheit. Für

unsere Analysen wurden vier Bilder/Well aus vier unterschiedlichen Positionen mit einem 10 x Objektiv erzeugt. Die Ermittlung der Konfluenz erfolgte aus den aufgenommenen Bildern nach Ablauf der Inkubationszeit mittels zugehöriger Software (IncuCyte[®] S3-Software, Standard-Modus). Die Daten konnten dann in Microsoft Excel importiert und als Tabellen weiterverarbeitet werden. Die Inkubationszeit betrug bei Testungen der Einzelsubstanzen 96 h und bei Testungen der Wirkstoffkombination 72 h. Für die definierte Zeiteinheit wurde ein Abstand von drei Stunden zwischen den Fotos gewählt. Dieses Zeitintervall hat sich aus vorhergehenden Messungen, die im Labor durchgeführt wurden, als optimal erwiesen.

2.5.1 Bestimmung der Zellkonfluenz

Die Zellteilungsrate lässt sich durch Bestimmung der Konfluenz in jedem Well ermitteln. Diese wird in den erstellten Aufnahmen rechnerisch unter Verwendung einer Maske, welche die Lichtbrechungseigenschaften an den Rändern der Zellen ausnutzt, bestimmt und als Fläche in Prozent des gesamten Ausschnitts angegeben. Die Software erkennt daher die Ausmaße einer Zelle und definiert diese als Maske, sodass eine Quantifizierung des bewachsenen Bereiches möglich ist. Damit diese Maske möglichst genau errechnet werden kann, muss das Experiment mit einer geringen Zellzahl begonnen werden. Jedes Well wird dabei in einem Abstand von drei Stunden fotografiert und ausgewertet (vier Bilder/Well) und der Mittelwert erstellt. Für die weitere Verwendung wurden die Konfluenzwerte der Replikate einer Kondition gemittelt, wodurch sich pro Konzentration eines Wirkstoffes bzw. einer Kombination und Zeitabschnitt ein mittlerer Konfluenzwert ergab. **Abb. 2** zeigt anhand von RSL3 ein Beispiel zur Bestimmung der Zellteilungsraten mittels der Konfluenzwerte.

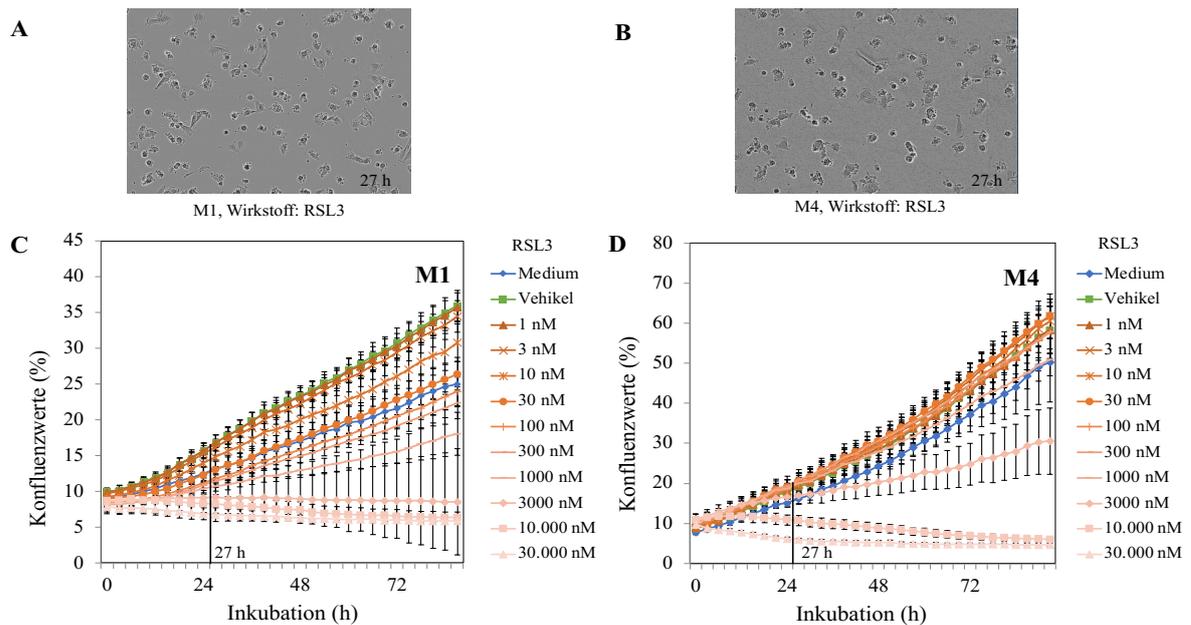


Abb. 2: Beispiel zur Bestimmung der Zellteilungsrate aus den ermittelten Zelldichten (IncuCyte[®]). M1 (A) und M4 Zellen (B) 27 h nach Aussaat in eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Zellzahl: 10.000/Well, Mediumkontrolle) fotografiert mit dem IncuCyte[®] S3 (Phasenkontrast, 10 x Objektiv, 10-fache Okular Vergrößerung). Graphische Darstellung (C, D) der Entwicklung der Zelldichte (Konfluenzwerte, in Prozent, Y-Achse) von M1 (C) und M4 (D) in Abhängigkeit der Zeit (in h, X-Achse) und dem Wirkstoff RSL3 in den Konzentrationsbereichen von 1 nM–30.000 nM (orange Linien). Zum Vergleich sind die Kontrollkonditionen (Mediumkontrolle) als blaue Linie und (nur Vehikel) als grüne Linie dargestellt. Die Auswertung und Visualisierung der Daten erfolgte mit Microsoft Excel. Dazu wurden die Mittelwerte jedes Messzeitpunktes (alle drei Stunden) aus den technischen Replikaten (n=10 Wells) errechnet und gegen die Zeit (h) für jede Konzentration +/-SD dargestellt.

2.5.2 Einfluss der Wirkstoffe auf die Zellteilungsrate (Dosis-Wirkungs-Beziehung)

Die Dosis-Wirkungszusammenhänge wurden ermittelt, um die mittlere inhibitorische Konzentration (IC_{50}) bestimmen zu können. Diese wurde benötigt, um für die Interaktion mit D einen ausgewählten Konzentrationsbereich der Einzelsubstanzen zu definieren. Der IC_{50} -Wert gibt an, bei welcher Konzentration ein Wirkstoff im Vergleich zur unbehandelten (Vehikel)-Kontrolle zu einer um 50 % niedrigeren Zellzahl geführt hat. Zunächst wurden die Konfluenzwerte (Rohdaten) aller Bedingungen auf sich selbst - die Zelldichte zum jeweiligen 0 h Zeitpunkt - normalisiert (normalisierte Zellteilungsrate). Um sicherzustellen, dass der gewählte Zeitpunkt ein noch ungestörtes Wachstum bei den Kontrollen garantierte, wurden die gemittelten Konfluenzwerte des 72 h Zeitpunktes ausgewählt. Der Zuwachs wurde dann für

jede Bedingung aus diesen normalisierten Werten errechnet und als relativer Zuwachs im Verhältnis zu den jeweiligen Kontrollen zum ausgewählten Zeitpunkt (Vehikel-Kontrolle, 100 %) ausgedrückt (relative Zelldichte). Zur graphischen Darstellung wurden die Konzentrationen eines Wirkstoffes (Y-Achse) gegen die relative Zelldichte (in Prozent, Y-Achse) aufgetragen. Die IC_{50} -Werte einer jeden Dosis-Wirkungskurve wurden händisch ermittelt, indem die Y-Werte einer Zelldichte von 50 % auf die X-Achse zur Bestimmung der Konzentration projiziert wurden.

2.6 Ernte des Zellkulturmediums

Nach der Inkubation wurden die Überstände für die BR-Extraktion in 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt. Dabei wurde bei gedimmtem Licht gearbeitet, um die Degradation des BR zu unterbinden. Es wurden zirka 20 μ l pro Well in den Nöpfen belassen, um die Zellen vor Austrocknung zu schützen. Die gewonnenen Überstände wurden in flüssigen Stickstoff eingefroren und bis zur Analyse der BR-Mengen durch das Extraktionsverfahren bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.7 Bestimmung der Zellzahläquivalente am Ende der Inkubation (Kristallviolett-Färbung)

Um eine weitere Aussage über die Zellzahl am Ende der Versuche zu erhalten (Endzeitpunktbestimmung), wurde ein Kristallviolett-Assay durchgeführt (23). Dazu wurde der Rest der Zellkulturüberstände auf Papiertücher ausgeklopft, darauf folgte die Fixierung der Zellen bei Raumtemperatur für 15 Minuten mit 4 % Paraformaldehyd (Sigma, 50 μ l/Well). Danach folgten drei Waschschrte mit destilliertem Wasser (100 μ l/Well), wobei sich nach jedem Waschschrte ein mehrmaliges Ausklopfen auf Papiertüchern anschloss. Die Wells wurden dann mit Kristallviolett-Färbelösung (Sigma, 50 μ l/Well, 0,1 % Kristallviolett in 10 % Ethanol) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Färbelösung abpipettiert und es folgten wieder drei Waschschrte mit destilliertem Wasser. Die Mikrotiterplatten wurden zum Trocknen 48 Stunden abgedunkelt gelagert. Die Wells wurden mit 10 %-iger Essigsäure (Sigma, 200 μ l/Well) versetzt, um die Farbkomplexe zu lösen und zur Gewährleistung einer guten Durchmischung wurde die Lösung dreimal auf- und abpipettiert. Die Wells einer jeden Mikrotiterplatte, in die keine Zellen ausgesät wurden, dienten als Leerwert für die Bereinigung der Messwerte. Die Messung der Extinktionen der einzelnen

Wells wurde mit einem Plate Reader durchgeführt (Spark Plate Reader, Seriennummer: 1812001168, Programm: Spark Control, Methode: Kristallviolett_Andrea, Wellenlänge: 590 nm). Die Bestimmung der farbstoffspezifischen Extinktion erfolgte durch Subtraktion des Leerwertmittelwertes von den Extinktionen der Einzelwerte. Die bereinigte Extinktion ist ein Maß für die Zelldichte (ZZÄ–im Weiteren so genannt), die sich aus der zum Zeitpunkt der Färbung noch vorhandene Zellzahl ergibt. Die ZZÄ sollten im Idealfall mit den durch optische Methoden erzielten Konfluenzwerten (Rohdaten) korrelieren.

2.8 Bestimmung der *in situ*-HO-Aktivität

Das Endprodukt der Häm-Degradation ist BR, welches im ZKÜ von Zellen akkumuliert. Bei einer ausreichenden Inkubationsdauer und hinreichenden Zellzahlen pro Well, kann über die BR-Mengen, die im Medium gefunden werden, daher auf die zugrundeliegende zelluläre HO-Aktivität rückgeschlossen werden. Aufgrund der stöchiometrischen Verhältnisse der Produktbildung, reflektiert diese die unter den getesteten Bedingungen tatsächlich umgesetzte Menge Häm (*in situ* HO-Aktivität).

2.8.1 Extraktion des Bilirubins im Zellkulturüberstand

Die Darstellung der *in situ* HO-Aktivität erfolgte durch die Bestimmung der BR-Menge im ZKÜ. Dazu wurde eine bereits bekannte Methode verwendet (8). Wie in Abschnitt 2.6. beschrieben, fand auch die BR-Extraktion bei gedimmtem Licht statt, um Licht-vermittelte Degradation von BR zu unterbinden. Der Auftauvorgang wurde bei Raumtemperatur durchgeführt, anschließend wurden die Proben durchmischt (Vortex, Velp Classic, vier Sek., 10 000 x g). Danach wurden jeweils 200 µl ZKÜ in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert. Als Negativkontrolle wurde Zellkulturmedium, welches nicht mit Zellen versetzt war und 0,5 % DMSO enthielt, mitgeführt und zur Bereinigung der optischen Dichte (ΔOD) herangezogen (siehe Kap. 2.8.2). Für jede Probe wurde jeweils ein Duplikat angefertigt (24 Proben pro 96-Well-Platte in der Einzeltestung, 16 Proben pro 96-Well-Platte bei den Kombinationen). Um das BR vom Protein abzulösen, wurden 100 µl Koffeinelösung (0,25 M Koffein, 0,52 M Natriumbenzoat, 0,9 M Natriumacetat, alle Sigma) hinzugegeben. Anschließend wurde 100 µl gesättigte KCl-Lösung hinzugefügt, um die Polarität der Phase zu erhöhen und so die Bildung einer Emulsion bei der anschließenden organischen Extraktion zu verhindern. Jedes Eppendorf-Gefäß wurde nach jedem Pipettiervorgang für vier Sekunden am

Vortex-Gerät gemischt (Vortex, siehe oben). Anschließend wurde in jedes Reaktionsgefäß 1 ml Benzen (VWR, 10 %-ig) pipettiert und beide Phasen in einem standardisierten Verfahren gründlich durchmischt.

Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (Eppendorf Mini Spin, 30 Sekunden, 10 000 g), die obere BR-hältige organische Phase wurde in 1 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, ohne die untere wässrige Phase zu berühren. Die Röhrchen wurden eingefroren (mind. 45 Minuten, -2 C°), um eventuell vorhandene wässrige Kontaminationen abzutrennen. Nach dem Auftauen wurde ein von oben abgenommenes Aliquot des organischen Extrakts im zwei-Strahl Photometer (Photometer Hitachi U3900) vermessen. Dazu wurde die Probe und die Referenz (Benzen) in je zwei Quarzküvetten (Hellma) überführt und die Extinktion gegen die Referenz in einem Wellenlängenbereich von 400 – 600 nm unter den angegebenen Bedingungen gemessen (Programm UV Solutions, Wellenlänge 2 nm Spaltbreite, 120 nm/min, zwei Wiederholungen). Störungsfreie Scans wurden ausgewertet und die Absorption bei 450 nm (Absorptionsmaximum von BR in Benzen) und 520 nm (Referenzwellenlänge) ausgelesen.

2.8.2 Ermittlung der Bilirubin-spezifischen Extinktion

Um die BR-spezifische Extinktion eines jeden Scans zu ermitteln, wurde die Extinktion am Maximum (OD₄₅₀) um die Extinktion der Referenzwellenlänge (OD₅₂₀) bereinigt (DiffOD, ΔOD) und die ΔODs beider Scans gemittelt. Die so erhaltenen Werte wurden um die ΔOD -Werte bereinigt, welche für die Negativkontrollen (frisches Zellkulturmedium mit DMSO) gefunden wurden. Anschließend wurden die bereinigten ΔODs in nmol BR/200 μl Medium umgerechnet (Umrechnungsfaktor $\text{OD}=0,0561$). Um die im Medium gefundene Menge BR als Maß für die zugrundeliegende *in situ* HO-Aktivität umzurechnen, musste noch eine Zellzahlbereinigung durchgeführt werden.

2.8.3 Bestimmung der *in situ* HO-Aktivität unter Berücksichtigung der Konfluenzwerte

Um eine Aussage über die von den Zellen im untersuchten Zeitraum gebildete BR-Menge zu erhalten (*in situ* HO-Aktivität) und dadurch auch auf den Eisenpool pro Zelle zu schließen, wurden die gemittelten Konfluenzwerte (Rohdaten) verwendet. Dazu wurden die bereinigten BR-Werte jeder Kondition durch die zugehörigen Konfluenzwerte dividiert. Zur weiteren

Darstellung wurde die *in situ* HO-Aktivität normalisiert zur entsprechenden Vehikel- bzw. D-Kontrolle, welche gleich 1 gesetzt wurde.

Die ZZÄ der Kristallviolett-Färbung hätten ebenfalls zur Zellzahlbereinigung in Betracht gezogen werden können, wurden jedoch aufgrund einer größeren Differenz bei den niedrigen Konditionen nicht zur Darstellung der HO-Aktivität herangezogen (siehe Kap. 3.1).

2.9 Datenverarbeitung und Visualisierung

Für die Datenverarbeitung wurde Microsoft Excel verwendet. Die Daten wurden jeweils als Mittelwert mit Standardabweichung errechnet und visualisiert. Auch wenn jede Kondition mit technischen Replikaten angesetzt wurde, konnte keine Aussage zur biologischen Varianz gemacht werden, da jeder Versuch nur einmal angesetzt wurde (biologische Replikate, n=1). Auf eine statistische Auswertung wurde daher verzichtet.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob die *in situ* HO-Aktivität, welche in primären Hirntumoren des Melanoms eine erwiesene Rolle spielt (5), durch verschiedene Eisenmodulatoren induzierbar ist und ob eine Kombination von Ferroptose-Induktoren mit D eine Steigerung der HO-Aktivität auslöst, welche zur Ferroptose führt. Somit sollte es zur Abtötung eines signifikanten Teils der Zellen kommen.

3.1 Korrelation von Zellzahläquivalenten und Konfluenz

Da die Ermittlung der Zellkonfluenz mit dem IncuCyte[®] durch ein optisches Verfahren erfolgt, bei denen die Zelldichte als Konfluenz erfasst wird, welche definiert ist als die nicht mit Zellen besetzte Fläche im Kulturgefäß, sollte untersucht werden, wie gut diese Messgröße mit einer Messgröße zur Zellzahlbestimmung übereinstimmt. Dazu wurde die Kristallviolett-Färbung als Endpunktbestimmung (ZZÄ) eingesetzt, welche in früheren Studien bereits zur Normalisierung der Zellzahl herangezogen wurde (8). Um abzuklären, ob die Zelldichte (Konfluenzwert) und die ZZÄ gleichermaßen zur Normalisierung der HO-Aktivität verwendet werden können, wurden beide Messgrößen miteinander korreliert (**Abb. 3**).

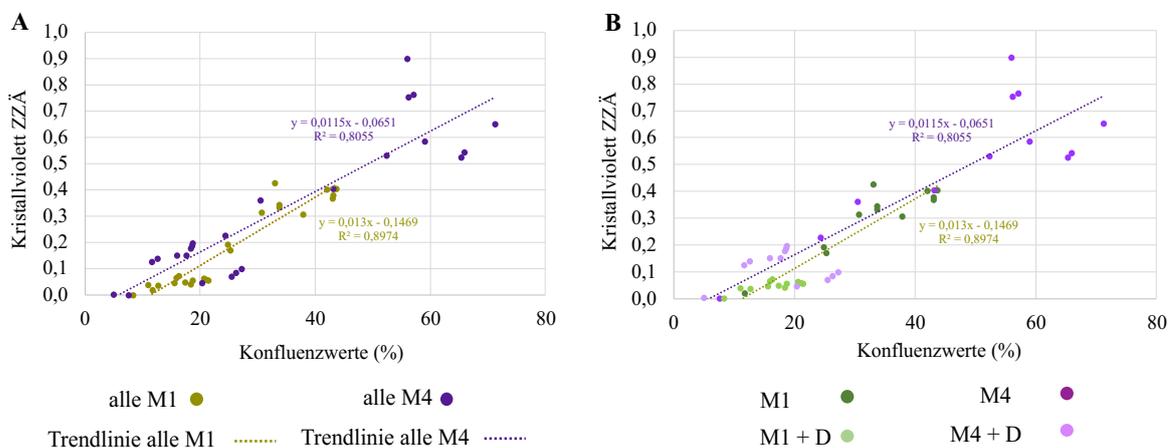


Abb. 3: Darstellung der Korrelation zwischen Kristallviolett ZZÄ und Konfluenzwerte der BMC1-M1 und BMC1-M4 Zellen. Abbildung A zeigt die Zelllinien M1 und M4, wobei alle Einzelsubstanzen und Kombinationen zur entsprechende Zelllinie zusammengefasst (alle M1 grün, alle M4 lila) und in Abhängigkeit ihrer Konfluenzwerte (in %, X-Achse) und Kristallviolett ZZÄ (Y-Achse) dargestellt wurden. Daraus wurde pro Zelllinie eine Trendlinie gezogen, Formel und Bestimmtheitsmaß wurden ebenfalls in der Grafik angeführt. In Abbildung B wurden die Zelllinien in den unterschiedlichen Konditionen mit

und ohne D aufgeteilt (M1 dunkelgrün, M1+D hellgrün, M4 lila, M4+D rosa) und ebenfalls abhängig von Konfluenz und ZZÄ dargestellt.

Während die Konfluenzwerte und ZZÄ im mittleren Bereich gut miteinander korrelierten, tendierten sie bei hohen Zellzahlen zu einer größeren Streuung. Bei sehr niedrigen Zellzahlen divergierten beide Messgrößen ebenfalls deutlich. Während die niedrigen Zellzahlen noch messbare Konfluenzwerte ergaben, wurde manchmal bei den ZZÄ bereits null ausgegeben. Daher entschieden wir uns für die Normalisierung der HO-Aktivität mit dem jeweiligen Konfluenzwert. Andernfalls hätten diese Konditionen für die Auswertung ausgeschlossen werden müssen.

3.2 Dosis-Wirkungs-Beziehungen der eisenmodulierenden Substanzen

Um herauszufinden, ob eine dreitägige Inkubation einen Effekt auf die Zellzahl bzw. die *in situ* HO-Aktivität der BMC1-Zellen hat, wurden verschiedene Eisenmodulatoren in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt (ZnPP, H, AFC, DFO, RSL3 und A). Dazu wurden die Konfluenzwerte nach 72 h relativ zum gemessenen Wert zum Zeitpunkt 0 h ausgedrückt (0 h-normalisiert) und gegen die eingesetzte Dosis der Substanzen aufgetragen (**Abb. 4**). Diejenige Konzentration, bei der die Zellzahl im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle nur mehr 50 % betrug, wurde als IC₅₀ definiert.

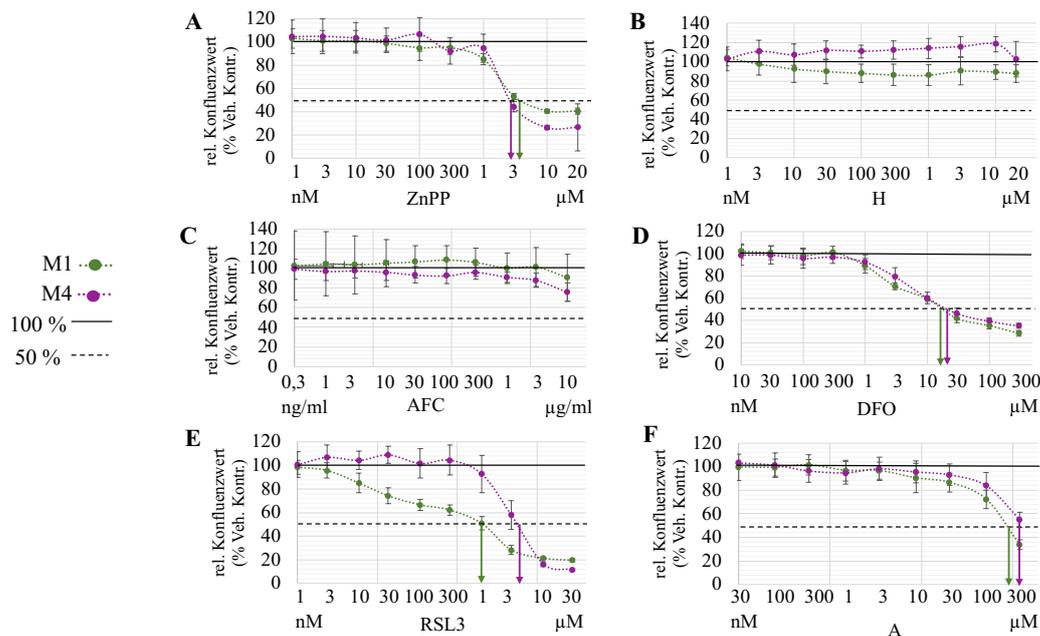


Abb. 4: Vergleich der Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Eisen-Spiegel modulierenden Substanzen in BMC1-M1 und BMC1-M4 Zellen. Abhängigkeit der Zelldichte von (A) ZnPP, (B) H, (C) AFC, (D) DFO, (E) RSL3 und (F) A (X-Achse, Konzentration nM bis μM , bzw. ng/ml bis $\mu\text{g/ml}$), dargestellt als relative Konfluenzwerte (rel. Konfluenzwerte) in % der Vehikel-Kontrolle (rel. Konfluenzwerte, % Veh. Kontr., Y-Achse) der Linien BMC1-M1 (M1, grüne gestrichelte Linie) und M4 (lila gestrichelte Linie). Die Konfluenzwerte wurden nach 72 h herangezogen und prozentual zu den Werten der Kontrolle (Veh. Kontr.) als Mittelwerte (%) \pm SD dargestellt ($n=10$). Als Referenzen wurden die Vehikel-Kontrolle (100 %), sowie der Bereich der halbmaximalen Konfluenz (50 %) durch schwarze Linien angezeigt. Zur Bestimmung der IC_{50} -Werte wurde grafisch der Schnittpunkt der extrapolierten relativen Konfluenz mit der 50 % Linie herangezogen und mit Pfeilen (M1 grün, M4 lila) sichtbar gemacht.

Der HO-Hemmer ZnPP wurde in einem Konzentrationsbereich von 1 nM–20 μM getestet. Dabei war ab einer Konzentration von 1 μM ein beginnender Abfall des 0 h-normalisierten Konfluenzwerts erkennbar; bei einer Konzentration von 3 μM wurde der IC_{50} -Wert erreicht. M1 und M4 Zellen verhielten sich hinsichtlich ihrer Zellzahl nach Inkubation mit ZnPP gleich (**Abb. 4A**).

H, das Substrat der HO, wurde in einem Konzentrationsbereich von 1 nM–20 μM getestet. M4 Zellen profitierten von H, da es zu einer Steigerung der 0 h-normalisierten Konfluenzwerte um etwa 20 % kam. Demgegenüber zeigten M1 Zellen tendenziell eine leichte dosisabhängige

Reduktion der Zelldichte. Bis zur höchsten getesteten Konzentration (20 μM) war jedoch kein Abfall unter 80 % erkennbar (**Abb. 4B**).

AFC wurde als externe Eisenquelle im Konzentrationsbereich von 0,3 ng/ml–10 $\mu\text{g/ml}$ angeboten. Die 0 h-normalisierten Konfluenzwerte beider Zelllinien blieben konstant, erst in den hohen Konzentrationsbereichen (ab 300 nM) kam es zu einem geringen Abfall der Zellzahl auf etwa 80 % der Vehikel-Kontrolle (**Abb. 4C**).

DFO, ein Eisenchelator, wurde mit einem Konzentrationsbereich von 10 nM–300 μM getestet. Konzentrationen größer als 1 μM führten zu einer sukzessiven Abnahme der Zellzahl bei beiden Zelllinien. Der IC_{50} -Wert lag für beide Zelllinien nahe beieinander (20 μM , **Abb. 4D**).

RSL3, ein Ferroptose-Induktor, wurde in einem Konzentrationsbereich von 1 nM–30 μM getestet. Die Zelllinien reagierten verschieden auf RSL3, und zeigten somit eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber RSL3. Bei M1 führte RSL3 bereits bei Konzentrationen, die 10 nM oder darüber waren, dosisabhängig zu einer stetigen Abnahme der 0 h-normalisierten Konfluenzwerte. Der IC_{50} -Wert wurde bei einer Konzentration von 1 μM erreicht. Im Gegensatz dazu kam es bei den M4 Zellen bis zu einer Konzentration von 1 μM zu keiner Abnahme der Zellzahl. Jedoch führten die höheren Konzentrationen zu einer drastischen Reduktion. Bei den M4 Zellen war daher die IC_{50} bei 4 μM erreicht (**Abb. 4E**).

A, das als möglicher Ferroptose-Induktor diskutiert wird, wurde in einem Konzentrationsbereich von 30 nM–1 mM getestet. Die Abnahme 0 h-normalisierten Konfluenzwerte war moderat und bei beiden Zelllinien im mittleren Konzentrationsbereich (3 μM) zu erkennen. Der IC_{50} -Wert wurde im Bereich der höchsten getesteten Konzentrationen erreicht (300 μM , über Löslichkeitsgrenze, **Abb. 4F**).

3.3 HO-Aktivitäten der eisenmodulierenden Substanzen

Mit den Konfluenzwerten, welche nach 72 h Inkubation mit den einzelnen Substanzen ausgegeben wurden und der extrahierten BR-Menge aus dem ZKÜ wurde die *in situ* HO-Aktivität für jede Zelllinie errechnet. Durch die Zellzahlnormalisierung konnte die BR-Menge, die aus dem ZKÜ extrahiert werden konnte, als Maß für die Häm-Degradation pro Zelle ermittelt und als *in situ* HO-Aktivität definiert werden (**Abb. 5**).

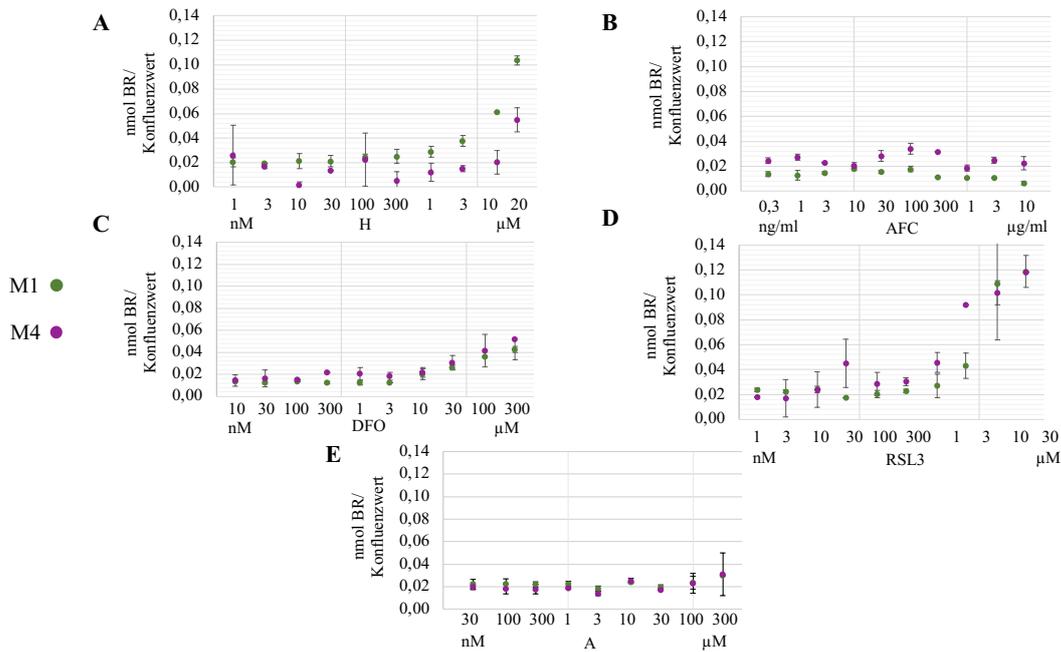


Abb. 5: Ermittlung der *in situ* HO-Aktivitäten in BMC1-M1 und BMC1-M4 Zellen nach Behandlung mit Eisen-Spiegel modulierenden Substanzen. Effekt von (A) H, (B) AFC, (C) DFO, (D) RSL3 und (E) A auf die *in situ* HO-Aktivität der Linien BMC1-M1 (M1, grüne Punkte) und BMC1-M4 (M4, lila Punkte) in Abhängigkeit der Konzentrationen (X-Achse, nM bis μ M bzw. ng/ml bis μ g/ml). Die gemessene Konzentration von BR im ZKÜ (n=2) wurde mit der Zelldichte (IncuCyte[®]-Konfluenzwerte nach 72 h) normalisiert (nmol BR/Konfluenz, Y-Achse) und als Mittelwert +/- SD dargestellt.

In Abwesenheit eines Modulators lag die *in situ*-HO-Aktivität der BMC1-Zellen bei etwa 0,02 nmol BR pro Konfluenzwert (**Abb. 5**). Nur drei Substanzen führten dosisabhängig zu einer Steigerung der *in situ* HO-Aktivität: H, DFO und RSL3 (**Abb. 5A, C und D**). Bei der Stimulation mit H wurde ein unterschiedliches Verhalten beider Zelllinien erkennbar. Bei M1 Zellen führte H zu einer höheren *in situ* HO-Aktivität, verglichen mit den M4 Zellen. Die HO-Aktivität der M1 Zellen wurde durch H um das 5-fache, während sie bei den M4 Zellen nur um das 3-fache gesteigert wurde (**Abb. 5A**). DFO führte zu einer sukzessiven Steigerung der HO-Aktivität, welche sich bei beiden Zelllinien gleichermaßen darstellte (**Abb. 5C**). RSL3 steigerte *in situ* HO-Aktivität bei beiden Zelllinien. Dabei zeigten die M4 Zellen höhere Werte im mittleren Konzentrationsbereich. Ab einer Konzentration von 10 μ M RSL3 war bei beiden Zelllinien eine ähnlich hohe HO-Aktivität messbar (**Abb. 5D**).

3.4 Effekt von Dabrafenib auf die Zelldichte und die *in situ* HO-Aktivität

Um den Effekt von D als Einzelsubstanz auf die Dichte der BMC1-Zellen zu analysieren, wurden wieder die 0 h-normalisierten Konfluenzwerte nach 72 h Inkubationszeit herangezogen und relativ zu den Kontrollen (Vehikel) berechnet. Die Kontrolle wurde somit gleich 1 gesetzt (**Abb. 6**). Auf diese Weise konnten die erhaltenen D-Effekte von allen Kombinationsexperimenten gemittelt werden (n=3). Dabei wurde D in der Konzentration eingesetzt, die in vorhergehenden Versuchen als IC₅₀ für jede Zelllinie ermittelt worden war (für die M1 Zellen 300 nM, für die M4 Zellen 20 nM) (4). Bei den M1 Zellen führte die Gabe von 300 nmol D zu einer Reduktion des 0 h-normalisierten Konfluenzwertes auf etwa 42 % im Vergleich zur Kontrolle. Bei den M4 Zellen konnte jedoch mit 20 nmol (also 15 x weniger) D eine Reduktion der Zellzahl auf etwa 30 % erzielt werden (**Abb. 6**). Somit war D, wie in der Literatur angegeben, wesentlich wirksamer bei den M4 Zellen.

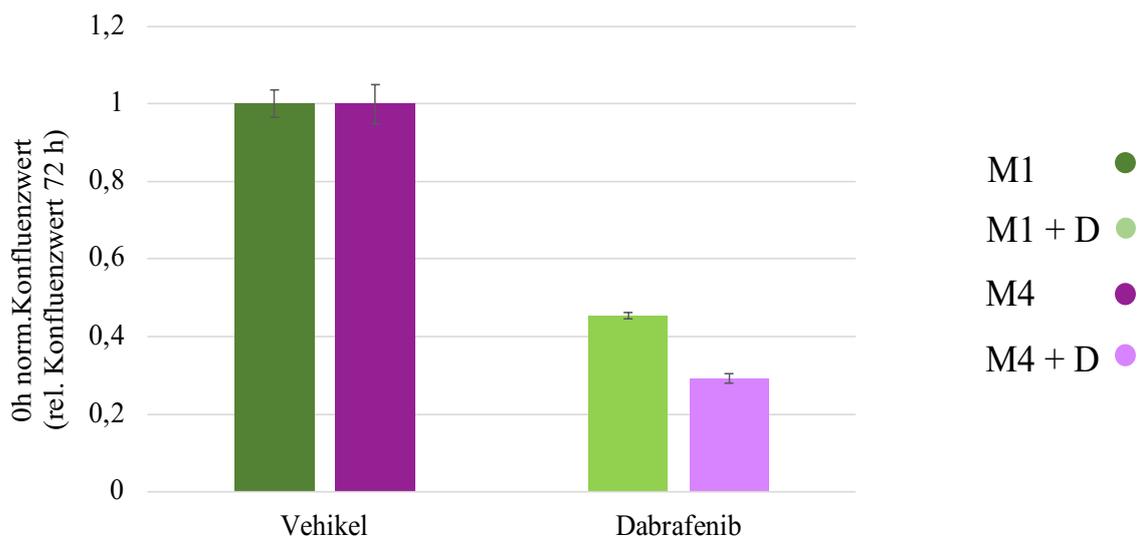


Abb. 6: Darstellung des Dabrafenib-Effekts auf die Zellzahl nach 72 h Inkubation im Vergleich zur Kontrolle. Effekt von D auf die Zelldichte von BMC1-M1 (hellgrün) und BMC1-M4 Zellen (rosa) im Vergleich zur jeweiligen Vehikel-Kontrolle (M1 lila, M4 dunkelgrün). Die Konfluenz jeder Kondition wurde nach 72 h relativ zu den Werten am Beginn der Messung (0 h) berechnet und die Vehikel-Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt (0 h normalisierter Konfluenzwert). Der D-Effekt wurde relativ zur jeweiligen Vehikel-Kontrolle als Mittelwert \pm SD (0 h norm. Konfluenzwert, rel. Konfluenzwert 72 h, Y-Achse) dargestellt.

Die Gabe von D allein erhöhte bereits die *in situ* HO-Aktivität deutlich. Während bei den M1 Zellen die *in situ* HO-Aktivität durch D etwa 1,5-fach höher war, erhöhte sich die *in situ* HO-

Aktivität bei den M4 Zellen dreifach (**Abb. 7**). Dabei wurde auch beobachtet, dass die M1 Zellen eine höhere Basis-Aktivität aufwiesen als die M4 Zellen. Ein ähnliches Ergebnis zeigten auch einige, aber nicht alle Experimente der Versuchsserie der Einzelsubstanzen (**Abb. 5**).

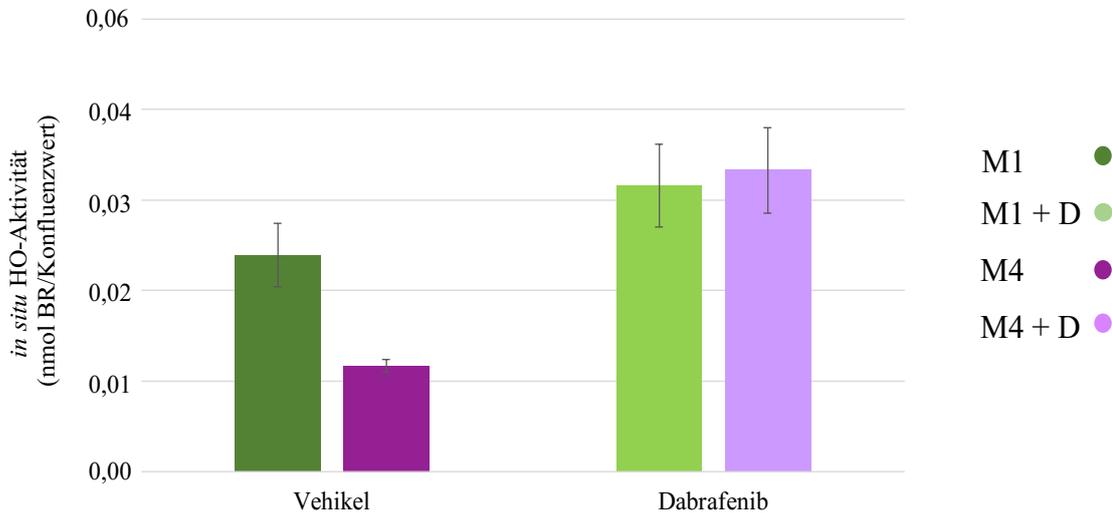


Abb. 7: Darstellung des Dabrafenib-Effekts auf die *in situ* HO-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (Vehikel). Effekt von D auf die *in situ* HO-Aktivität von BMC1-M1 (hellgrün) und BMC1-M4 Zellen (rosa) im Vergleich zur jeweiligen Vehikel-Kontrolle (M1 lila, M4 dunkelgrün). Die ermittelte BR-Menge jeder Kondition wurde durch die entsprechenden Konfluenzwerte zum 72 h Zeitpunkt dividiert. Die entsprechenden Ergebnisse (n=3) wurden als Mittelwert +/- SD (*in situ* HO-Aktivität, nmol BR/Konfluenzwert, Y-Achse) dargestellt.

3.5 Vergleich des Effekts der Eisen-Spiegel modulierenden Substanzen in Kombination mit Dabrafenib auf die Zelldichte

Für Kombinationsversuche mit D wurden folgende eisenmodulierenden Substanzen, nämlich H als Induktor der HO-Aktivität und RSL3 als Ferroptose-Induktor, sowie A, als möglicher Ferroptose-Induktor ausgewählt, um zu klären, ob in der Kombination mit D synergistische oder antagonistische Effekte darstellbar sind. Um diese Effekte sichtbar zu machen, wurden wieder die 0 h-normalisierten Konfluenzwerte herangezogen und sowohl relativ zur Vehikel-Kontrolle (ohne D) oder relativ zur Kondition D alleine (ohne Eisenmodulator) errechnet und beide jeweils gleich 1 gesetzt, also die Werte relativ zur jeweiligen Kontrolle ausgedrückt (**Abb. 8**).

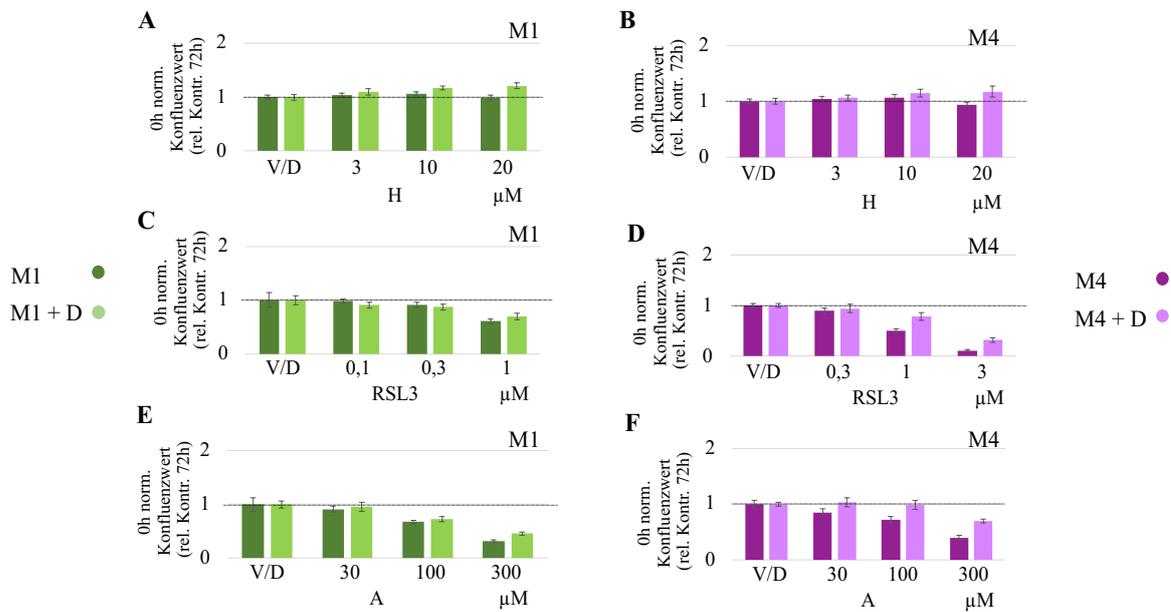


Abb. 8: Vergleich des Effekts der Eisen-Spiegel modulierenden Substanzen in Kombination mit Dabrafenib auf die Zellzahl von BMC1-M1 und BMC1-M4 Zellen. Effekte von (A, B) H, (C, D) RSL3 und (E, F) A (X-Achse, μM) auf die Zelldichte nach 72 h mit und ohne D, dargestellt als 0 h normalisierte Konfluenz relativ zur jeweiligen Kontrolle (D bzw. Vehikel, V). Gegenübergestellt wurde die relative Konfluenz (0 h norm. Konfluenzwert, rel. Kontr. 72 h, Y-Achse) der Linien BMC1-M1 (M1 lila, Kombination mit D 300 nM rosa) und BMC1-M4 (M4 dunkelgrün, Kombination mit D 20 nM hellgrün) und die Vehikel-Kontrollen jeweils gleich 1 gesetzt (schwarze Linie). Die Effekte der Eisenmodulierenden Wirkstoffe mit und ohne D wurde relativ zu den Werten der entsprechenden Kontrollen als Mittelwerte \pm SD dargestellt ($n=8$).

H wurde in den Konzentrationen von 3, 10 und 20 μM getestet. Die Kombination mit D gab den Zellen einen Vorteil im Vergleich zu D alleine: mit steigender H-Konzentration war ein Anstieg der Zellzahl bei den Kombinationen mit D um bis zu 20 % im Vergleich zu D alleine erkennbar. Dabei verhielten sich beide Zelllinien gleich (**Abb. 7A und B**).

RSL3 wurde für M1 und M4 Zellen, aufgrund der divergierenden IC_{50} -Werte je Zelllinie in der Einzeltestung (**Abb. 4E**), in unterschiedlichen Konzentrationen getestet (M1: 0,1, 0,3 und 1 μM ; M4: 0,3, 1 und 3 μM). RSL3 in Kombination mit D zeigte eine Verminderung des zytotoxischen Effekts (protektiver Effekt) im Vergleich zu RSL3 alleine (**Abb. 7C und D**). Dieser Effekt war bei M4 Zellen bei den höheren RSL3 Konzentrationen ($>1 \mu\text{M}$) deutlich erkennbar.

A wurde in den Konzentrationen 30, 100 und 300 μM getestet. Für A ergab sich, ähnlich wie bei RSL3, in Kombination mit D eine weniger stark ausgeprägte Reduktion der Zellzahl. Wie bei RSL3 stellte sich dieser Effekt bei M4 Zellen deutlich stärker als bei M1 Zellen dar (**Abb. 7E und F**). Diese Daten zeigen, dass D in Kombination mit einer weiteren toxisch wirkenden Substanz zwar synergistisch wirkt, jedoch ist die Toxizität in Kombination geringer, als durch die additiven Effekte der Einzelsubstanzen bewirkt wird. Dieser Effekt war bei den M4 Zellen deutlicher ausgeprägt, was auf die Aktivierung eines Schutzmechanismus hindeutet.

3.6 HO-Aktivitäten der eisenmodulierenden-Substanzen in Kombination mit Dabrafenib

Mit den Konfluenzwerten nach 72 h und der extrahierten BR-Menge aus dem ZKÜ wurde die *in situ* HO-Aktivität für jedes Kombinationsexperiment mit D erhoben, um zu eruieren, ob die Behandlung zu einer Erhöhung der HO-Produkte geführt und so möglicherweise zum Zellschutz beigetragen hatte (**Abb. 9**).

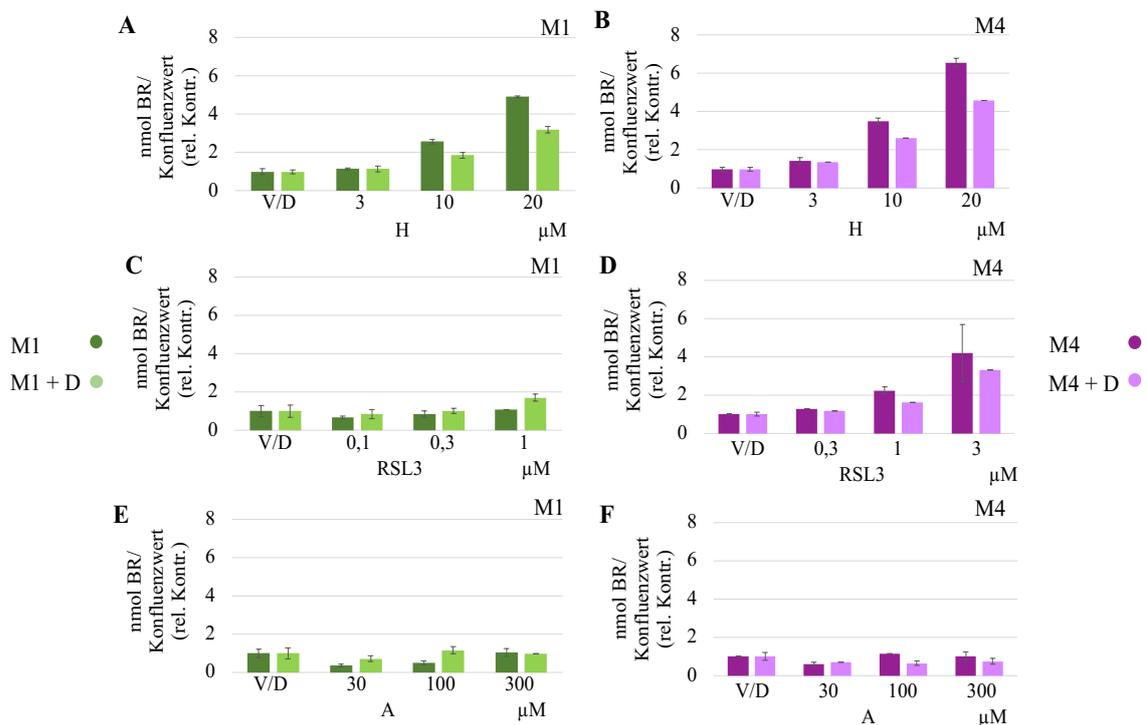


Abb. 9: Ermittlung der *in situ* HO-Aktivitäten in BMC1-M1 und BMC1-M4 Zellen nach Behandlung mit Eisen-Spiegel modulierenden Substanzen in Kombination mit Dabrafenib. Effekt von (A, B) H, (C, D) RSL3, (E, F) A auf die *in situ* HO-Aktivität der Linien BMC1-M1 (M1 lila, Kombination mit D 300 nM rosa) und BMC1-M4 (M4

dunkelgrün, Kombination mit D 20 nM hellgrün) in Abhängigkeit der Konzentrationen (X-Achse, μM) dargestellt als nmol BR pro Konfluenzwert und normalisiert zur entsprechenden Vehikel (V)- bzw. D-Kontrolle (D), welche gleich 1 gesetzt wurden (nmol BR/Konfluenzwert, rel. Kontr., Y-Achse). Die Darstellung erfolgte als Mittelwerte ($n=2$) \pm SD.

In Übereinstimmung mit den zuvor ermittelten Effekten von H in der Versuchsserie der Einzelsubstanzen (**Abb. 5A**) zeigte sich, dass H alleine im Vergleich zur Vehikel-Kontrolle zu einem Anstieg der *in situ* HO-Aktivität führte. Während bei M1 Zellen eine etwa 5-fach höhere HO-Aktivität gemessen wurde, führten 20 μM H bei den M4 Zellen zu einer etwa 6,5-fach höheren *in situ* HO-Aktivität. In Kombination mit D kam es bei beiden Zelllinien zu einer geringeren Steigerung der HO-Aktivität (**Abb. 9A und B**) als die vorhergehenden Versuche. RSL3 wurde in beiden Zelllinien in einem unterschiedlichen Konzentrationsbereich eingesetzt (0,1–1 μM bei M1 und 0,3–3 μM bei M4 Zellen). Bei M1 Zellen führte 1 μM RSL zu einer geringen Steigerung der HO-Aktivität. Tendenziell höhere Werte wurden in der Kombination mit D erreicht. Bei der höchsten getesteten Konzentration (1 μM) wurde eine etwa doppelt so hohe *in situ* HO-Aktivität erreicht (**Abb. 9C**). Bei vergleichbaren RSL3 Konzentrationen kam es in M4 Zellen zu deutlich höheren HO-Aktivitäten. RSL3 (1 μM) alleine erhöhte die HO-Aktivität auf das Doppelte. Die höchste Konzentration führte zu einer 4-fach höheren HO-Aktivität. Hier hatte jedoch die gleichzeitige Gabe von D einen geringeren Effekt auf die HO-Aktivitäten (**Abb. 9D**).

A alleine zeigte bei beiden Zelllinien durchgängig bei allen Konditionen keine Steigerung der HO-Aktivität im Vergleich zur entsprechenden Kontrolle. Ebenso verhielt sich die Kombination mit D in den M1 Zellen. Bei den M4 Zellen führte die Kombination mit D sogar zu einer leichten Abnahme der HO-Aktivität im Vergleich zur D-Kontrolle (**Abb. 9E und F**). Dies war ähnlich, wie bereits in den Untersuchungen zum Dosis-Wirkungs-Zusammenhang. Während also die gleichzeitige Gabe von D bei den M1 Zellen, mit Ausnahme von H, keine Modulation der HO-Aktivität ergab, wurde der stimulierende Effekt der Eisenmodulatoren auf die *in situ* HO-Aktivität in Kombination mit D abgemildert. Die *in situ* HO-Aktivität stellt die tatsächlich von den Zellen umgesetzten Mengen an Häm dar und reflektiert damit auch die Mengen an freigesetztem Fe^{2+} . Es ist also anzunehmen, dass die weniger stark ausgeprägten Steigerungen der HO-Aktivität unter der Wirkung der Eisenmodulatoren in Kombination mit

der D-Behandlung hilft, toxisch hohe Fe^{2+} -Spiegel in den M4 Zellen zu vermeiden. Dies könnte auf eine effektivere Strategie zur Bekämpfung von oxidativem Stress seitens der M4 Zellen hindeuten.

4. Diskussion

Um Aussagen zum Ansprechen der Melanomzellen auf Eisen-/HO-Modulatoren zu erhalten, wurden zwei wesentliche Kenngrößen in der Arbeit erhoben: Erstens die Auswirkung der Inkubation mit verschiedenen Eisenmodulatoren, Ferroptose-induzierende Substanzen, sowie D auf die Zellproliferation (Zellzahl) und zweitens die HO-Aktivität der Melanomzellen, die in Form der Produktbildung *in situ* gemessen wurde. Als Testsystem wurden zwei Zelllinien eingesetzt (BMC1-M1 und BMC1-M4). Dabei handelte es sich um Zellen, die aus einer Hirnmetastase und einem Rezidiv eines Melanoms von Patient*innen im Abstand von 2 Jahren abgeleitet wurden. Die später etablierten M4 Zellen wachsen im Vergleich zu den zuerst abgeleiteten M1 Zellen schneller. Erwartet wurde, dass M4 Zellen eine erhöhte HO-Induzierbarkeit durch Dabrafenib zeigen, als die langsamer wachsenden M1 Zellen. Zudem vermuteten wir, dass die M4 Zellen wegen der verstärkten HO-vermittelten Freisetzung von Fe^{2+} empfindlicher auf eine Behandlung mit Ferroptose-Induktoren reagieren sollten.

4.1 Zellzahlnormalisierung der *in situ* HO-Aktivität

Zunächst wurden die experimentellen Rahmenbedingungen validiert. Da die aus der Lebendzellbildung erhaltenen Konfluenzwerte zur Zellzahlnormalisierung herangezogen wurden, sollte zunächst geklärt werden, wie gut diese Werte mit der bereits etablierten kolorimetrischen Methode (Kristallviolett-Färbung) übereinstimmen. Über einen breiten Bereich korrelierten die Konfluenzwerte sehr gut mit den ZZÄ, die aus der Kristallviolett-Färbung ermittelt wurden; aber bei sehr hohen und sehr niedrigen Zellzahlen divergierten beide Messgrößen. Wir führten dies auf den Umstand zurück, dass beim kolorimetrischen Assay Waschschriffe notwendig sind, die möglicherweise zu einem Zellzahlverlust beigetragen haben können. Nachdem unsere Daten zeigten, dass die Konfluenzwerte zur Zellzahlnormalisierung geeignet sind, haben wir diese zur Normalisierung verwendet, weil sie direkt bestimmt wurden. Allerdings erfordert diese Kenngröße eine Analyse mit dem IncuCyte[®]. Um die damit erhaltenen Werte auch für andere Analysen nutzbar und unterschiedliche Experimente vergleichbar zu machen, wäre es möglich die Konfluenzwerte mithilfe der ZZÄ aus der Kristallviolett-Färbung für eine Kalibrationsgerade heranzuziehen, um in Zukunft in zugrundeliegenden Zellzahlen umrechnen zu können. Dazu wären jedoch zusätzliche Experimente notwendig gewesen, die den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätten.

4.2 IC₅₀-Werte der Eisenmodulatoren

Ziel war es, die Konzentrationsbereiche zu definieren, in denen eine effektive Hemmung der Zellproliferation erzielt werden konnte. Von den getesteten Substanzen konnte für ZnPP, DFO und RSL3 im getesteten Dosisbereich ein hemmender Effekt beobachtet werden. Unsere Daten zeigen somit, dass der getestete Dosisbereich im Bereich der IC₅₀-Werte der Substanzen ZnPP, RSL3 und DFO für den Kombinationsversuch mit D für beide Zelllinien herangezogen werden kann. Durch die Hemmung des Zellwachstums mittels DFO und ZnPP konnte außerdem gezeigt werden, dass sowohl Fe²⁺, als auch die ungehemmte HO-Aktivität essenziell für die Proliferation der M1 und M4 Zellen sind. Ross et al. konnten bereits aufzeigen, dass die Behandlung mit dem kompetitiven HO-Hemmer ZnPP die Zellproliferation und die Zellmotilität von kultivierten dermalen Fibroblasten herabsetzte (24). Daraus kann abgeleitet werden, dass ebenso eine Hemmung der HO zur Behandlung des Melanoms therapeutisch genutzt werden könnte.

In Übereinstimmung damit zeigte die H-Behandlung keinen inhibitorischen, sondern einen proliferationsfördernden Effekt (siehe Kap. 4.3), der wahrscheinlich über eine Induktion der HO erklärt werden kann. Von den als Ferroptose-induzierend definierten Substanzen, führte nur die Inkubation mit RSL3 zu einer deutlichen Zellzahlminderung. Dabei reagierte die Linie M4 wesentlich empfindlicher auf RSL3. Es ist denkbar, dass diese erhöhte Sensitivität mit der höheren Zellteilungsrate der M4 Zellen in Zusammenhang steht. Pourcelot et al. konnten zeigen, dass sich schnell teilende Leukämiezellen eine höhere intrazelluläre Fe²⁺-Konzentration benötigen als langsamer wachsende gesunde myeloische Vorläuferzellen (25). Da man also davon ausgehen kann, dass sich schnell teilende Zellen eine erhöhte Menge an Fe²⁺ zur Verfügung haben müssen, ist zu erwarten, dass auch die Zellteilungsrate der Melanomzellen mit erhöhten Fe²⁺-Spiegeln korreliert.

4.3 Bedeutung der HO-Aktivität für die Melanomzellen

Die zentrale Frage dieser Arbeit war, herauszufinden, ob das Fe²⁺, welches bei der HO-Reaktion gebildet wird, tatsächlich zur Ferroptose-Induktion therapeutisch genutzt werden könnte. Einige Studien konnten zeigen, dass verschiedene Substanzen die Expression der HO in Melanomzellen verändern können (10, 25). Da die Expression der HO häufig nur auf mRNA- (5) oder Protein-Ebene (10) ermittelt wurde, gibt es kaum Information zur zellulären HO-Aktivität. Diese ist in dieser Arbeit definiert als enzymatische Umsetzung von Häm unter

den jeweiligen Inkubationsbedingungen. Auch wenn häufig eine erhöhte mRNA-Expression mit einer Erhöhung der Proteinspiegel assoziiert ist, und aus erhöhten Proteinspiegeln geschlossen werden kann, dass auch die Enzymaktivität dieser Proteine erhöht ist, muss das nicht zwangsläufig der Fall sein. In einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe haben wir nämlich trotz erhöhter mRNA-Expression von HO-1 in neuronalem Gewebe von Ratten, eine erniedrigte HO-Aktivität gefunden (26).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir zeigen, dass H, RSL3 (**Abb. 5A und D**) und D (**Abb. 7**) die HO-Aktivität, d.h. die Bildung von Reaktionsprodukten unter der Inkubation in beiden Zelllinien zu erhöhen vermag. Studien berichten, dass die HO-1 durch oxidativen Stress, Entzündungsreaktionen, Schadstoffe und das eigene Substrat H (27) induziert wird. Es ist daher anzunehmen, dass die erhöhte HO-Aktivität, die wir gemessen haben, auf eine erhöhte Expression der HO-1, möglicherweise aufgrund des erhöhten Zellstress, zurückzuführen ist. Möglich ist also, dass die Erhöhung der HO-Aktivität die Melanomzellen vor dem Therapie-induzierten Zellstress schützt. Furfaro et al. konnten bereits zeigen, dass eine erhöhte Expression von HO-1 die Wirksamkeit von Vemurafenib in Melanomzellen reduziert (5). Neben Melanomzellen, können auch andere Krebszellen (u.a. Prostatakarzinom, Neuroblastom und Leukämie-Malignomzellen) durch die HO ihr Zellmilieu vor oxidativen Schäden schützen (28). Dies suggeriert, dass HO-Produkte einen Zellschutz vermittelt haben, wie es für BR (29) oder CO (30) bereits gezeigt wurde. Studien zeigten aber auch, dass die Schutzwirkung von HO-Produkten bei einer Überexpression von HO-1 aufgehoben werden kann, da erhöhte Fe^{2+} -Spiegel zu oxidativem Stress beitragen können (9). Deswegen könnte die erhöhte Eisenfreisetzung zu einer größeren Empfindlichkeit z.B. gegenüber Ferroptose-Induktoren führen. In einer Studie mit Fibrosarkomzellen und Erastin als Ferroptose-Induktor wurde tatsächlich gezeigt, dass HO-1 zum Zelltod durch Ferroptose beiträgt (31).

4.4 Effekte des BRAFi Dabrafenib auf die HO-Aktivität

Die M1 und M4 Zellen zeigen eine unterschiedliche Sensitivität bezüglich ihrer IC_{50} -Werte gegenüber D. Dabei zeigen die resistenten M4 Zellen interessanterweise eine etwa 15-fach höhere Empfindlichkeit. Daher wurden in dieser Arbeit auch die aus einer Studie (4) etablierten Konzentrationen (IC_{50}) eingesetzt, nämlich für M1 300 nM und für M4 20 nM. Unsere Daten zeigen, dass die Hemmung der Zellteilung durch D mit einer Erhöhung der HO-Aktivität assoziiert ist (**Abb. 7**). Dieser Effekt zeigte sich proportional zur Zellteilung, da beide Zelllinien

bei der IC_{50} von D ähnlich hohe HO-Aktivitäten aufweisen. Es scheint also eher das Ausmaß der Hemmung der Zellteilung ausschlaggebend für die Erhöhung der HO-Aktivität zu sein, als die absolute Konzentration des BRAFi. Die HO-Aktivität könnte also zur Kompensation der Zellteilungsunterdrückung oder als Antwort auf den Zellstress, der mit der Unterdrückung der Zellteilung assoziiert ist, hochreguliert werden. Furfaro et al. konnten zeigen, dass die Hochregulierung der HO in BRAF^{V600E}-Melanomzellen, die Wirksamkeit des BRAFi Vemurafenib reduzierte. Laut Studie ist dies darauf zurückzuführen, dass die Hemmung des MAPK-Signalweges zur vermehrten Expression der HO führte. Dieselbe Studie zeigte auf, dass eine Hemmung der HO mittels des kompetitiven HO-Inhibitors Zinn-Mesoporphyrin (SnMP, 10 μ M) zur Verbesserung der Wirksamkeit von Vemurafenib führte. Nach Ausschaltung der HO-Aktivität konnte die Lebensfähigkeit der Zellen um zirka 45 % verringert werden (5). Daher spielt die HO eine Rolle bei der Resistenzentwicklung gegen Vemurafenib. Unsere Daten zeigen, dass auch D die BR-Produktion der M1 und M4 Zellen erhöht (**Abb. 7**). Dies suggeriert, dass die Erhöhung der HO-Aktivität einen Mechanismus zur Resistenzentwicklung darstellt, welcher generell gegen BRAFi in Melanomzellen aktiviert wird.

Da stöchiometrisch je Mol BR/BV ein Mol Fe^{2+} freigesetzt wird (6), können wir aus unseren erhaltenen Daten schließen, dass durch eine erhöhte Aktivität der HO auch mehr Fe^{2+} freigesetzt worden sein muss. Somit können wir aus der Menge BR, die die Zelle produziert hat, direkt auf die freigesetzte Fe^{2+} -Menge pro Zelle schließen. Es ist daher zu erwarten, dass die D-induzierte Erhöhung der HO-Aktivität ebenfalls mit einem Anstieg des intrazellulären Fe^{2+} -Spiegels assoziiert sein müsste. D könnte daher die Zellen gegenüber einer Gabe von Ferroptose-Induktoren sensitivieren.

4.5 Ferroptose-Induktoren

RSL3 und A wurden eingesetzt, um herauszufinden, ob mögliche Ferroptose-Induktoren einen signifikanten Teil der Zellen abtöten können. Dabei stellte sich die Frage, ob die langsamer wachsenden M1 Zellen empfindlicher reagieren und ob eine Änderung der HO-Aktivität nachweisbar ist. In unserem Versuch führte nur RSL3 zu einer deutlichen Reduktion der Zellzahl (IC_{50}). Dabei stellten sich die schneller wachsenden M4 Zellen aber tatsächlich als weniger empfindlich heraus (**Abb. 4E**). Die sich schneller teilenden M4 Zellen profitierten möglicherweise, wegen ihrer Fähigkeit die toxischen Fe^{2+} -Effekte besser abwehren zu können, mehr von der HO, als die M1 Zellen. Somit wurden sie, bei gleich hoher HO-Aktivität, weniger

stark von den toxischen Effekten des RSL3 getroffen. Möglich ist auch, dass die erhöhte HO-Aktivität der M4 Zellen zu einer verbesserten zellulären Strategie geführt hat mit den freigesetzten Fe^{2+} -Mengen umzugehen, z.B. durch vermehrten Eisenexport (Ferroportin, **Abb. 10**). Es war deswegen auch zu erwarten, dass sie eine Kombinationstherapie (D und ein Ferroptose-Induktor) besser überleben würden, als die M1 Zellen. A hatte in unserem Versuch erst in den höchsten getesteten Konzentrationen einen leicht hemmenden Effekt (**Abb. 4F**). Die HO-Aktivität wurde nicht gesteigert (**Abb. 5E**). Im Gegensatz dazu führte RSL3 zu einer drastisch erhöhten HO-Aktivität (8-fache Erhöhung, **Abb. 5D**). Dies spricht dafür, dass dabei auch Fe^{2+} in erhöhter Menge freigesetzt wurde. Li et. al haben in ihrer Studie mit Endometriumszellen herausgefunden, dass eine Überexpression des Transmembranproteins Ferroportin (SLC40A1), welches Fe^{2+} im Austausch mit Protonen exportiert, die Ferroptose durch den Ferroptose-Induktor Erastin verhinderte und die Zellen somit eine Resistenz gegen Ferroptose entwickelten (32). Neben der Einlagerung von Eisen in Ferritin (33), könnte somit auch Ferroportin zur Reduktion toxischer Fe^{2+} -Spiegel beitragen. Außerdem können Krebszellen auch anti-oxidative Schutzmechanismen heraufregulieren. Coenzym Q10 (Ubichinon) und die reduzierte Variante Ubichinol ist für die intrazelluläre Beseitigung von ROS bekannt (13). Bebbler et al. erwähnen zudem das Ferroptose-Suppressorprotein 1 (FSP1), dessen Ausprägung in Lungenkrebszellen mit der Resistenz gegen Ferroptose korrelierte (34). Auch eine erhöhte Menge an Glutathion kann vor oxidativen Stress schützen (34). Die Zellen haben also die Möglichkeit die Spiegel an reaktivem Fe^{2+} durch Komplexierung in der Zelle, oder durch Export aus der Zelle zu senken, oder die durch reaktives Fe^{2+} erzeugten ROS zu inaktivieren und damit den Effekt der Ferroptose zu reduzieren (**Abb. 10**).

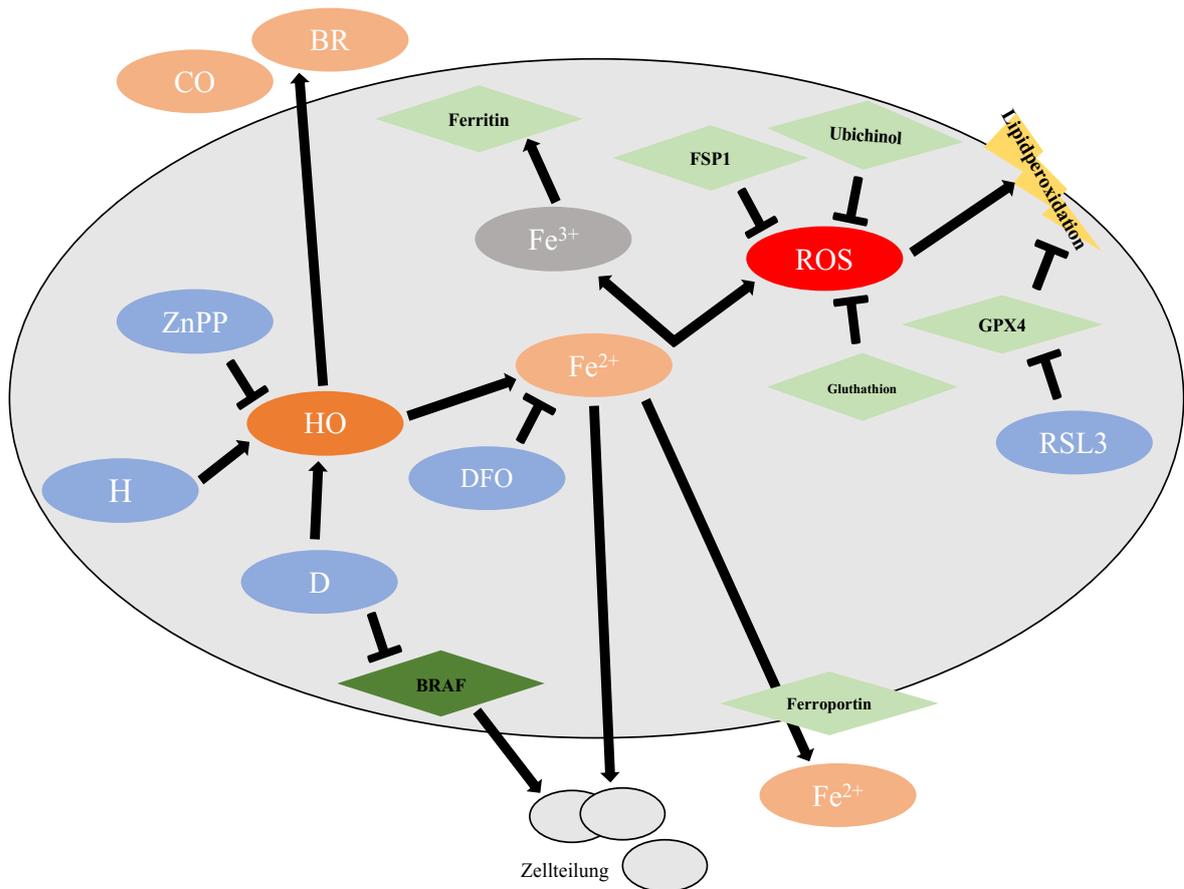


Abb. 10: Zusammenfassende Darstellung der eisenmodulierenden Substanzen und deren Metabolisierung in der Zelle. Die eisenmodulierenden Substanzen (hellblau) hemmen oder fördern direkt oder indirekt die Lipidperoxidation (gelb). Die Behandlung der Zellen mit D oder H führen zu einer Steigerung der HO-Aktivität. Von den dabei gebildeten Stoffwechselprodukten (CO, BR und Fe^{2+} , hellorange) führt die intrazelluläre Ansammlung von Fe^{2+} durch Oxidation zur Bildung von ROS (rot) und Fe^{3+} (grau). ROS fördern die Lipidperoxidation in Zellmembranen, welche zum Zelltod führt. Der Fe^{2+} -Pool der Zelle ist jedoch auch direkt an der Zellteilung beteiligt. ZnPP hemmt direkt die HO, der Chelatbildner DFO bindet das freigesetzte Fe^{2+} . Die Zelle besitzt Enzyme und Proteinsysteme (grün), welche das Eisen entweder direkt in der Zelle binden (Ferritin), aus der Zelle transportieren (Ferroportin), anti-oxidativ wirken (FSP1, Ubichinol, Glutathion) oder direkt oxidierte Lipide reduzieren können (GPX4). Die Rolle der HO-Reaktionsprodukte CO und BR, welche zum großen Teil aus der Zelle transportiert werden, wurde in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt. Die Hauptaufgabe des BRAFi D ist die Hemmung des Proteins BRAF (dunkelgrün), wodurch die Zellteilung reduziert wird. Der Ferroptose-Aktivator RSL3 hemmt GPX4 und unterbindet in weiterer Folge die Reduktion der oxidierten Lipide.

4.6 Kombinationsversuch

Die Behandlung der Zellen mit möglichen Ferroptose-Induktoren und D sollte aufzeigen, ob die Kombination den Zellen einen höheren Schaden zufügen kann, als die Summe beider Einzelsubstanzen allein, d.h. ob ein synergistischer Effekt beobachtet werden konnte. Es wurde durch die Kombination die Zellzahl jedoch weniger reduziert, als in Summe durch die Einzelsubstanzen. Somit wurde kein synergistischer Effekt beobachtet, sondern bestenfalls ein additiver. Bei den M1 Zellen zeigte sich nur eine tendenziell abgeschwächte Toxizität, bei den M4 Zellen war dieser Effekt stärker ausgeprägt. Obwohl durch die D-Behandlung und die dadurch erhöhte HO-Aktivität auch die Fe^{2+} -Spiegel erhöht sein müssten, waren diese Zellen weniger empfindlich auf eine Induktion der Ferroptose, als sie es ohne die gleichzeitige Behandlung mit D wären. Somit können die zwar wenigen, aber dennoch überlebenden Zellen, offenbar besser mit dem freigesetzten Fe^{2+} umgehen. Die Kombination kann damit noch schneller auf überlebende Zellen selektieren, welche eventuell auch aggressiver sein könnten. Es ist möglich, dass die erhöhte HO-Aktivität oder die Bedingungen, die zu einer Erhöhung der HO-1 Expression geführt haben, auch andere anti-oxidative Schutzmechanismen aktivieren, die auch vor Ferroptose schützen können, wie in einigen Krebszellen gezeigt wurde (27). Dies suggeriert, dass dieser Mechanismus auch in den getesteten Melanomzellen funktioniert, da entgegen unserer Vermutung die Erhöhung der HO-Aktivität nicht zu einer größeren Empfindlichkeit gegen Ferroptose geführt hat. Diese Schutzmechanismen könnten sogar durch das freigesetzte Fe^{2+} selbst induziert worden sein, wie z.B. ein erhöhter Eisenexport über Ferroportin. Möglicherweise könnte eine Hemmung der HO diese Schutzmechanismen ausschalten. Furfaro et al. konnten zeigen, dass die Kombination von Vemurafenib und einem HO-Hemmer signifikant die Zellzahl reduzierte (5). Ob unter diesen Umständen eine zusätzliche Ferroptose-Induktion Sinn hätte, ist nicht klar, da man davon ausgehen muss, dass zumindest der Anteil, der das dazu benötigte Fe^{2+} aus der HO-Reaktion beisteuert, nicht mehr vorhanden ist.

Jedenfalls sollte in weiteren Versuchen D in Kombination mit z.B. ZnPP und RSL3 getestet werden, um möglichst viele der induzierten Schutzmechanismen auszuhebeln.

4.7 Ausblick und Conclusio

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass die HO auf jeden Fall in den Tumorzellen eine große Rolle spielt und daher therapeutische Maßnahmen, die auf dieses Enzym und dessen

Aktivität abzielen, in der Therapie eingesetzt werden sollten. Unsere Daten zeigen, dass die Kombination von D mit dem Ferroptose-Induktor RSL3 mehr Zellen trifft, als die Einzeltherapeutika. Jedoch konnte offenbar das Fe^{2+} aus der HO-Aktivität nicht uneingeschränkt für die Ferroptose-Induktion genutzt werden und es ist nicht auszuschließen, dass die überlebenden Zellen potenziell aggressiver sind. Unsere Daten zeigen jedenfalls, dass die methodischen Voraussetzungen geeignet sind, um Wirkstoff-Kombinationen zu finden, die synergistische Effekte erzielen, die nachhaltig die Zellteilung unterdrücken, ohne zu einer Resistenzentwicklung beizutragen.

5. Literaturverzeichnis

1. Talty R, Bosenberg M. The role of ferroptosis in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Research*. 2022;35(1):18–25.
2. Charles J, Martel C, De Fraipont F, Leccia MT, Robert C, Busser B. Mechanisms of resistance to anti-BRAF treatments. *Ann Dermatol Venereol*. 2014;141(11):671–81.
3. Tsoi J, Robert L, Paraiso K, Galvan C, Sheu KM, Lay J, u. a. Multi-stage Differentiation Defines Melanoma Subtypes with Differential Vulnerability to Drug-Induced Iron-Dependent Oxidative Stress. *Cancer Cell*. 2018;33(5):890–904.e5.
4. Radke J, Schumann E, Onken J, Koll R, Acker G, Bodnar B, u. a. Decoding molecular programs in melanoma brain metastases. *Nat Commun*. 2022;13(1): 7304.
5. Furfaro AL, Loi G, Ivaldo C, Passalacqua M, Pietra G, Mann GE, u. a. HO-1 Limits the Efficacy of Vemurafenib/PLX4032 in BRAFV600E Mutated Melanoma Cells Adapted to Physiological Normoxia or Hypoxia. *Antioxidants*. 2022;11(6):1171.
6. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal Heme Oxygenase. *Journal of Biological Chemistry*. 1969;244(23):6388–94.
7. Duvigneau JC, Esterbauer H, Kozlov A V. Role of heme oxygenase as a modulator of heme-mediated pathways. *Antioxidants*. 2019;8(10):475.
8. Müllebner A, Moldzio R, Redl H, Kozlov A V, Duvigneau JC. The Intracellular Fate of Heme Oxygenase Products Determined by an Optimized HO-Assay. *Biomolecules*. 2015;5:1–12.
9. Suttner DM, Dennery PA. Reversal of HO-1 related cytoprotection with increased expression is due to reactive iron. *The FASEB Journal*. Oktober 1999;13(13):1800–9.
10. Was H, Cichon T, Smolarczyk R, Rudnicka D, Stopa M, Chevalier C, u. a. Overexpression of heme oxygenase-1 in murine melanoma: Increased proliferation and viability of tumor cells, decreased survival of mice. *American Journal of Pathology*. 2006;169(6):2181–98.

11. Stockwell BR, Jiang X. The Chemistry and Biology of Ferroptosis. *Cell Chemical Biol.* 2020;27(4):365–75.
12. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, u. a. Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* 2012;149(5):1060–72.
13. Wang L, Chen X, Yan C. Ferroptosis: An emerging therapeutic opportunity for cancer. *Genes Dis.* 2022;9(2):334–46.
14. Lorenz S, Conrad M. Ferroptose: Tod durch Eisenabhängige Lipidperoxidation. *BioSpektrum.* 2019;25(6):614–6.
15. Mbah NE, Lyssiotis CA. Metabolic regulation of ferroptosis in the tumor microenvironment. *Journal of Biological Chemistry.* 2022;298(3):101617.
16. Mense SM, Zhang L. Heme: A versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases. *Cell Res.* August 2006;16(8):681–92.
17. Sahoo SK, Sawa T, Fang J, Tanaka S, Miyamoto Y, Akaike T, u. a. Pegylated zinc protoporphyrin: A water-soluble heme oxygenase inhibitor with tumor-targeting capacity. *Bioconjug. Chem.* 2002;13(5):1031–8.
18. Dayani PN, Bishop MC, Black K, Zeltzer PM. Desferoxamine (DFO)-mediated iron chelation: rationale for a novel approach to therapy for brain cancer. *Journal of Neurooncol.* 2004;67:367–77.
19. Wu W, Geng Z, Bai H, Liu T, Zhang B. Ammonium ferric citrate induced ferroptosis in non-small-cell lung carcinoma through the inhibition of GPX4-GSS/GSR-GGT axis activity. *Int. Journal of Med. Sci.* 2021;18(8):1899–909.
20. Sui X, Zhang R, Liu S, Duan T, Zhai L, Zhang M, u. a. RSL3 drives ferroptosis through GPX4 inactivation and ros production in colorectal cancer. *Front Pharmacol.* 2018;9:1371

21. Isani G, Bertocchi M, Andreani G, Farruggia G, Cappadone C, Salaroli R, u. a. Cytotoxic Effects of *Artemisia annua* L. And pure artemisinin on the D-17 canine osteosarcoma cell line. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 19(1):1615758.
22. Saeed M, Breuer E, Hegazy M, Efferth T. Retrospective study of small pet tumors treated with *Artemisia annua* and iron. *Int. Journal of Oncol.* 2020;56(1):123–38.
23. Müllebner A, Moldzio R, Redl H, Kozlov A V., Duvigneau JC. Heme degradation by heme oxygenase protects mitochondria but induces ER stress via formed bilirubin. *Biomolecules.* 30. April 2015;5(2):679–701.
24. Ross RL, Mavria G, Del Galdo F, Elies J. Downregulation of Vascular Hemeoxygenase-1 Leads to Vasculopathy in Systemic Sclerosis. *Front Physiol.* 2022;13:900631.
25. Pourcelot E, Lénon M, Mobilia N, Cahn JY, Arnaud J, Fanchon E, u. a. Iron for proliferation of cell lines and hematopoietic progenitors: Nailing down the intracellular functional iron concentration. *Biochimica Biophysica Acta Mol. Cell Res.* 2015;1853(7):1596–605.
26. Warenits AM, Hatami J, Müllebner A, Ettl F, Teubenbacher U, Magnet IAM, u. a. Motor Cortex and Hippocampus Display Decreased Heme Oxygenase Activity 2 Weeks After Ventricular Fibrillation Cardiac Arrest in Rats. *Front Med (Lausanne).* 2020;7:513.
27. Chiang SK, Chen SE, Chang LC. A dual role of heme oxygenase-1 in cancer cells. *Int. Journal of Mol. Sci.* 2019;20(1):39–48.
28. Luu Hoang KN, Anstee JE, Arnold JN. The Diverse Roles of Heme Oxygenase-1 in Tumor Progression. *Front Immunol.* 2021;12:658315.
29. Kapitulnik J, Maines MD. Pleiotropic functions of biliverdin reductase: cellular signaling and generation of cytoprotective and cytotoxic bilirubin. *Trends Pharmacological Sci.* 2009;30(3):129–37.
30. Brouard S, Otterbein LE, Anrather J, Tobiasch E, Bach FH, Choi AMK, u. a. Carbon Monoxide Generated by Heme Oxygenase 1 Suppresses Endothelial Cell Apoptosis. *Journal of Exp. Med.* 2000;192(7):1015–26.

31. Kwon MY, Park E, Lee SJ, Chung SW. Heme oxygenase-1 accelerates erastin-induced ferroptotic cell death. *Oncotarget*. 2015;6(27):24393–403.
32. Li Y, Zeng X, Lu D, Yin M, Shan M, Gao Y. Erastin induces ferroptosis via ferroportin-mediated iron accumulation in endometriosis. *Human Reproduction*. 2021;36(4):951–64.
33. Tsuji Y, Ayaki H, Whitman SP, Morrow CS, Torti S V, Torti FM. Coordinate Transcriptional and Translational Regulation of Ferritin in Response to Oxidative Stress. *Mol Cell Biol*. 2000;20(16):5818–27.
34. Bebbler CM, Müller F, Clemente LP, Weber J, von Karstedt S. Ferroptosis in cancer cell biology. *Cancers (Basel)*. 2020;12(1):164–88.

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung des experimentellen Aufbaus zur Bestimmung der Dosis-Wirkungsbeziehung verschiedener Modulatoren der intrazellulären Eisen-Spiegel sowie zur Bestimmung der <i>in situ</i> HO-Aktivität von Melanomzellen der Linien BMC1-M1 und BMC1-M4.....	9
Abb. 2: Beispiel zur Bestimmung der Zellteilungsrate aus den ermittelten Zelldichten (IncuCyte [®])	14
Abb. 3: Darstellung der Korrelation zwischen Kristallviolett ZZÄ und Konfluenzwerte der BMC1-M1 und BMC1-M4 Zellen	19
Abb. 4: Vergleich der Dosis-Wirkungs-Beziehungen der Eisen-Spiegel modulierenden Substanzen in BMC1-M1 und BMC1-M4 Zellen	21
Abb. 5: Ermittlung der <i>in situ</i> HO-Aktivitäten in BMC1-M1 und BMC1-M4 Zellen nach Behandlung mit Eisen-Spiegel modulierenden Substanzen	23
Abb. 6: Darstellung des Dabrafenib-Effekts auf die Zellzahl nach 72 h Inkubation im Vergleich zur Kontrolle.....	24
Abb. 7: Darstellung des Dabrafenib-Effekts auf die <i>in situ</i> HO-Aktivität im Vergleich zur Kontrolle (Vehikel).....	25
Abb. 8: Vergleich des Effekts der Eisen-Spiegel modulierenden Substanzen in Kombination mit Dabrafenib auf die Zellzahl von BMC1-M1 und BMC1-M4 Zellen	26
Abb. 9: Ermittlung der <i>in situ</i> HO-Aktivitäten in BMC1-M1 und BMC1-M4 Zellen nach Behandlung mit Eisen-Spiegel modulierenden Substanzen in Kombination mit Dabrafenib..	27
Abb. 10: Zusammenfassende Darstellung der eisenmodulierenden Substanzen und deren Metabolisierung in der Zelle.....	35