

Aus dem Department für Biomedizinische Wissenschaften  
der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Institut für Medizinische Biochemie  
(Leiter: Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Florian Grebien)

Diplomarbeit

## **Bestimmung der Hämoxygenase Aktivität in BMC1 Melanoma Zellen**

Veterinärmedizinische Universität Wien

vorgelegt von

Lena Fierthner, Bsc.

Wien, im Juni 2023

Betreuerin: Dipl.-Biol. Dr.rer.nat. Catharina Duvigneau

Institut für Medizinische Biochemie

Department für Biomedizinische Wissenschaften

Veterinärmedizinische Universität Wien

BegutachterIn: Dr.rer.nat. Torben Redmer

## **Danksagung**

Ich möchte mich vor allem bei Frau Dipl.-Biol. Dr.rer.nat.Catharina Duvigneau für die kompetente und herzliche Betreuung entlang des Entstehungsprozesses dieser Arbeit bedanken. Egal ob im Labor oder beim Schreiben der Arbeit, ich stieß bei Frau Dipl.-Biol. Dr.rer.nat.Catharina Duvigneau auf ein offenes Ohr und konnte mich immer auf ihre Hilfe und rasche Korrekturen verlassen. Vielen Dank dafür!

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich beim Schreiben dieser Arbeit stets unterstützt haben.

## Inhalt

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1.     | Einleitung .....  | 1  |
| 1.1.   | Hämoxygenase .....  | 1  |
| 1.1.1. | HO1.....  | 3  |
| 1.1.2. | HO2.....  | 3  |
| 1.2.   | BRAF V600 Mutation.....   | 4  |
| 1.3.   | Vemurafenib.....  | 5  |
| 1.4.   | BMC1 .....  | 7  |
| 2.     | Fragestellung und Hypothese.....  | 8  |
| 2.1.   | Hypothese .....   | 8  |
| 3.     | Material und Methoden.....  | 9  |
| 3.1.   | Vorbehandlung der Zellen .....  | 9  |
| 3.2.   | Herstellung des Zellhomogenats .....  | 10 |
| 3.3.   | Bestimmung der HO-Aktivität .....   | 11 |
| 3.3.1. | Vorversuch mit MeWo- Zellen .....   | 11 |
| 3.3.2. | Hämoxygenase Assay.....   | 12 |
| 3.3.3. | Photometrische Bestimmung der Bilirubinmenge .....                          | 14 |
| 3.3.4. | Auswertung der Bilirubin Konzentration.....                                 | 14 |
| 3.4.   | Bradford Proteinbestimmung.....   | 15 |
| 3.5.   | Statistische Auswertung und Datenverarbeitung .....                         | 16 |
| 4.     | Ergebnisse .....  | 17 |
| 4.1.   | Qualitätskontrolle.....   | 17 |
| 4.2.   | HO-Aktivität in Vemurafenib behandelten BMC1 Zellen nach 6,24 und 48h ..... | 18 |
| 5.     | Diskussion.....   | 21 |
| 6.     | Conclusio .....   | 24 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 7.    | Zusammenfassung .....                   | 25 |
| 8.    | Summary .....                           | 27 |
| 9.    | Literaturverzeichnis .....              | 29 |
| 10.   | Abbildungs- und Quellenverzeichnis..... | 33 |
| 10.1. | Tabellen .....                          | 33 |
| 10.2. | Abbildungen .....                       | 33 |

## Abkürzungen

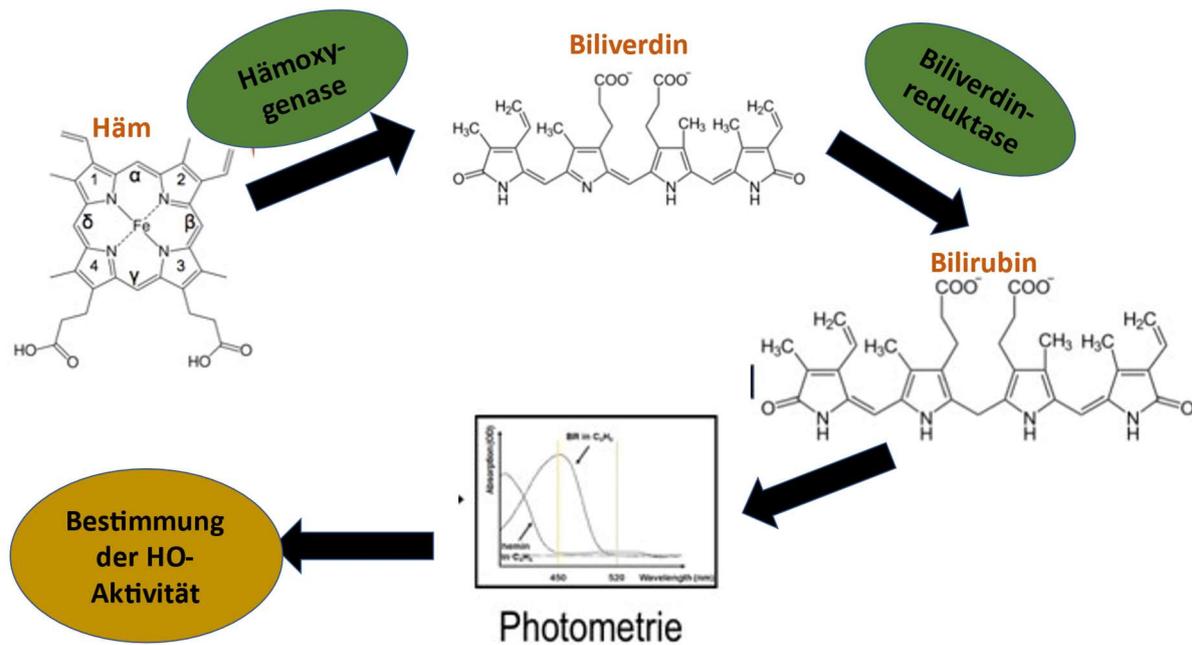
|       |                                      |
|-------|--------------------------------------|
| Abb.  | Abbildung                            |
| BMC1  | BrainMetastasisCell                  |
| BR    | Bilirubin                            |
| BRAFi | BRAF Inhibitoren                     |
| BV    | Biliverdin                           |
| BVR   | Biliverdinreduktase                  |
| CO    | Kohlenmonoxid                        |
| DFO   | Deferoxamin                          |
| DMSO  | Dimethylsulfoxid                     |
| Häm   | Hämin                                |
| HO    | Hämoxygenase                         |
| KCl   | Kaliumchlorid                        |
| NADPH | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat |
| OD    | optische Dichte, Extinktion          |
| RLS   | Ratten Leber Zytosolischer Überstand |
| SD    | Standardabweichung                   |
| SEM   | Standardfehler                       |
| VEGF  | Vascular Endothelial Growth Factor   |
| Vem   | Vemurafenib                          |

## 1. Einleitung

Kutane Melanome zählen zu den weltweit am häufigsten auftretenden Tumoren. 2020 wurden ca. 325 000 neue Fälle registriert mit einer jährlich steigenden Tendenz (Arnold et al. 2022). Obwohl Melanome nur ca. 3-5% aller Hautkrebse ausmachen, sind sie für 75% der durch Hautkrebs verursachten Todesfälle verantwortlich. Durch ihr hohes Potential zu metastasieren, stellen sie eine besondere Gefahr dar (Rastrelli et al. 2014). Ein häufig beschriebenes Problem bei der Behandlung und Prognose von Melanomen, sind Gehirnmetastasen, da Melanome nicht nur auf lymphatischen, sondern auch über hämatogenem Weg metastasieren und so über die Blut- Hirn Schranke in das Gehirn streuen können (Chiarion-Sileni et al. 2003, Radke et al. 2022). 20-40% der Melanoma Patienten entwickeln solche sogenannten Melanoma Brain Metastasen (MBM), die die Überlebenschance drastisch senken, in post mortem Untersuchungen konnte sogar eine Prävalenz von 73-90% festgestellt werden (Radke et al. 2022). Das Entstehen solcher MBMs scheint durch einige Parameter, wie etwa das Vorhandensein von onkogenen BRAF-V600 Mutationen in Zellen, begünstigt zu werden. Neuere Forschungen und Behandlungsmethoden setzen daher unter anderem an der Inhibition der BRAF-Mutationen an, um die Metastasierung zu unterdrücken. Dazu werden bereits BRAF- Inhibitoren (BRAFi) wie Vemurafenib in der Krebstherapie eingesetzt. Damit die Melanoma Zellen metastasieren können, muss das körpereigene Immunsystem übergangen werden und eine Gefäßversorgung sichergestellt sein. Dabei spielt unter anderem auch das Enzym Hämoxygenase (HO), insbesondere die induzierbare Isoform Hämoxygenase-1(HO-1), eine elementare Rolle als zytoprotektives Enzym (Grochot-Przeczek et al. 2014, Redmer 2018).

### 1.1. Hämoxygenase

Hämoxygenase (HO) ist ein in Zellen von Säugetieren vorkommendes Enzym, das den oxidativen Abbau von Häm zu Biliverdin (BV), Eisen und Kohlenstoffmonoxid (CO) katalysiert (Maines 2001). Biliverdin wird in weiterer Folge durch das Enzym Biliverdinreduktase (BVR) zu Bilirubin abgebaut (siehe Abb.1), welches durch Galle und Urin ausgeschieden wird.



**Abbildung 1** Darstellung der enzymatischen Schritte für die Bestimmung der *in vitro* Hämoxigenase Aktivität. Im Zellhomogenat wird das Substrat Häm unter Zusatz von NADPH und in Anwesenheit von  $\text{O}_2$  mit Hilfe der zellulären Hämoxigenase (HO) zu Biliverdin degradiert, welches durch die Aktivität der zellulären Biliverdinreduktase (BVR) zu Bilirubin (BR) abgebaut wird. BR kann durch Photometrie quantifiziert werden und so Rückschluss auf die im Zellhomogenat vorhandene HO-Aktivität liefern.

Die Abbauprodukte von Häm durch HO sind wichtige Faktoren für die weitere Regulation von oxidativem Stress. CO kann etwa als Neurotransmitter fungieren und Immunantworten regulieren, Bilirubin konnten antioxidative und antiinflammatorische Eigenschaften nachgewiesen werden. HO hat somit großen Einfluss auf Häm medierte Signalwege und beeinflusst durch ihre Abbauprodukte Zellproliferation, Entzündungsgeschehen und die Abwehr von oxidativem Stress. Es wird jedoch vermutet, dass die erhöhte Bildung des Enzyms auch neurotoxische Wirkungen hat. Das durch den Hämabbau entstandene Eisen kann in Situationen von Hypoxie und Ischämie selbst oxidativen Stress und Neurodegeneration auslösen (Duvigneau et al. 2019).

HO ist in zwei Isoformen bekannt, Hämoxigenase 1 (HO1) und Hämoxigenase 2 (HO2). Während die konstitutive Form HO2 in jeder Zelle aktiv ist und im neuronalen Gewebe die höchste Aktivität aufweist, ist die induzierbare Form HO1, mit Ausnahme einiger Zelltypen, unter physiologischen Bedingungen nicht aktiv. Sie kann durch verschiedene pathologische Faktoren induziert werden (Consoli et al. 2021). Viele Tumortypen weisen eine erhöhte Expression der HO auf, und es wird angenommen, dass die Tumorzellen von den schützenden Eigenschaften der HO-Produkte profitieren (Jozkowicz et al. 2007). In kultivierten Zellen einer Melanom-Linie konnte außerdem gezeigt werden, dass das Silencing der HO-1 zu einer verstärkten Hemmung der Zellteilung durch Vemurafenib führt (Furfaro et al. 2020). Ob BRAFi

in der Lage sind auch die HO-Aktivität zu modulieren ist aber nicht bekannt. Unklar ist auch, durch welchen Mechanismus manche Melanome eine Resistenz gegenüber BRAFi ausbilden können. Es ist denkbar, dass dies über eine kompensatorische Erhöhung der HO-Aktivität durch die langanhaltende Behandlung mit den BRAFi erzielt wird.

### **1.1.1.HO1**

HO1 stellt die induzierbare Form der HO dar. Veränderungen im Zellmilieu, im Sinne von Zellstress, können zu einer vermehrten oder verminderten Ausschüttung der HO1 führen. Obwohl das Enzym zytoprotektive Eigenschaften besitzt, Entzündungsantworten moduliert und den hämostatischen Eisenhaushalt reguliert, konnte in Studien bewiesen werden, dass die Expression von HO1 bei der Pathogenese einiger Krankheiten eine Rolle spielen und eine vermehrte Ausschüttung paradoxerweise zelltoxisch wirken kann. So konnte unter anderem bei der Entstehung von Tumoren, kardiovaskulären und neurodegenerativen Krankheiten eine Veränderung der HO1-Expression festgestellt werden (Costa Silva und Correa 2022, Jozkowicz et al. 2007). Welchen Einfluss HO1 auf die Entstehung solcher Krankheiten hat, hängt auch von den involvierten Zellarten, Stadium der Krankheit und den zugrundeliegenden molekularen Mechanismen ab. Unter anderem wird der bei der Tumorentstehung involvierte Eisen- und Lipidperoxid-abhängige Zelltod, die sogenannte Ferroptose, möglicherweise durch HO1 beeinflusst. Zudem werden durch HO1 vermehrt vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren (VEGF) exprimiert, die zur Bildung von neuen Blutgefäßen in Tumoren beitragen. Durch diese Angiogenese wird das Wachstum von Tumoren, die Verteilung von Krebszellen und somit Metastasierung beschleunigt (Chiang et al. 2018, Duvigneau et al. 2019, Grochot-Przeczek et al. 2014). Begünstigt wird die Angiogenese unter anderem auch durch CO, einem der Abbauprodukte der HO. Des Weiteren trägt CO auch zu Vasodilatation und Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie VEGF bei. Die Hemmung der HO-Aktivität und somit auch ihrer Abbauprodukte könnte in der Krebstherapie neue Wege öffnen (Ryter et al. 2006).

### **1.1.2.HO2**

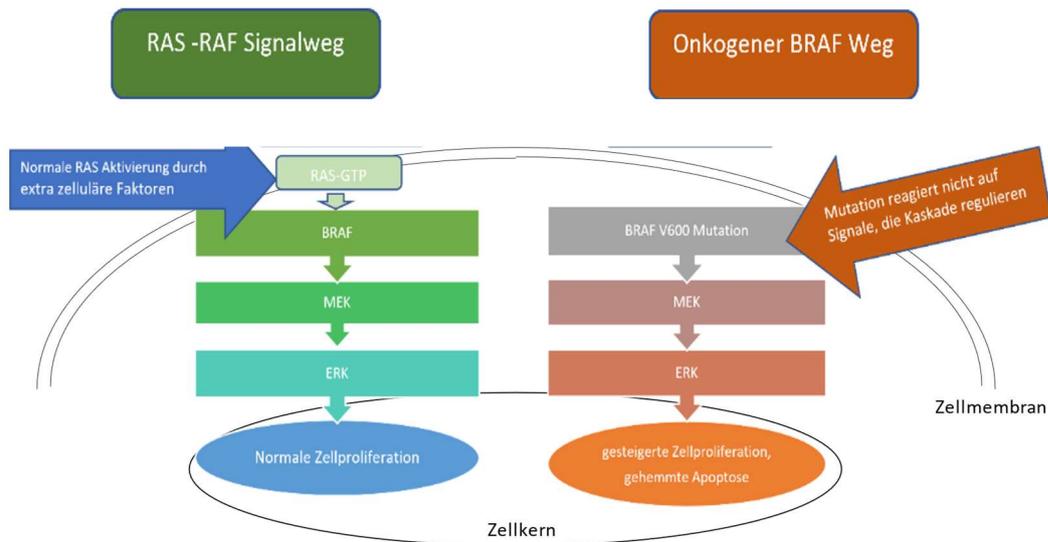
HO2 ist generell weniger erforscht als HO1. Es ist die konstitutive Isoform der HO und kommt im neuronalen Gewebe, Hoden und cerebralen Blutgefäßen vor. Dort fungiert das aus der HO Reaktion freigesetzte CO als Neurotransmitter, moduliert die neuronale Aktivität, kann Blutdruck und Gefäßtonus regulieren (Intagliata et al. 2019, Muñoz-Sánchez und Chánez-Cárdenas 2014). Die Rolle der HO2 in der Krebsentstehung ist noch weniger erforscht als die der HO1. In Studien konnte aber ein Zusammenhang zwischen dem Wachstum und der Proteinmenge von HO2 in Prostatakrebszellen nachgewiesen werden. Eine vermehrte

Expression in Krebszellen führte zu vermindertem Zellwachstum, während eine verringerte Expression vermehrten Wachstum verzeichnete. (Intagliata et al. 2019) Es liegt somit nahe, dass HO2 möglicherweise eine antitumorgene Wirkung besitzt.

Da beide Isoformen der HO zur katalytischen Aktivität beitragen und nur durch weitere Versuche, wie etwa PCR unterschieden werden können, wird für die durchgeführten Versuche zur HO-Aktivität im weiteren Verlauf nur von HO gesprochen.

## **1.2. BRAF V600 Mutation**

Tumore entstehen durch verschiedenste Genmutationen in Zellen, die physiologische Zellabläufe wie Proliferation, Differenzierung und Zelltod verändern. Eine der häufigsten Mutationen, die für Entstehung von Melanomen verantwortlich ist, stellt die BRAFV 600 Mutation dar. Die BRAF-Mutation ist eine Mutation entlang des RAS-RAF-MEK-ERK-MAP Kinase Signalwegs, der Signale von der Oberfläche einer Zelle in die DNS im Nukleus kommuniziert und somit Wachstumsfaktoren steuert. BRAF-Gene codieren üblicherweise BRAF-Proteine, zytoplasmatische Serin/Threonin-Kinasen, die wichtiger Bestandteil dieser Signalkaskade sind. Entsteht eine Punktmutation am BRAF-Gen, meist am Codon V600E oder V600K, wird Valin durch Glutaminsäure substituiert, wodurch die Mutation phosphomimetisch wird und BRAF nicht mehr inhibiert wird (Davies et al. 2002, Redmer 2018). Die übermäßige Basalaktivität führt dazu, dass das mutierte Protein onkogen wirkt. Der zugrundeliegende Mechanismus wird in Abb.2 vereinfacht dargestellt. Die onkogenen Mutationen neigen zu Insensibilität von negativen Feedbacks, verhindern Apoptose, fördern die Angiogenese, Gewebsinfiltration und somit die Metastasierung von Tumoren (Ascierto et al. 2012).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Wirkung der BRAF V600 Mutation entlang des RAS-RAF-MEK-ERK-MAP-Signalweges.**

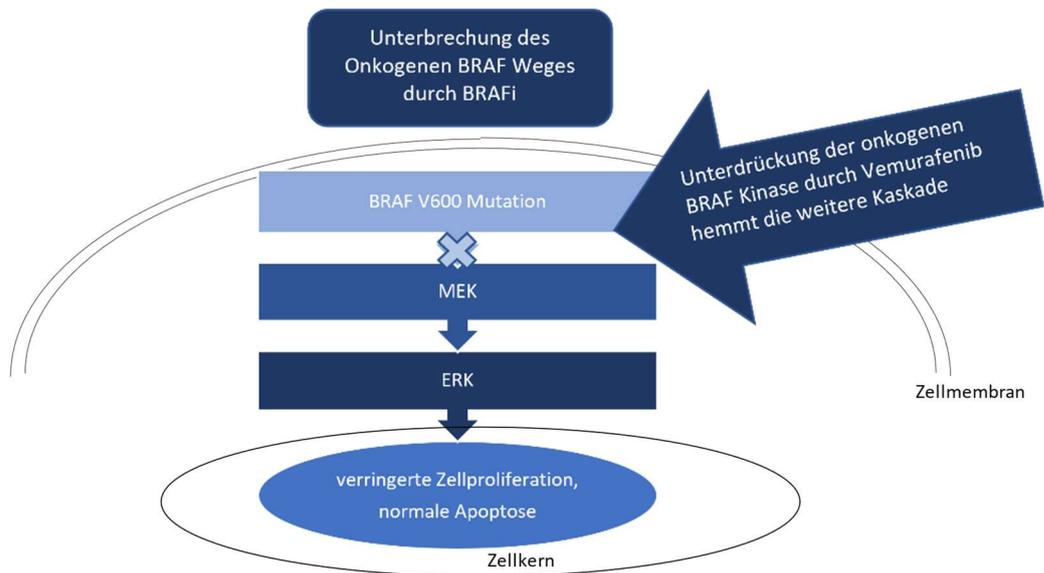
Die Darstellung zeigt den physiologischen (links) Signalweg von RAS-RAF im Vergleich zur onkogenen, konstitutiven Aktivierung (rechts). Durch extrazelluläre Wachstumsfaktoren wird nach Rezeptorinteraktion (RAS-GTP) die Kaskade stimuliert, die vom BRAF Gen codierte BRAF-Kinase ist nur transient aktiv und wird nach Unterbleiben des Rezeptorsignals inhibiert, und trägt daher zur geregelten Zellproliferation bei. Tritt hingegen eine Mutation am BRAF-Gen auf (Abb. rechts), verliert die mutierte Kinase ihre hemmbaren Eigenschaften. Die Mutation reagiert nicht auf Signale entlang der Kaskade was wiederum zu einer gesteigerten Zellproliferation und gehemmter Apoptose führt und hat somit onkogene Auswirkungen. Abk.: RAS- Rat Sarcoma Virus, RAF- Rapidly accelerated fibrosarcoma, GTP- Guanosinriphosphat, MEK- Mitogen-activated protein kinase, ERK- Extracellular-signal-regulated kinase

BRAF-Mutationen konnten bislang in ca. 60 % aller bösartigen Melanome beim Menschen festgestellt werden und konnten auch in bis zu 8% aller anderen humanen Tumore wie Gliomen, Schilddrüsentumoren und Cholangiokarzinomen nachgewiesen werden (Davies et al. 2002). Speziell auf diese Mutation ausgerichtete BRAF-Inhibitoren wie Vemurafenib bieten neue Ansätze zur Tumorbehandlung und zeigen vielversprechende Resultate. Vorab ist jedoch eine Untersuchung auf das Vorhandensein der Mutation ist mittels DANN Sequenzierung aus Tumormaterial notwendig (Halle und Johnson 2021)

### 1.3. Vemurafenib

Vemurafenib ist ein in der Krebstherapie angewandtes Medikament, mit dem Tumore mit einer BRAF V600 Genmutation behandelt werden können. Es zielt auf die durch die BRAF-Mutation konstitutiv aktivierte Form der BRAF Serin/Threonin Kinase im RAS/RAF/MEK Signalweg ab und wirkt so als BRAF-Inhibitor (BRAFi) (siehe Abb.3). Die Unterbrechung im Signalweg hemmt Wachstum und die Metastasierung der Tumorzellen (Kim und Cohen 2016). Die Erfolgsrate der Therapie mit Vemurafenib liegt bei ca.50-60 %. Manche Patienten zeigen sogar eine komplette Remission der Tumore. Vor allem für inoperable Gehirntumore stellt

Vemurafenib somit eine erfolgsversprechende Therapiemöglichkeit dar (Sosman et al. 2012). Die zusätzliche Behandlung mit MEK-Inhibitoren, die an einem anderen Punkt der Signalkaskade ansetzen, und weiteren Chemotherapeutika kann den Erfolg der Therapie erhöhen (Gutzmer et al. 2020). Bei längerer Behandlung mit Vemurafenib wurden aber paradoxe Wirkungen und ein vermehrtes Wachstum der Metastasen beschrieben, weshalb davon auszugehen ist, dass sich nach einiger Zeit eine Resistenz gegenüber der BRAFi einstellt. Diese Resistenz konnte in Studien im Durchschnitt nach 6-7 Monaten nachgewiesen werden und kann durch die Aktivierung von alternativen Signalwegen oder anderen Mutationen entlang des Signalwegs entstehen (Sosman et al. 2012, Villanueva et al. 2013). Neben der Resistenz sind auch andere Nebenwirkungen durch Vemurafenib wie Übelkeit, Gelenkschmerzen und sekundäre kutane squamöse Karzinome beschrieben (McArthur et al. 2014). Bei der Entstehung von Chemoresistenzen wird vermutet, dass die HO-1, als Stress-induziertes Enzymsystem, eine wichtige Rolle spielt. Dass HO-1 zur Zellproliferation über den BRAF/ ERK Signalweg beiträgt, konnte von Liu et al. 2019 bereits gezeigt werden. Zur Aufklärung der Rolle der HO bei Entwicklung von Resistenzen gegen BRAFi, können *in vitro* Experimente mit Melanomazellen einen wichtigen Beitrag liefern. Dabei stehen Zellen zur Verfügung die vor oder nach Behandlung mit iBRAF aus Melanomen abgeleitet wurden (Radke et al. 2022).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Regulation der Kaskade unter Einfluss von BRAF-Inhibitoren**

Durch die Verabreichung von (BRAFi) wie Vemurafenib (Vem) wird die vermehrte Produktion der BRAF-Kinase durch die onkogene BRAF V600 Mutation unterdrückt. Folglich wird auch die Signalkaskade gehemmt, was zu einer Verringerung der Zellproliferation führt und somit den Tumorwachstum verlangsamen bzw. stoppen kann

#### **1.4. BMC1**

BMC1 Zellen (Brain Metastasis-derived Cell Line 1) sind Zellen, die aus einer Gehirnmastase eines Melanoma-Patienten gewonnen und *in vitro* angezüchtet und kultiviert wurden (Radke et al. 2022). In den folgenden Versuchen wurde mit dem Klon BMC1-M1 gearbeitet, die zuvor noch nicht mit BRAFi in Kontakt gekommen waren.

## **2. Fragestellung und Hypothese**

Ziel der Arbeit ist es, herauszufinden, ob die Behandlung von Melanoma abgeleiteten BMC1-M1 Zelllinien mit Vemurafenib zu einer Veränderung der HO-Aktivität führt. Außerdem soll herausgefunden werden, ob eine längerfristige Behandlung mit BRAFi zu kompensatorischen Effekten auf die HO-Aktivität führt und somit zur Ausbildung von Resistenzen gegen BRAFi beiträgt. Die dabei erarbeiteten Daten werden beitragen, Einblicke in die Rolle der HO bei der Tumorprogression zu erhalten und können darüber hinaus neue Wege in der Therapie BRAFi-resistenter Tumore zu eröffnen.

### **2.1. Hypothese**

Die Behandlung von Melanoma-abgeleiteten Zellen mit Vemurafenib führen akut zu einer messbaren Erniedrigung der HO-Aktivität. Nach längerfristiger Behandlung kommt es zu einer Wiederherstellung der ursprünglichen HO-Aktivität.

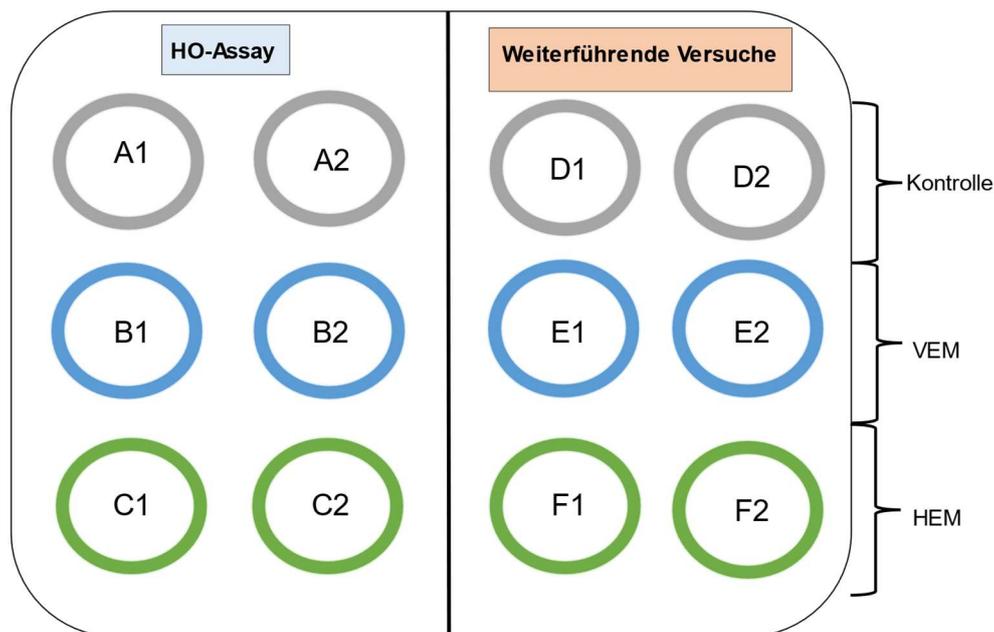
### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Vorbehandlung der Zellen

Für die Versuche im Rahmen der Diplomarbeit, wurde mit humanen BMC1-M1 Melanom Zellen gearbeitet. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium aus DMEM 4,5g/L Glucose, stabilisiertem (GlutaMax) oder konventionellem Glutamin, Pyruvat, 10% FBS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert und mit verschiedenen Zusätzen (Vem oder Häm) 6,24 oder 48h inkubiert anschließend geerntet und, wie in 3.3.2 und 3.3.3 beschrieben, ausgewertet. Dazu wurden 12 Well Platten mit  $10^5$  Zellen pro Well für die Experimente ausgesät. Nachdem die Zellen (siehe Schema) angesetzt wurden, wurden sie mit drei verschiedenen Medien behandelt. Es sollte untersucht werden, ob eine Behandlung der Zellen mit Vemurafenib ( $10^{\circ}\mu\text{M}$ ) zu einer messbaren Veränderung der HO-Aktivität in den Zellen führt. Als Vergleich werden die Zellen mit Hämin (1 mM) als Positivkontrolle und mit DMSO (Vehicle/Lösungsmittel für Vem &Häm) behandelt. Somit ergeben sich 3 Konditionen je Zeitpunkt. Je Platte wurden je 2 Wells pro Kondition, also Duplikate, ausgesetzt (siehe Abb.4). Parallel wurden auf denselben Platten Proben für eine Analyse der Genexpression/ Proteinexpression angesetzt. Die Auswertung dieser Proben ist jedoch nicht Teil dieser Diplomarbeit und wird daher nicht weiter an dieser Stelle ausgeführt. Nach der Behandlung mit den jeweiligen Zusätzen, wurden die Platten in einem Inkubator bei  $37^{\circ}\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  und 95%iger Luftfeuchtigkeit inkubiert. Insgesamt wurden 11 Platten mit diesen Konditionen, aber mit unterschiedlicher Dauer behandelt:

- 3 Platten zu 6h
- 5 Platten zu 24h
- 3 Platten zu 48h

Die Platten wurden immer sorgfältig beschriftet, exakt nach der vorgeschriebenen Zeitspanne aus dem Inkubator genommen und die Zellen geerntet. Dazu wurden die Inkubationsmedien abpipettiert und die jeweils linke Hälfte der Platte mit 250  $\mu\text{l}$  HO-Assay-Buffer aufgefüllt. Im Anschluss wurden die Platten bis zur weiteren Verwertung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.



**Abbildung 4: Aufbau der Well Platten**  
 Alle ausgewerteten Platten wurden wie in der Abbildung gezeigt mit Zellen belegt. Die linke Seite zeigt die Wells an, die für die Bestimmung der Hämoxygenase (HO) Aktivität verwendet wurden. Die Wells auf der rechten Seite, zeigen die Zellen an, die mit anderen Zusätzen für weiterführende Untersuchungen behandelt wurden.  
 Die einzelnen grauen Kreise zeigen die Zellen, denen DMSO (Kontrolle) zugefügt wurden, die blauen die mit Vemurafenib (Vem) behandelten, die grünen die mit Hämin (Häm). Die Buchstaben in den Kreisen verdeutlichen die Beschriftungen der einzelnen Wells für die weitere Verarbeitung im Experiment und spätere Auswertung. Für die Versuche im Zuge der Diplomarbeit wurden nur die Zellen der linken Seite verwendet

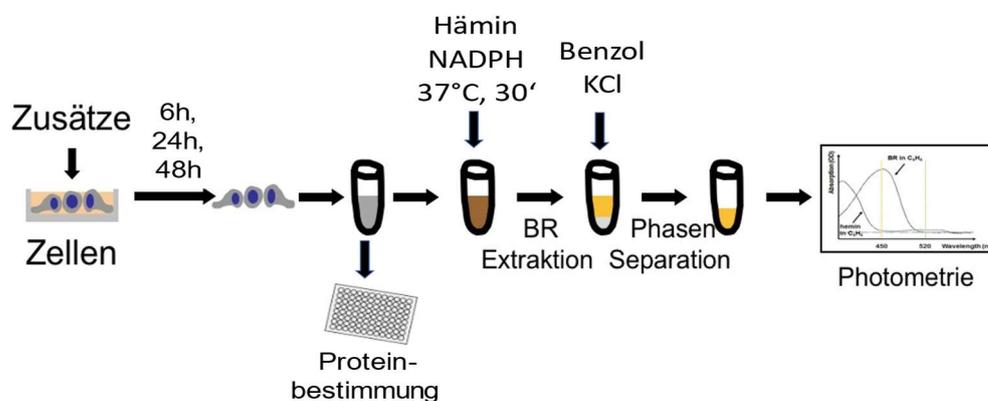
### 3.2. Herstellung des Zellhomogenats

Nachdem die Zellen, wie in 3.1. beschrieben, behandelt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren wurden, wurden sie in den Wells der Platten homogenisiert. Die Platten wurden dafür aus dem  $-80^{\circ}\text{C}$  Gefrierschank geholt und langsam auf Eis aufgetaut. Folgende Schritte wurden nach einem strikten Protokoll für alle Plattenhälften, die für die Bestimmung der HO-Aktivität vorhergesehen waren, gleich durchgeführt. Zunächst wurden in den einzelnen Wells durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren des Puffers die Zellen von der Platte gelöst und dabei homogenisiert. Hierbei wurde darauf geachtet, die Ränder und die Mitte des Wells gut benetzt wurden und möglichst wenig Schaum erzeugt wurde, um kein Probematerial zu verlieren. Unter optischer Kontrolle wurde das Auf- und Abpipettieren so oft wiederholt, bis eine homogene Suspension erhalten wurde, und keine Zellen am Boden haften geblieben waren. Das so gewonnene Homogenat wurde dann in beschriftete 1,5ml Reaktionsgefäße überführt. Die Wells wurden mit frischem  $70\mu\text{l}$  AB versetzt, die Wells damit gespült und die Spüllösung ebenfalls in die 1,5 ml verbracht, um auch die letzten Zellreste zu erwischen. Die

Reaktionsgefäße wurden in flüssigem Stickstoff Schockgefroren („snap frozen“) und bis zu Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

### 3.3. Bestimmung der HO-Aktivität

Für die Bestimmung der HO-Aktivität wurde mit den Zellhomogenaten ein gekoppelter HO-Assay durchgeführt. Der Assay liefert dabei eine Aussage über die Höhe der HO-Aktivität durch die Umwandlung von Häm zu BR, die im Photometer gemessen werden kann (vgl. Abb. 5). Um den Aufbau des Assays zu optimieren, wurden vorab noch Versuche an BMC1- verwandten MeWo-Melanomzellen durchgeführt.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Bestimmung der in vitro Hämoxygenase-Aktivität von kultivierten Zellen.** BMC1-M1 Zellen wurden in Anwesenheit verschiedener Zusätze für 6, 24 und 48h bei 37° C in 12-well Platten inkubiert. Die Zellen wurden wie in Abschnitt (3.2.) beschrieben geerntet und als Homogenat ( $10^5$  Zellen/Well) für die Durchführung des biochemischen Assays eingesetzt. Zum Assay wurden 4µl Häm (1mM<sup>o</sup> in DMSO) und 25µl NADPH (10<sup>o</sup>mM) zugefügt. Die Ansätze wurden für 30 Minuten bei 37° im Schüttelwasserbad inkubiert und anschließend das BR aus der wässrigen Phase in Benzol extrahiert (Verhältnis 1:5 vol:vol). Um die Separation der Phasen zu erleichtern, wurde gesättigte Kaliumchloridlösung (KCl, 20% der wässrigen Phase) zugesetzt und die Ansätze zentrifugiert (400g, 15 Minuten, RT) und die Benzolphase geerntet. Die Bilirubinmenge in den Extrakten wurde photometrisch, wie in Abschnitt XY beschrieben, quantifiziert. Quelle: Dipl.-Biol. Dr.rer.nat. Catharina Duvigneau

#### 3.3.1. Vorversuch mit MeWo- Zellen

Obwohl bekannt ist, dass der geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim Häm-Abbau die HO-Reaktion ist, muss doch sichergestellt sein, dass alles in der Reaktion entstehende Biliverdin vollständig in BR umgewandelt wird und die BVR-Aktivität also ausreichend hoch ist, um nicht limitierend zu wirken. Daher wurde zunächst überprüft, ob die im Homogenat vorhandene BVR alles von der HO produzierten Menge BV in BR bewerkstelligt. Dazu wurde die BVR-Aktivität

von MeWo-Zellen, einer von Melanomzellen abgeleitete Zelllinie, die in ihren Eigenschaften mit BMC1-M1 Zellen vergleichbar ist, vorab getestet. Für den Versuch wurden aus einer 6-Well Platte mit je  $10^5$  MeWo-Zellen/Well, zwei Pools (Well A-C und Well D-F) erstellt. Die Zellen wurden wie in 3.2. beschrieben, behandelt und das Zellhomogenat geerntet. Die Homogenate (110 $\mu$ l) der Pools wurden zu drei Konditionen in Duplikaten angesetzt. Zusätzlich wurde von jedem Pool eine Negativkontrolle erstellt. Anschließend wurden den Homogenaten der drei Konditionen folgende Zusätze zugeführt:

- Kondition 1: 4 $\mu$ l Hämin (1 $^{\circ}$ mM)
- Kondition 2: 4 $\mu$ l BV (10mM)
- Kondition 3: 4 $\mu$ l Hämin und 10 $\mu$ l BVR

Danach wurden die BR-Menge, wie in 3.3.3 beschrieben, photometrisch ausgewertet. Es zeigte sich, dass die BR-Menge unter Zufuhr von BVR und Häm nur ein wenig höher war als die BR-Menge der Gruppe der nur Häm zugefügt wurde. Für den HO-Assay, der für die BMC1 Zellen verwendet wurde, wurde daher standardmäßig 5 $\mu$ l exogene BVR-Aktivität zugesetzt, um eine vollständige Umwandlung des gebildeten BV zu ermöglichen.

### **3.3.2. Hämoxygenase Assay**

Die Durchführung des Assays erfolgt immer nach dem gleichen, zuvor erarbeiteten Schema. Die benötigten Substanzen und Zellhomogenate werden vorab aus dem -80 $^{\circ}$  Gefrierschrank geholt, 2 Min bei 37 $^{\circ}$  im Schüttelbad (GFL<sup>®</sup> 1092, Deutschland) aufgetaut und anschließend sofort auf Eis gestellt. Hämin (Häm) (Fluka; 1 mM in DMSO) wurde im Dunkeln (Schublade) bei Raumtemperatur (RT, ca. 22 $^{\circ}$ C) aufgetaut. Alle Substanzen wurden vor Verwendung gründlich gevortext und durch zusätzliches Auf- und Abpipettieren durchmischt. Der HO-Assay wurde für jedes Homogenat (110  $\mu$ l, ca. 35 $\mu$ g/ml) in Duplikaten angesetzt. Wegen der limitierten Menge an Homogenat, wurde nur eine Negativkontrolle je Kondition angesetzt. Da jede Kondition im Duplikat auf den 12-Well Platten vorhanden war, wurde die Negativkontrolle aus gleich großen Aliquoten beider Homogenate (55 $\mu$ l von Probe A1(bzw. B1, C1) und 55 $\mu$ l der Probe A2 (B2, C2)) einer Kondition zusammen pipettiert. Somit ergaben sich für den HO-Assay 5 Röhren je Kondition: 2x2 Proben und je eine Negativkontrolle.

Pro Messansatz wurden 3 Konditionen als biologisches und technisches Duplikat angesetzt. Daher umfasste ein Messansatz 15 Röhren (12 Proben und 3 Negativkontrollen). Jedes Röhren wurde beschriftet und auf Eis gestellt. Die PP-Röhren wurden mit 115  $\mu$ l Zellhomogenat (durchschnittlich 0,08 mg Protein/Probe), 5  $\mu$ l exogener BVR-Aktivität (zytosolischer 100.000xg Überstand aus Rattenleber-Homogenat mit hoher BVR-Aktivität), 4  $\mu$ l Hämin (1mM in DMSO) 5  $\mu$ l Desferal (DFO, 100mM in H<sub>2</sub>O. Novartis, Basel, Schweiz;)

und 25 µl NADPH (10°mM) hinzugefügt (siehe Tabelle 1). Die Negativkontrollen wurden mit 30µl Assay Buffer statt NADPH, 55µl von Probe A1(bzw. B1, C1) und 55µl der Probe A2 (B2, C2) (siehe Abb4. Aufteilung der Well Platten), 5µl BVR und 5 µl DFO versetzt. Anschließend wurden die PP-Röhrchen verschlossen und für 30 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad (GFL® 1092, Deutschland) inkubiert.

| Sample | ID       | Buffer<br>µl | HOMO/Master<br>µl | BVR<br>µl | Hämin<br>µl | DFO<br>µl | NADPH<br>µl | assay<br>vol.(µl) | inc.<br>(°C) |
|--------|----------|--------------|-------------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-------------------|--------------|
| 1      | A1-HO1   | -            | 115               | 5         | 4           | 5         | 25          | 150               | 0/37         |
| 2      | A1-HO2   | -            | 115               | 5         | 4           | 5         | 25          | 150               | 0/37         |
| 3      | A2-HO1   | -            | 115               | 5         | 4           | 5         | 25          | 150               | 0/37         |
| 4      | A2-HO2   | -            | 115               | 5         | 4           | 5         | 25          | 150               | 0/37         |
| 5      | B1vem1   | -            | 115               | 5         | 4           | 5         | 25          | 150               | 0/37         |
| 6      | B1vem2   | -            | 115               | 5         | 4           | 5         | 25          | 150               | 0/37         |
| 7      | B2vem1   | -            | 115               | 5         | 4           | 5         | 25          | 150               | 0/37         |
| 8      | B2vem2   | -            | 115               | 5         | 4           | 5         | 25          | 150               | 0/37         |
| 9      | C1häm1   | -            | 115               | 5         | 4           | 5         | 25          | 150               | 0/37         |
| 10     | C1häm2   | -            | 115               | 5         | 4           | 5         | 25          | 150               | 0/37         |
| 11     | C2häm1   | -            | 115               | 5         | 4           | 5         | 25          | 150               | 0/37         |
| 12     | C2häm2   | -            | 115               | 5         | 4           | 5         | 25          | 150               | 0/37         |
| 13     | negCon A | 30           | 55A1+55A2         | 5         | -           | 5         | -           | 150               | 0/37         |
| 14     | negCon B | 30           | 55B1+55B2         | 5         | -           | 5         | -           | 150               | 0/37         |
| 15     | negCon C | 30           | 55C1+55C2         | 5         | -           | 5         | -           | 150               | 0/37         |

**Tabelle 1 Pipettierschema der HO- Assays mit BMC1-M1 Zellen**

Nach exakt 30 Minuten wurden die Proben aus dem Schüttelwasserbad genommen, auf Eis gestellt und in jedes Röhrchen 50µl Coffein-Lösung (0,25 mol/l Coffein, 0,52 mol/L Natriumbenzoat; 0,9 mol/L Natriumacetat) zugegeben. Die Proben wurden gevortext und dann zu jedem Röhrchen 50µl gesättigter KCl-Lösung gegeben, um die anschließende Phasentrennung zu erleichtern. Im Anschluss wurde erneut gevortext und in jedes Röhrchen 1ml Benzol unter dem Abzug dispensiert. Nach diesem Schritt wurden die Röhrchen verschlossen und nach einem standardisierten Verfahren gevortext: dreimal hintereinander je eine Sekunde kurz, dreimal drei Sekunden hintereinander und danach wieder dreimal eine Sekunde bei maximaler Einstellung gevortext. Anschließend wurden die Röhrchen für 15 Minuten bei RT und 400g zentrifugiert (Sorvall® RC 3C Plus, swing out Rotor). Dies führte zu einer sichtbaren Phasentrennung. Die obere Benzolphase wurden vorsichtig abpipettiert, ohne die Interphase zu berühren, oder in die wässrige Phase einzustecken. Dafür wurde eine 1000µl Kolbenhubpipette verwendet, die auf ein maximales Volumen von 850µl eingestellt war, mit einer 1ml Spitze versehen, auf die eine weitere 200µl Spitze gesetzt wurde. Dies

gewährleistete, dass die Benzolphase in den engen Röhrchen unter optischer Kontrolle, ohne die Phasen zu stören abgehoben werden konnte. Von jeder Probe wurden so 800 µl der oberen Benzolphase in 1,5ml Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C eingefroren. Der Rest wurde unter den Abzug abdampfen gelassen und nach vollständiger Trocknung entsorgt.

### **3.3.3. Photometrische Bestimmung der Bilirubinmenge**

Mittels Photometer (U-3000 Spektrophotometer, Hitachi, Japan) wurde die Bilirubin Konzentration in den Benzolextrakten der Proben gemessen. Die Proben mussten mindestens 30 Minuten bei -20°C eingefroren werden. Damit sich etwaige Teile der wässrigen Phase absetzen konnten wurden sie erst unmittelbar vor der Messung im Dunkeln aufgetaut. Für einen ordentlichen Messdurchgang wurde das Photometer 30 Minuten vor Benutzung eingeschaltet, damit sich die Lampen aufwärmen konnten. Die Messungen wurden bei einer Geschwindigkeit von 120nm/min und einer Schlitzbreite von 5nm durchgeführt. Es wurden Scans in einem Bereich von 400 bis 600nm in 2nm Schritten aufgezeichnet und mit der Software „UV-Solutions 2.2“ dargestellt. Vor der ersten Messung einer Probe wurde eine Baseline hinterlegt. Um zu verifizieren, dass die Baseline keine Störungen oder Artefakte aufweist, wurde sie mit einer Benzolmessung überprüft. Erst wenn die Baseline festgelegt wurde, wurde mit der Messung der Proben begonnen. Vor Beginn des Scans wurden die Glas-Küvette (Hellma, Germany) auf Unreinheiten oder Fingerabdrücke kontrolliert und mit 70%igem Ethanol gereinigt. Die Messung eines Assays wurde in drei Durchgänge aufgeteilt. Zuerst wurden die Unikate gemessen, dann die Duplikate und schlussendlich die Negativkontrollen. Gegebenenfalls wurden Proben wiederholt gemessen, wenn Scans Artefakte aufwiesen. Nach jedem Durchgang wurde ein Baseline Check durchgeführt, der die Korrektheit der Messung garantieren sollte und für die spätere Berechnung von Bedeutung war.

### **3.3.4. Auswertung der Bilirubin Konzentration**

Für die Auswertung wurden von jedem brauchbaren Scan jeder Probe die Optischen Dichten (OD) bei 450, 520, 540 und 570nm dokumentiert. Da sich das Absorptionsmaximum von BR bei 450nm befindet, wurde die Differenz der OD bei 450nm und 520nm berechnet und so die OD bereinigt. Verliefen Proben im Bereich von 600nm bis 520nm nicht parallel zur Nulllinie, wurde ein Inkrement zur Bereinigung der OD bei 450nm berechnet oder die Probe erneut gemessen. Mit folgender Formel wurden die Inkremente berechnet:  $((OD_{450} - OD_{520} - (2.4 * (OD_{520} - OD_{570}) - (OD_{520} - OD_{570})))$

Für die weiteren Berechnungen wurden von den ODs der Proben, die ODs der Negativkontrollen abgezogen (bereinigt), und die entstandenen ODs pro Kondition gemittelt (alle Vem Proben pro Platte, alle Häm Proben, alle DMSO-Platten). Um aus den mit den

Negativkontrollen bereinigten BR-spezifischen ODs die BR-Menge, die in jeder Probe durch die enzymatische Tätigkeit gebildet wurde, zu errechnen, wurde ein Proportionalitätsfaktor herangezogen. Dieser wurde in vorherigen Experimenten im Rahmen anderer Arbeiten durch eine Kalibrationsgerade bestimmt. Dabei wurden bekannte Konzentrationen an BR zu 150µl Assaybuffer pipettiert und die Proben prozessiert, wie in 3.3.1 angegeben. Anders als der Extinktionskoeffizient, berücksichtigt somit der Proportionalitätsfaktor eventuell durch die Extraktion verursachte Effekte auf die erhaltene Menge BR.

Der verwendete Proportionalitätsfaktor von 3pmol BR/ml Benzol liegt allerdings sehr nahe am in der Literatur für BR in Benzol hinterlegten Extinktionskoeffizienten, so dass von einer nahezu vollständigen Extinktion von BR aus dem Assaybuffer ausgegangen werden kann. Über den Proportionalitätsfaktor wurde die im Assay gebildete Menge BR errechnet. Diese Menge wurde dann mit der im Assay vorhandenen Menge Protein normalisiert. Somit wurde die HO-Aktivität als nmol BR/ mg Protein pro Assay / 30 Minuten angegeben.

#### **3.4. Bradford Proteinbestimmung**

Für die quantitative Proteinbestimmung in den Proben, wurde die Bradford Methode angewandt. Dieses Verfahren ist vor allem wegen seiner einfachen Handhabung und dennoch hohen Sensitivität sehr beliebt. Die Bestimmung basiert auf der Verbindung zwischen zugesetztem Comassieblau und den zu bestimmenden Aminosäureresten, was zu einem Farb-Protein- Komplex mit erhöhter molarer Absorption führt (Bradford 1976). Für die Proteinbestimmung wurde eine Verdünnungsreihe (siehe Tab.1.) aus bovinem Serumalbumin (BSA) als Standard und 0,9%igem Natriumchlorid (NaCl) angelegt. Diese Standards dienen zur Erstellung einer Kalibrationsgerade, mit der die Proteinkonzentrationen der unbekannt Proben bestimmt werden sollen. Dabei wurden die Zellhomogenate so verdünnt, dass die erhaltenen Werte innerhalb der Kalibrierung lagen. Die Zellsuspensionen wurden dafür ebenfalls mit 0,9%igem NaCl 1:20 verdünnt. Von den verdünnten Proben, Standards und dem Leerwert (0,9%iges NaCl) wurden anschließend laut Schema je 50µl in Duplikaten auf eine 96-Well Platte aufgetragen und für die Farbreaktion in jedes belegte Well 200µl Comassie-Blue-Lösung (0,075 mg Coomassie® Brillant Blau G250 (Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland), in 50 ml 96%igen Ethanol, 100 ml konzentrierte Phosphorsäure mit destilliertem Wasser auf 1000 ml aufgefüllt) hinzugegeben. Die fertig beschickte Mikrotiterplatte wurde dann in einem ELISA –Platereader (Sunrise™, Tecan, Schweiz) ausgewertet. Dafür wurde die Extinktion bei 595nm gemessen und die Konzentration mit Hilfe der eingebauten Software „Magellan“ ausgewertet. Im Falle einer ungeraden oder stark abweichenden Kalibrationsgerade, wurde die Verdünnung angepasst und die Messung wiederholt.

| <b>Benennung</b> | <b>Herstellung</b>             | <b>Konzentration</b> |
|------------------|--------------------------------|----------------------|
| Standard 1       | 450 µl 0,9% NaCl + 50 µl BSA   | 100 µg/ml            |
| Standard 2       | 50 µl 0,9% NaCl + 150 µl S1 75 | 75 µg/ml             |
| Standard 3       | 100 µl 0,9% NaCl + 100 µl S150 | 50 µg/ml             |
| Standard 4       | 150 µl 0,9% NaCl + 50 µl S1 25 | 25 µg/ml             |
| Standard 5       | 190 µl 0,9% NaCl + 10 µl S1 5  | 5 µg/ml              |

**Tabelle 2 Verdünnungsschema der BSA-Standards und optimale Proteinkonzentrationen der Standards für die Kalibrationsgerade nach Bradford**

### **3.5. Statistische Auswertung und Datenverarbeitung**

Via Microsoft Excel wurden die erhobenen Werte, gemeinsam mit den Ergebnissen der photometrischen Auswertungen, per Kalibrationsgerade umgerechnet und so die entstandene Menge Mol BR berechnet.

Zur besseren Veranschaulichung der Daten, wurden die Gruppen untereinander relativ ausgewertet. Dazu wurden die Werte der Duplikate einer Kondition und eines Zeitpunktes gemittelt (nmolBr/mgProt, mgProt/assay) und die Standardabweichung mit Excel errechnet. Für die statistische Interpretation wurden die Daten der verschiedenen Konditionen mit den Daten der Kontrollen verglichen. Dazu wurde der zweiseitige, gepaarte „Students“-t-Test (Microsoft® Excel) eingesetzt. Ein p-Wert, der kleiner als 0,05 war, wurde als signifikanter Unterschied gewertet.

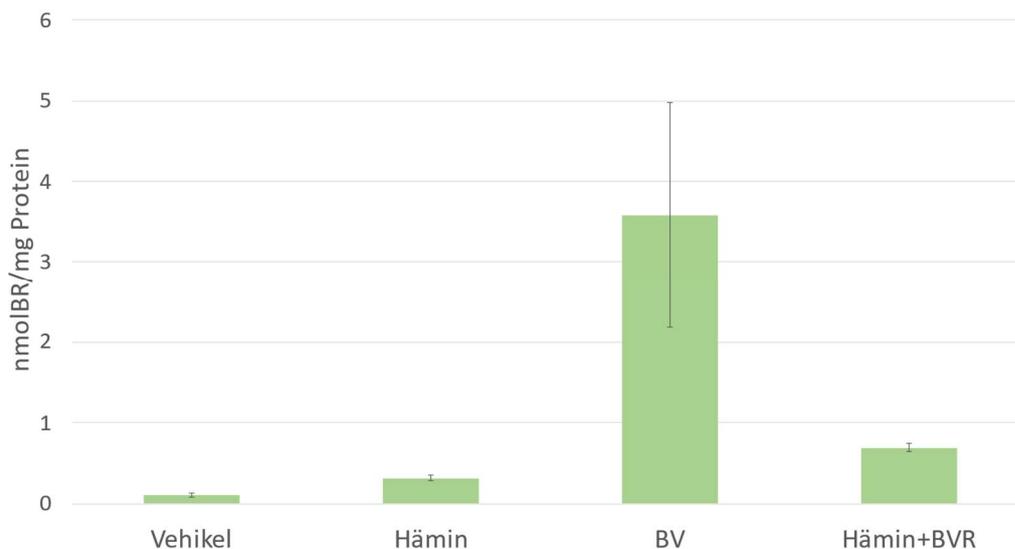
## 4. Ergebnisse

### 4.1. Qualitätskontrolle

Bevor mit den Versuchen mit BMC1 Zellhomogenaten begonnen wurde, wurden einige Vorversuche durchgeführt, um einen optimalen Aufbau des Assays zu generieren. Dabei wurde einerseits getestet, ob die Zugabe von externem BVR (Rat Liver Cytosol, Biliverdinreduktase) zu Melanomazellen, die HO-Aktivität erhöht, da festgestellt wurde, dass offenbar nicht die gesamte gebildete BV-Menge in Bilirubin umgewandelt wurde und so die Kapazität der Häm Degradation niedriger erscheint. Ziel dieses Vorversuches war es, zu zeigen, dass eine Zugabe von BVR zu dem Enzymgekoppelten Assay einen positiven Einfluss auf die HO-Aktivität hat. Die Zugabe von Biliverdin soll parallel dazu zeigen, dass bereits BVR in den Assays vorhanden ist, dass das zugeführte Biliverdin in Bilirubin katalysiert.

#### 4.1.1). MEWO-Zellen mit BVR-Zusatz

Für die Auswertung der Daten wurden die Ergebnisse aller Proben (auch Duplikate) einer Kondition gemittelt und grafisch in Abb. 6 dargestellt.



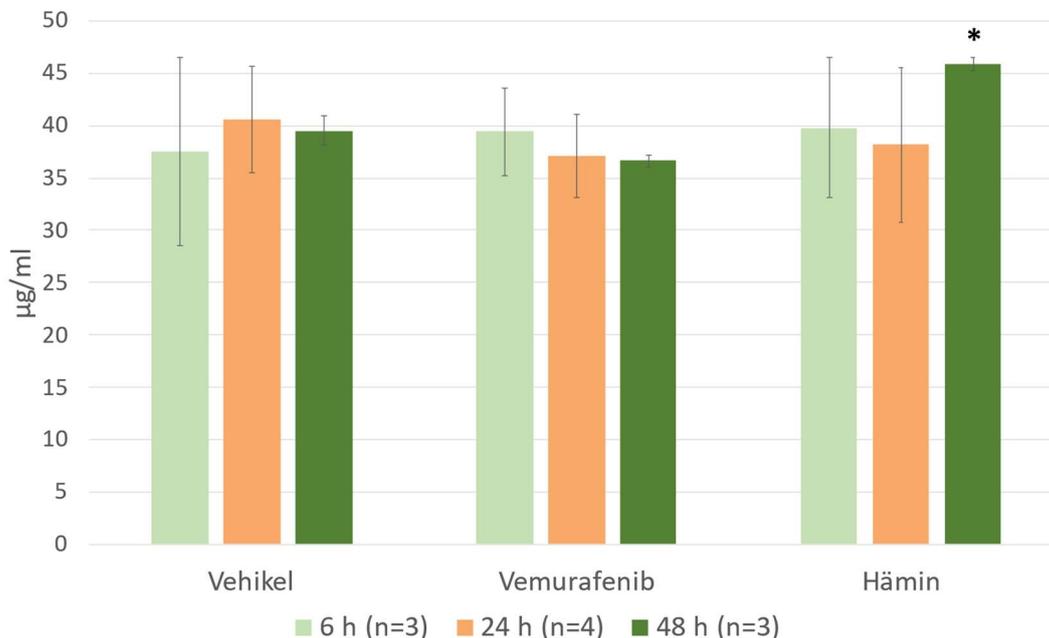
**Abbildung 6: Vergleich der Aktivitäten von Hämoxxygenase und Biliverdinreduktase in Melanoma-Zellen**  
Um die Kapazität von Melanomazellen (MeWo) Häm in oder Biliverdin in Bilirubin umzuwandeln zu ermitteln, wurde der HO-Assay mit Häm in oder Biliverdin (BV) als Substrat durchgeführt. Zur Überprüfung einer vollständigen Umwandlung des von der Hämoxxygenase (HO) gebildeten Biliverdins in Bilirubin wurde zusätzlich zu Häm in eine exogene Biliverdinreduktase-Quelle (zytosolischer 100.000<sup>g</sup> Überstand von Rattenleber, 4 $\mu$ l) untersucht. Zusätzlich wurde eine Kontrollgruppe (negCon) ohne Zusätze mitgeführt. Die erhaltenen BR-Mengen wurden proteinnormalisiert (mgBR/mg Protein) und sind als Mittelwerte inklusive Standardfehler dargestellt (n=4).

In der Gruppe mit extern zugeführtem Biliverdin wird sichtbar, dass in den Proben offensichtlich genug BVR vorhanden ist, dass das BV zu BR katalysiert und photometrisch eine fast 4x so

hohe Enzymaktivität im Vergleich zur Hämin Gruppe gemessen werden kann. Im Vergleich zur Negativkontrolle zeigt die Hämin Gruppe und auch die Gruppe mit Hämin und BVR-Zusatz eine deutliche Steigerung der HO-Enzymaktivität in den Zellen. Hierbei wird sichtbar, dass der Zusatz von BVR durchaus sinnvoll ist um die durch HO katalysierte BV zu BR umzuwandeln und so die HO-Aktivität photometrisch ausgewertet werden kann. Die Melanomzellen zeigen deutliche Reaktionen auf die Vorbehandlungen und die Ergebnisse dieses Vorversuches validieren den in den späteren Versuchen angewendeten Assay.

#### 4.2. HO-Aktivität in Vemurafenib behandelten BMC1 Zellen nach 6,24 und 48h

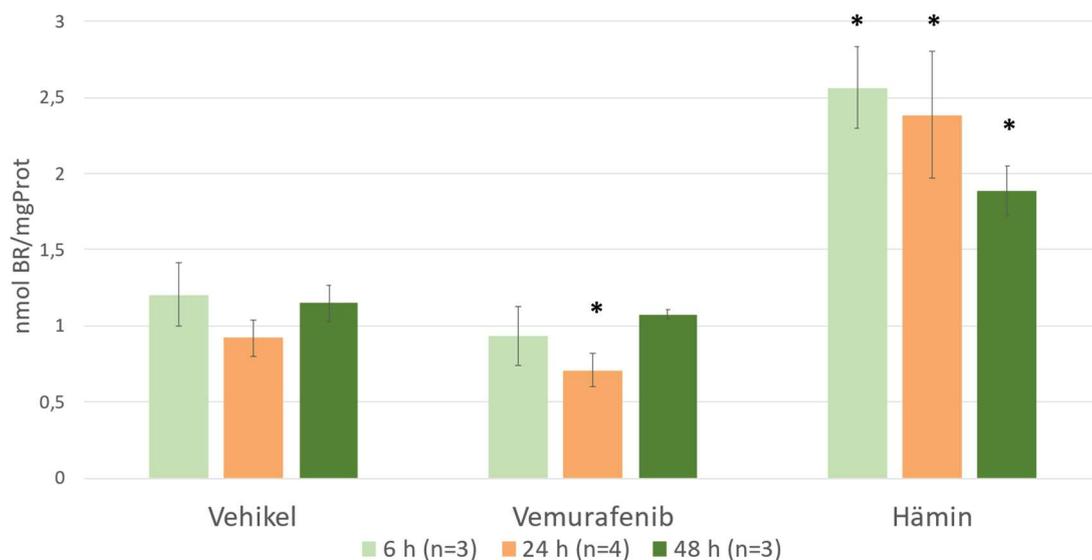
Bei der Auswertung der gemittelten Proteinkonzentration im Zeitverlauf, konnte, wie in Abb.8 dargestellt, eine merkliche Senkung der Proteinkonzentration nach 24h und 48h Vemurafenib Behandlung nachgewiesen werden, was auf eine Reduktion des Zellmaterials schließen lässt. Dies könnte mit der durch die BRAFi induzierte Hemmung der onkogenen Zellteilung und Apoptose der BMC1 Zellen zusammenhängen. Im Gegensatz dazu wird bei Behandlung mit Hämin nach 48h eine signifikante Steigerung der Proteinkonzentration gemessen, was zeigt, dass die Präsenz von Hämin das Wachstum der BMC1 Zellen positiv beeinflusst und die Regulation von Hämin somit auch einen potenziellen Angriffspunkt für die Behandlung von BMC1 Zellen darstellt.



**Abbildung 7: Proteinkonzentration in den Assays im Zeitverlauf.** Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Assays wurden die Homogenate der BMC1-M1 Zellen wie in 3.4. beschrieben, mittels Bradfordmethode ausgewertet. Dargestellt sind die gemittelten Proteinkonzentrationen der Homogenate ( $\mu\text{g/ml}$ ) nach Inkubation mit Vehikel (DMSO), Vemurafenib ( $10\mu\text{M}$ ) oder Hämin ( $10\mu\text{M}$ ) im Zeitverlauf (6h=hellgrün, 24h=orange, 48h=dunkelgrün). Die gemittelten Ergebnisse ( $n$  6h=3,  $n$  24h=4,  $n$  48h=3) werden mit +/- Standardfehlern (SEM) dargestellt. Die Unterschiede der Gruppen zur Kontrollgruppe wurde mittels Students t-Test (zweiseitig, ungepaart) errechnet und wird

bei Signifikanz (\*) angezeigt ( $p < 0,05$ ). Die Abweichungen in der Kontrollgruppe liegen an den natürlichen Abweichungen des biologischen Materials. Die Proteinkonzentration nach Häminbehandlung ist nach 48h signifikant gesteigert ( $*=0,02223523$ ).

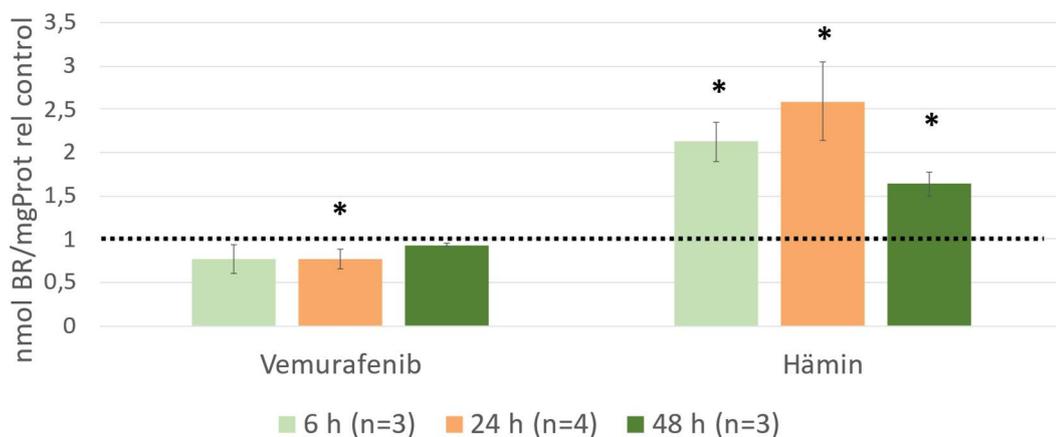
Auch in der HO-Aktivität konnten Veränderungen in den verschiedenen Konditionen nach Zeiteinheit gemessen werden. In Abb. 8 sind die gemittelten HO-Aktivitäten nach pro Untersuchungsgruppe und Zeiteinheit dargestellt. Die Behandlung der Zellen mit Vemurafenib führt zu einer vorübergehenden Hemmung der HO-Aktivität, die nach 24h sogar signifikant ist ( $*= 0,04798405$ ). Nach 48h nähert sich die Aktivität wieder dem Ausgangswert der Negativkontrolle an. Zellen, die mit Hämin behandelt wurden, weisen im Gegenteil dazu zu allen Zeitpunkten eine signifikant gesteigerte Aktivität der HO auf.



**Abbildung 8: Transiente Erniedrigung der Hämoxygenase Aktivität in BMC1-M1 Zellen durch Vemurafenib.**

Für die Bestimmung der Kapazität Häm zu degradieren, wurden Homogenate von BMC1-M1 Zellen eingesetzt und der HO Assay als Duplikat, wie im Abschnitt 3.3.1. beschrieben, durchgeführt. Die erhaltenen Bilirubinmengen (BR) wurde mit der Proteinmenge (mgProtein) im Homogenat normalisiert und als in vitro Hämoxygenase-Aktivität angegeben (nmol BR/mgProtein). Dargestellt sind die gemittelten HO-Aktivitäten von 3 oder 4 experimentellen Ansätzen (+/-SEM) nach Inkubation mit Vehikel (DMSO), Vemurafenib (10µM) und Hämin (10 µM, Positivkontrolle) je Zeitpunkt (6 h, hellgrüne Balken; 24 h, orange Balken; und 48h, dunkelgrüne Balken). Die Unterschiede zur Vehikelgruppe wurden mit einem Students t-Test (zweiseitig, gepaart) analysiert, und bei Signifikanz ( $p < 0,05$ ) angegeben (\*).

Zur besseren Veranschaulichung der Daten und um Schwankungen in den Werten auf Grund des Biologischen Materials zu relativieren, wurden die gemessenen Werte ebenfalls in Relation zur Vehikel Gruppe berechnet und in Abb. 9 dargestellt. Durch diese Berechnung wird eine signifikante Hemmung der HO-Aktivität zum Zeitpunkt 24h von fast 25% zur Kontrolle (Vemurafenib 24h= 76,9%) sichtbar. Deutlich wird auch, dass bereits nach 6h eine fast 20%ige Hemmung der HO-Aktivität nachweisbar ist, die jedoch noch nicht signifikant zur Kontrollgruppe ist. Entsprechend der absoluten Darstellung, wird auch im relativen Vergleich sichtbar, dass sich die HO-Aktivität nach 48h wieder dem Ausgangswert annähert (Vemurafenib 48h= 93, 7%). In der Hämin Gruppe kann hingegen zu jedem Zeitpunkt eine signifikante Steigerung der HO-Aktivität gemessen werden, nach 24h sogar eine 2,5-fache Steigerung. Nach 48h nimmt die HO-Aktivität der Hämin Gruppe wieder ab, was mit einer Sättigung der Zellen zusammenhängen könnte.



**Abbildung 9:** Darstellung der Hämoxigenase- Aktivität im Zeitverlauf relativ zur Kontrolle Für die Bestimmung der Kapazität Häm zu degradieren wurden Homogenate von BMC1-M1 Zellen eingesetzt und der HO Assay als Duplikat, wie im Abschnitt 3.3.1. beschrieben, durchgeführt. Die erhaltenen Bilirubinmengen (BR) wurde mit der Proteinmenge (mgProtein) im Homogenat normalisiert und als in vitro Hämoxigenase-Aktivität angegeben (nmol BR/mgProtein). Dargestellt sind die gemittelten HO-Aktivitäten von 3 oder 4 experimentellen Ansätzen (+/-SEM) nach Inkubation mit Vemurafenib (10µM) und Hämin (10 µM, Positivkontrolle) je Zeitpunkt (6 h, hellgrüne Balken; 24 h, orange Balken; und 48h, dunkelgrüne Balken) relativ (%) zur Kontrollgruppe. Die Unterschiede zur Vehikelgruppe wurden mit einem Students t-Test (zweiseitig, gepaart) analysiert, und bei Signifikanz ( $p < 0,05$ ) angegeben (\*). Die schwarze Linie im Diagrammbereich zeigt die Kontrolllinie bei 100% an.

## 5. Diskussion

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es, mittels eines biochemischen Assays zur Bestimmung der HO-Aktivität zu untersuchen, ob die Behandlung mit dem BRAFi Vemurafenib in BMC1 Zellen zu einer Veränderung der Kapazität Häm zu degradieren führt. Dies sollte zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht werden. Die Durchführung des verwendeten Assays basierte auf dem durch Tenhunen et al., 1968 beschriebenen Ansatz und wurde für die Untersuchungen in kultivierten Zellen adaptiert (Duvigneau et al. 2020). Dabei bildet die photometrische Bestimmung des produzierten BR, nach Proteinnormalisierung, die Grundlage der Messung der HO-Aktivität. Vorversuche mit MeWo-Melanomzellen wurden zur Überprüfung einer ausreichend hohen BVR-Aktivität durchgeführt. Es zeigte sich, dass MeWo Zellen eine ausreichend hohe BVR-Aktivität vorhanden ist, welches BV, das Abbauprodukt der HO, zu BR umwandelt, sodass aus der gemessenen BR-Menge auf die zugrundeliegende HO-Aktivität geschlossen werden darf.

Nach den Vorversuchen wurden die Assays an den BMC1 Proben, wie in 3.3.2. beschrieben, durchgeführt. Wenn es stimmt, dass die HO-Aktivität der Melanomzellen für die Zellteilung von Bedeutung ist, sollte eine Hemmung der Proliferation durch BRAFi mit einer Reduktion der Kapazität Häm zu degradieren, einhergehen. Sollten die Zellen jedoch die BRAFi Hemmung durch die Erhöhung der HO-Aktivität überwinden können, so müsste die Kapazität Häm zu degradieren im Weiteren wieder ansteigen und könnte vielleicht sogar noch höhere Werte annehmen. Eine Hemmung der Proliferation durch BRAFi sollte im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen mit einer niedrigeren Proteinkonzentration einhergehen. Tatsächlich führte die BRAFi-Behandlung nicht nur zu einer Reduktion des Zellproteins, sondern auch zu einer signifikanten Verminderung der HO-Aktivität (siehe Abb.9). Nach einer Inkubationszeit von 48h näherte sich die HO-Aktivität wieder den Werten der Kontrollgruppe an. Die Daten zeigen also, dass die HO-Aktivität wie erwartet mit dem zytostatischen Effekt von Vemurafenib einhergeht. Die Proteinkonzentration weisen nach 24h und 48h Behandlung einen merklichen Rückgang im Vergleich zu Kontrollgruppe auf. Lediglich nach 6h steigt die Proteinkonzentration kurzzeitig an, was vermutlich mit einer anfänglichen Überschussreaktion auf die Behandlung zusammenhängt

Die generierten Daten werfen die Frage auf, ob die Erhöhung der HO, welche nach der akuten Hemmung nachweisbar wurde, auch zur beschriebenen Chemoresistenz gegen BRAFi (Sosman et al. 2012, Villanueva et al. 2013, Zhong et al. 2022) beiträgt. Eine zusätzliche Behandlung zu BRAFi mit Therapeutika, die an anderen Stellen des RAS-RAF-MEK-ERK-MAP Signalweges ansetzen, zeigten bereits vielversprechende Ergebnisse in der Behandlung von Melanoma induzierten Gehirnetastasen (Villanueva et al. 2013).

Da die Isoform HO1 jedoch durch Zellstress induzierbar ist (Jozkowicz et al. 2007), könnte der durch die BRAFi entstehende Zellstress paradoxerweise die HO1 induzieren und so zu einer vermehrten Zellteilung und Resistenzbildung gegen das Therapeutikum beitragen. Zudem wurde von Liu et al. 2019 aufgezeigt, dass die HO1 die Zellproliferation von Melanomzellen über einen alternativen BRAF-ERK Weg ermöglicht. Die therapeutische Hemmung der HO zusätzlich zur BRAFi Behandlung erscheint somit als sinnvoller Ansatzpunkt für weitere Forschungen im Bereich der Krebstherapie. Diese Vorgehensweise wurde auch von Yadav 2011 und Liu et al. 2019 als potentieller Ansatz für die Behandlung von Patienten, deren Tumore positiv auf die BRAF Mutation getestet wurden, erwähnt.

Eine weitere Frage, die durch die Daten aufgeworfen wird, ist, welche Isoform der HO genau durch die BRAFi Behandlung induziert wird. Da der durchgeführte Assay nur einen Rückschluss über die generelle Aktivität der HO in den Proben erlaubt, nicht jedoch auf die HO-Isoform, können PCR-Analysen zur Genexpression Rückschluss auf die Isoform geben. Weiterführende, nicht publizierte PCR-Versuche durch Dr. Andrea Müllebner an einer geringen Anzahl der verwendeten BMC1 Proben, zeigten auf, dass die Zellen nicht nur, wie zu erwarten HO1, sondern auch HO2 exprimieren. Beide Proteine tragen jedoch zur katalytischen HO-Aktivität bei. Um diese Daten zu validieren und eine statistisch standhafte Aussage zu generieren, müssten die Versuche jedoch mit einer größeren Probenanzahl wiederholt werden. Dennoch bieten die vorläufigen Ergebnisse eine Grundlage für weitere Forschungen und lassen vermuten, dass nicht nur HO1 in der Entstehung von Metastasen eine Rolle spielt. Dabei scheint besonders die erhöhte Aktivität, also die erhöhte Kapazität Häm zu degradieren, eine große Rolle zu spielen. Dies legt nahe, dass die HO-Produkte wie z.B. BR und CO, die unter anderem den Vasotonus, Inflammation und Apoptose beeinflussen können, für die Regulation der Zellteilung von Bedeutung sind. Es ist denkbar, dass die Abbauprodukte der HO auch eine Rolle bei der Resistenzbildung gegen BRAFi spielen. Dazu könnt noch genauer untersucht werden, welchen Einfluss die einzelnen Produkte der HO, auf die Zellproliferation haben und ob eine Hemmung der HO auch die Produkte ausreichend hemmt.

Die generierten Daten bieten einen Rückschluss auf die *in vitro* HO-Aktivität in Vemurafenib behandelten BMC1 Melanom Zellen. Sie geben Einblicke in die potenzielle Rolle der HO-Aktivität in der Zellproliferation und der Resistenzentwicklung gegen BRAFi in BRAF positiven Metastasen. Es bedarf jedoch noch weiteren Untersuchungen, um den zugrundeliegenden Mechanismus und Bezug der HO zur Resistenzentwicklung vollständig zu verstehen. So könnten etwa die durchgeführten Versuche nach längerer Inkubation der Zellen mit BRAFi wiederholt werden und verschiedene Zeitintervalle untersucht werden, um den Verlauf der transienten HO-Hemmung genauer darzustellen. Auch die Entwicklung der

Proteinkonzentration nach längerer Behandlung mit Vemurafenib könnte weitere Einblicke auf das Entstehen einer Resistenz geben. Ebenso könnten Hemmversuche einen Rückschluss geben, ob die Hemmung der HO tatsächlich durch die Behandlung mit Vemurafenib, oder aber durch den entstandenen Zellstress hervorgerufen wird. Zusammenfassend lassen die generierten Daten jedoch darauf schließen, dass die Hemmung der HO als begleitender Therapieansatz zur BRAFi Behandlung als durchaus sinnvoll erscheint.

## **6. Conclusio**

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass Vemurafenib akut die HO-Aktivität zu hemmen vermag. Diese Hemmung kann jedoch im weiteren Verlauf überkommen werden. Dass die Zellen nach einer anfänglichen Hemmung später wieder zur ursprünglichen HO-Aktivität zurückkehren, liegt möglicherweise an einer kompensatorischen Induktion der HO durch den durch die BRAFi Behandlung entstandenen Zellstress. Die vorliegenden Daten zeigen auch, dass die HO-Aktivität für die Zellproliferation benötigt wird. Somit hat alles, was HO induziert oder die HO-Aktivität beeinflusst, durch die erhöhte Enzymaktivität einen Einfluss auf die Zellproliferation. Die transiente Hemmung der HO-Aktivität durch die Behandlung mit Vemurafenib weist daher auch einen zytostatischen Effekt auf. Die HO-Aktivität scheint somit auch eine wichtige Rolle für die spätere Ausbildung von Resistenzen gegen BRAFi zu spielen. Dies lässt vermuten, dass zusätzlich zur BRAFi Behandlung auch eine Hemmung der HO-Aktivität therapeutisch sinnvoll ist.

## 7. Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist eine gefährliche Form von Hautkrebs, die aus den pigmentproduzierenden Melanozyten entsteht und Tumore sowie aggressive Metastasen bildet. Beim Menschen weisen die meisten Melanome Mutationen im BRAF-Gen (BRAF V600) auf, die zu einer dauerhaften Aktivierung von Zellteilungssignalen führt. In experimentellen Studien wurde gezeigt, dass die konstitutive BRAF-Aktivierung mit einer erhöhten Expression von HO-1 assoziiert ist. Es ist daher anzunehmen, dass Melanomzellen von einer aktiven HO profitieren. Metastasierende Melanome, die eine BRAF V600 Mutation aufweisen, können mit BRAFi, wie Vemurafenib, behandelt werden, zeigen jedoch oft nach einiger Zeit eine Resistenz gegen das Medikament. Da bekannt ist, dass HO in tumorösem Gewebe vermehrt exprimiert wird und außerdem zur Metastasierung und Angiogenese von Melanomen beitragen kann, ist es möglich, dass die HO auch eine Rolle auch in der Resistenzentwicklung gegen BRAFi spielt. In anderen Tumorzellen konnte bereits gezeigt werden, dass eine HO-1 Erhöhung mit der Ausbildung der Chemoresistenz in Verbindung steht. Dabei wird vermutet, dass die Produkte, die in der HO-Reaktion gebildet werden, die Zellen gegen den oxidativen Stress und die Induktion der Apoptose schützen. Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es daher zu untersuchen, ob die HO-Aktivität auf die Gabe von Vemurafenib anspricht, und ob sie sich unter der Behandlung mit der Zeit verändert. Daher sollte die HO-Aktivität in Zellen der Linie BMC1-M1, die mit und ohne Vemurafenib behandelt wurden, in einer zeitlichen Kinetik erfasst werden. Es wurde vermutet, dass die HO- Aktivität der Zellen unter Einfluss von Vemurafenib zunächst gehemmt wird, sich aber im Anschluss wieder normalisiert, oder sogar ansteigt. BMC1-M1 Zellen wurden in drei Behandlungsgruppen (Kontrolle (Vehikel), Vemurafenib (10µM) und Hämin (1mM) eingeteilt, jeweils für 6h, 24h und 48h inkubiert. Die Behandlung mit Hämin wurde als Positivkontrolle mitgeführt. Für die Bestimmung der HO-Aktivität wurde ein gekoppelter biochemischer *in vitro* Assay eingesetzt. Dabei wurde als Maß für die HO-Aktivität die Menge an BR herangezogen, die vom Zellhomogenat in 30' je mg Protein gebildet wird. Zunächst wurden die experimentellen Rahmenbedingungen kontrolliert und sichergestellt, dass die im Assay entstandene BR-Menge einen direkten Rückschluss auf die zugrundeliegende HO- Aktivität erlaubt, da das durch die HO umgewandelte Hämin vollständig in BR überführt werden konnte. Dazu wurde auch das der HO nachgeschaltete Enzym, Biliverdinreduktase, auf eine ausreichend hohe Aktivität überprüft. Die BR-Menge wurde mittels Photometrie quantifiziert und die Proteinmenge in jedem Inkubations-Ansatz mit der Methode nach Bradford bestimmt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe führte die Hämin-Behandlung in allen Zeitpunkten zu einer signifikant höheren HO-Aktivität. Dies zeigt, dass HO in BMC1-M1 induziert werden kann. Die Vemurafenib-Behandlung führte demgegenüber

bereits nach 6h zu einer moderaten Hemmung der HO-Aktivität (etwa 25%), welche nach 24h signifikant war. Nach 48 hatte sich die HO-Aktivität jedoch wieder normalisiert, was nahelegt, dass die Hemmung zu diesem Zeitpunkt bereits überwunden wurde. Die erhobenen Daten bestätigen somit die Hypothese, dass die Behandlung mit Vemurafenib die HO-Aktivität nur transient hemmt, und die Hemmung im Späteren überwunden werden kann. Dies könnte an einer kompensatorischen Induktion der HO1 durch den Vemurafenib-induzierten Zellstress liegen. Um diese Vermutung zu bestätigen, müssten weitere Untersuchungen z.B. zur Genexpression durchgeführt werden. Jedenfalls zeigen die erhobenen Daten, dass Vemurafenib nur kurzzeitig die Bildung der zellschützenden HO-Produkte unterdrücken kann, und diese nach länger-andauernder Behandlung mit BRAFi wieder zum Zellschutz zur Verfügung stehen. Diese Ergebnisse stellen somit eine wichtige Grundlage zur Frage der Rolle der HO-Aktivität in der Krebstherapie dar.

## 8. Summary

The malignant melanoma is a dangerous form of skin cancer that arises from pigment-producing melanocytes and forms tumours as well as aggressive metastases. In humans, most melanomas exhibit mutations in the BRAF gene (BRAF V600), resulting in a sustained activation of cell division signals. Experimental studies have shown that constitutive BRAF activation is associated with increased expression of HO-1. It is therefore assumed that melanoma cells benefit from active HO. Metastatic melanomas harbouring a BRAF V600 mutation can be treated with BRAF inhibitors (BRAFi) such as Vemurafenib, but they often develop resistance to the medication over time. Since HO is known to be overexpressed in tumorous tissue and can contribute to the metastasis and angiogenesis of melanomas, it is possible that HO also plays a role in the development of resistance to BRAFi. In other tumour cells, an increase in HO-1 has been shown to be associated with the development of chemoresistance, with the products formed in the HO reaction believed to protect cells against oxidative stress and apoptosis induction. Therefore, the aim of this thesis was to investigate whether HO activity responds to the administration of Vemurafenib and whether it changes over time during treatment. The HO activity in BMC1-M1 cells, treated with and without Vemurafenib, was measured over a temporal kinetic period. It was hypothesized that under the influence of Vemurafenib, the HO activity of the cells would initially be inhibited but would subsequently normalize or even increase. BMC1-M1 cells were divided into three treatment groups (control (vehicle), Vemurafenib (10 $\mu$ M), and hemin (1mM), incubated for 6h, 24h, and 48h, and used for determining HO activity using a coupled biochemical in vitro assay. The amount of bilirubin (BR) formed by the cell homogenate per mg of protein in 30 minutes was used as a measure of HO activity. First, the experimental conditions were controlled to ensure that the amount of BR generated in the assay allowed for a direct inference of the underlying HO activity since the Hemin converted by HO is completely converted to BR. Additionally, the activity of biliverdin reductase, the enzyme downstream of HO, was checked to be sufficiently high. The amount of BR was quantified by photometry and the protein amount in each incubation assay was determined using the Bradford method. Compared to the control group, hemin treatment resulted in significantly higher HO activity at all time points, indicating that HO can be induced in BMC1-M1 cells. In contrast, Vemurafenib treatment led to a moderate inhibition of HO activity (approximately 25%) after 6 hours, which became significant after 24 hours. However, after 48 hours, HO activity normalized again, suggesting that the inhibition had been overcome by that time. Thus, the collected data confirm the hypothesis that Vemurafenib treatment only transiently inhibits HO activity, and the inhibition can be overcome later. This could be due to compensatory induction of HO1 by the Vemurafenib-induced cellular

stress. Further investigations, such as gene expression studies, would be necessary to confirm this assumption. Nevertheless, the data obtained demonstrate that Vemurafenib can only temporarily suppress the formation of cell-protective HO products, which become available again for cellular protection after prolonged treatment with BRAFi. These results thus provide an important basis for the question of the role of HO activity in cancer therapy.

## 9. Literaturverzeichnis

Arnold M, Singh D, Laversanne M, Vignat J, Vaccarella S, Meheus F, Cust AE, Vries E de, Whiteman DC, Bray F. 2022. Global Burden of Cutaneous Melanoma in 2020 and Projections to 2040. *JAMA dermatology*, 158 (5): 495–503. DOI 10.1001/jamadermatol.2022.0160.

Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob J-J, Simeone E, Grimaldi AM, Maio M, Palmieri G, Testori A, Marincola FM, Mozzillo N. 2012. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *Journal of translational medicine*, 10: 85. DOI 10.1186/1479-5876-10-85.

Bradford MM. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 1976: 248–254.

Chiang S-K, Chen S-E, Chang L-C. 2018. A Dual Role of Heme Oxygenase-1 in Cancer Cells. *International journal of molecular sciences*, 20 (1). DOI 10.3390/ijms20010039.

Chiarion-Sileni V, Murr R, Pigozzo J, Sarti S, Tomassi O, Romanini A. 2003. Brain metastases from malignant melanoma. *Forum (Genoa, Italy)*, 13 (2): 170-82; quiz 190.

Consoli V, Sorrenti V, Grosso S, Vanella L. 2021. Heme Oxygenase-1 Signaling and Redox Homeostasis in Physiopathological Conditions. *Biomolecules*, 11 (4). DOI 10.3390/biom11040589.

Costa Silva RCM, Correa LHT. 2022. Heme Oxygenase 1 in Vertebrates: Friend and Foe. *Cell biochemistry and biophysics*, 80 (1): 97–113. DOI 10.1007/s12013-021-01047-z.

Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JWC, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417 (6892): 949–954. DOI 10.1038/nature00766.

Duvigneau JC, Esterbauer H, Kozlov AV. 2019. Role of Heme Oxygenase as a Modulator of Heme-Mediated Pathways. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 8 (10).

DOI 10.3390/antiox8100475.

Duvigneau JC, Trovato A, Müllebner A, Miller I, Krewenka C, Krenn K, Zich W, Moldzio R. 2020. Cannabidiol Protects Dopaminergic Neurons in Mesencephalic Cultures against the Complex I Inhibitor Rotenone Via Modulation of Heme Oxygenase Activity and Bilirubin. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9 (2). DOI 10.3390/antiox9020135.

Furfaro AL, Ottonello S, Loi G, Cossu I, Piras S, Spagnolo F, Queirolo P, Marinari UM, Moretta L, Pronzato MA, Mingari MC, Pietra G, Nitti M. 2020. HO-1 downregulation favors BRAFV600 melanoma cell death induced by Vemurafenib/PLX4032 and increases NK recognition. *International journal of cancer*, 146 (7): 1950–1962. DOI 10.1002/ijc.32611.

Grochot-Przeczek A, Kotlinowski J, Kozakowska M, Starowicz K, Jagodzinska J, Stachurska A, Volger OL, Bukowska-Strakova K, Florczyk U, Tertit M, Jazwa A, Szade K, Stepniewski J, Loboda A, Horrevoets AJG, Dulak J, Jozkowicz A. 2014. Heme oxygenase-1 is required for angiogenic function of bone marrow-derived progenitor cells: role in therapeutic revascularization. *Antioxidants & redox signaling*, 20 (11): 1677–1692.

DOI 10.1089/ars.2013.5426.

Gutzmer R, Stroyakovskiy D, Gogas H, Robert C, Lewis K, Protsenko S, Pereira RP, Eigentler T, Rutkowski P, Demidov L, Manikhas GM, Yan Y, Huang K-C, Uyei A, McNally V, McArthur GA, Ascierto PA. 2020. Atezolizumab, vemurafenib, and cobimetinib as first-line treatment for unresectable advanced BRAFV600 mutation-positive melanoma (IMspire150): primary analysis of the randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet (London, England)*, 395 (10240): 1835–1844. DOI 10.1016/S0140-6736(20)30934-X.

Halle BR, Johnson DB. 2021. Defining and Targeting BRAF Mutations in Solid Tumors. *Current treatment options in oncology*, 22 (4): 30. DOI 10.1007/s11864-021-00827-2.

Intagliata S, Salerno L, Ciaffaglione V, Leonardi C, Fallica AN, Carota G, Amata E, Marrazzo A, Pittalà V, Romeo G. 2019. Heme Oxygenase-2 (HO-2) as a therapeutic target: Activators and inhibitors. *European journal of medicinal chemistry*, 183: 111703.

DOI 10.1016/j.ejmech.2019.111703.

Jozkowicz A, Was H, Dulak J. 2007. Heme oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxidants & redox signaling*, 9 (12): 2099–2117. DOI 10.1089/ars.2007.1659.

Kim A, Cohen MS. 2016. The discovery of vemurafenib for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma. *Expert opinion on drug discovery*, 11 (9): 907–916.

DOI 10.1080/17460441.2016.1201057.

Liu L, Wu Y, Bian C, Nisar MF, Wang M, Hu X, Diao Q, Nian W, Wang E, Xu W, Zhong JL. 2019. Heme oxygenase 1 facilitates cell proliferation via the B-Raf-ERK signaling pathway in melanoma. *Cell communication and signaling : CCS*, 17 (1): 3. DOI 10.1186/s12964-018-0313-3.

Maines MD. 2001. Overview of heme degradation pathway. *Current protocols in toxicology*, Chapter 9: Unit 9.1. DOI 10.1002/0471140856.tx0901s00.

McArthur GA, Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Dummer R, Ribas A, Hogg D, Hamid O, Ascierto PA, Garbe C, Testori A, Maio M, Lorigan P, Lebbé C, Jouary T, Schadendorf D, O'Day SJ, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dréno B, Sosman JA, Flaherty KT, Yin M, Caro I, Cheng S, Trunzer K, Hauschild A. 2014. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *The Lancet. Oncology*, 15 (3): 323–332.

DOI 10.1016/S1470-2045(14)70012-9.

Muñoz-Sánchez J, Cháñez-Cárdenas ME. 2014. A review on hemeoxygenase-2: focus on cellular protection and oxygen response. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2014: 604981. DOI 10.1155/2014/604981.

Radke J, Schumann E, Onken J, Koll R, Acker G, Bodnar B, Senger C, Tierling S, Möbs M, Vajkoczy P, Vidal A, Högler S, Kodajova P, Westphal D, Meier F, Heppner F, Kreuzer-Redmer S, Grebien F, Jürchott K, Redmer T. 2022. Decoding molecular programs in melanoma brain metastases. *Nature communications*, 13 (1): 7304. DOI 10.1038/s41467-022-34899-x.

Rastrelli M, Tropea S, Rossi CR, Alaibac M. 2014. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In vivo (Athens, Greece)*, 28 (6): 1005–1011.

Redmer T. 2018. Deciphering mechanisms of brain metastasis in melanoma - the gist of the matter. *Molecular cancer*, 17 (1): 106. DOI 10.1186/s12943-018-0854-5.

Ryter SW, Alam J, Choi AMK. 2006. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiological reviews*, 86 (2): 583–650.

DOI 10.1152/physrev.00011.2005.

Sosman JA, Kim KB, Schuchter L, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, McArthur GA, Hutson TE, Moschos SJ, Flaherty KT, Hersey P, Kefford R, Lawrence D, Puzanov I, Lewis KD,

Amaravadi RK, Chmielowski B, Lawrence HJ, Shyr Y, Ye F, Li J, Nolop KB, Lee RJ, Joe AK, Ribas A. 2012. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *The New England journal of medicine*, 366 (8): 707–714.

DOI 10.1056/NEJMoa1112302.

Tenhunen, R., Marver, H.S. & Schmid, R. 1968. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase.

Villanueva J, Infante JR, Krepler C, Reyes-Uribe P, Samanta M, Chen H-Y, Li B, Swoboda RK, Wilson M, Vultur A, Fukunaba-Kalabis M, Wubbenhorst B, Chen TY, Liu Q, Sproesser K, DeMarini DJ, Gilmer TM, Martin A-M, Marmorstein R, Schultz DC, Speicher DW, Karakousis GC, Xu W, Amaravadi RK, Xu X, Schuchter LM, Herlyn M, Nathanson KL. 2013. Concurrent MEK2 mutation and BRAF amplification confer resistance to BRAF and MEK inhibitors in melanoma. *Cell reports*, 4 (6): 1090–1099. DOI 10.1016/j.celrep.2013.08.023.

Yadav B. 2011. Selective inhibition of hemeoxygenase-1 as a novel therapeutic target for anticancer treatment. *Journal of Nanomedicine & Nanotechnology*, s4 (01).

DOI 10.4172/2157-7439.S4-005.

Zhong J, Yan W, Wang C, Liu W, Lin X, Zou Z, Sun W, Chen Y. 2022. BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma: Mechanisms and Alternative Therapeutic Strategies. *Current treatment options in oncology*, 23 (11): 1503–1521. DOI 10.1007/s11864-022-01006-7.

## 10. Abbildungs- und Quellenverzeichnis

### 10.1. Tabellen

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1 Pipettierschema der HO- Assays .....   | 13 |
| Tabelle 2 Verdünnungsschema der BSA Standards und optimale Proteinkonzentrationen der Standards für die Kalibrationsgerade nach Bradford ..... | 16 |

### 10.2. Abbildungen

|  |    |
|--|----|
| <i>Abbildung 1 Darstellung der enzymatischen Schritte für die Bestimmung der in vitro Hämoxygenase Aktivität.</i> .....                            | 2  |
| <i>Abbildung 2: Schematische Darstellung der Wirkung der BRAF V600 Mutation entlang des RAS-RAF-MEK-ERK-MAP-Signalweges.</i> .....                 | 5  |
| <i>Abbildung 3: Schematische Darstellung der Regulation der Kaskade unter Einfluss von BRAF-Inhibitoren</i> .....                                  | 6  |
| <i>Abbildung 4: Aufbau der Well Platten</i> .....  | 10 |
| <i>Abbildung 5: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Bestimmung der in vitro Hämoxygenase-Aktivität von kultivierten Zellen.</i> ..... | 11 |
| <i>Abbildung 6: Vergleich der Aktivitäten von Hämoxygenase und Biliverdinreduktase in Melanoma-Zellen.</i> .....                                   | 17 |
| <i>Abbildung 7: Proteinkonzentration in den Assays im Zeitverlauf.</i> .....   | 18 |
| <i>Abbildung 8: Transiente Erniedrigung der Hämoxygenase Aktivität in BMC1-M1 Zellen durch Vemurafenib</i> .....                                   | 19 |
| <i>Abbildung 9: Darstellung der Hämoxygenase- Aktivität im Zeitverlauf relativ zur Kontrolle</i>   | 20 |