

Aus der Klinik für Augenheilkunde
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Charakterisierung von temperatursensitiven Transient-
Rezeptor-Potenzial-Kanälen in kultivierten
Aderhautmelanomzellen (92.1)

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Arina Böhm

aus Berlin

Datum der Promotion: 22.09.2017

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	5
Zusammenfassung	6
Abstract	8
1 Einführung	9
1.1 Charakterisierung des Aderhautmelanoms und Therapieoptionen.....	9
1.2 Bedeutung von Calcium und dessen Regulation in der Physiologie der Zelle..	14
1.3 Transient receptor potential channels (TRPs)	15
1.4 TRPs in Tumoren	17
1.4.1 TRPV1	17
1.4.2 TRPM8.....	19
1.4.3 Genexpression von TRPM8 und TRPV1 in gesunden und in Tumorzellen	20
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	21
2 Material und Methoden	22
2.1 Chemikalien und Lösungen	22
2.2 Zellkultur.....	23
2.3 Calcium Imaging.....	24
2.4 Planare Patch-Clamp-Technik.....	26
2.5 Datenanalyse und Statistik	29
3 Ergebnisse	30
3.1 Zellmorphologie der Aderhautmelanozyten und der 92.1-Zellen	30
3.2 Fluoreszenzoptische Messung der Aderhautmelanozyten	31
3.2.1 Capsaicin erhöht die $[Ca^{2+}]_i$ in gesunden Zellen	31
3.2.2 Icilin ohne Effekt auf die $[Ca^{2+}]_i$ in gesunden Zellen	32
3.3 Elektrophysiologische und fluoreszenzoptische Untersuchung der Aderhautmelanomzelllinie 92.1	33
3.3.1 Capsaicin erhöht die $[Ca^{2+}]_i$ in 92.1-Zellen.....	33

3.3.2	CAP erhöht Ganzzellströme in 92.1-Zellen.....	35
3.3.3	Icilin erhöht die $[Ca^{2+}]_i$ in 92.1-Zellen	37
3.4	Vergleich von gesunden Aderhautmelanozyten mit 92.1-Zellen.....	39
3.4.1	Vergleich des capsaicininduzierten Effektes	39
3.4.2	Vergleich des icilininduzierten Effektes	40
4	Diskussion	41
4.1	Analyse der Zellmorphologie der Tumor- und der gesunden Zellen.....	42
4.2	TRP-Kanäle in Aderhautmelanozyten	43
4.2.1	TRPV1 in Aderhautmelanozyten.....	44
4.2.2	TRPM8 in Aderhautmelanozyten	45
4.3	Veränderte TRP-Kanal-Aktivität in den Aderhautmelanomzellen 92.1	46
4.3.1	TRPV1 in 92.1-Zellen.....	46
4.3.2	TRPM8 in 92.1-Zellen	47
4.4	Medizinische Relevanz.....	48
4.5	Schlussfolgerung.....	50
4.6	Limitationen der Studie.....	51
4.6.1	Zellkultur und UM-Zellmodell	51
4.6.2	TRP-Kanal-Pharmakologie	52
4.6.3	Technische Limitationen	53
5	Quellenverzeichnis	55
	Danksagung	63
	Eidesstattliche Versicherung	64
	Lebenslauf	66
	Publikationen	68

Abkürzungen

BCTC	N-(4-tert-butylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1(2H)-carboxamide
Ca ²⁺	Calcium
[Ca ²⁺] _i	intrazelluläre Calciumkonzentration
CAP	Capsaicin
Cl ⁻	Chlorid
CPZ	Capsazepin
DMSO	Dimethylsulfoxid
FCS	Fetal calf serum
Fura-2/AM	Fura-2/acetoxymethylester
K ⁺	Kalium
PCR	Polymerasekettenreaktion
RPE-Zellen	Retinale Pigmentepithelzellen
RT-PCR	Real Time-PCR
TRP	Transient Rezeptor Potential
TRPV	TRP Vanilloid Rezeptor
TRPV1	TRP Vanilloid Rezeptor Subtyp 1 (Capsaicinrezeptor)
TRPM	TRP Melastatin Rezeptor
TRPM8	TRP Melastatin Rezeptor Subtyp 8 (Mentholrezeptor)
TTT	Transpupilläre Thermaotherapie
SEM	Standard error off the mean (Standardfehler)
UM	uveales Melanom/Aderhautmelanom
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Zusammenfassung

Das Aderhautmelanom ist der häufigste maligne intraokulare Tumor im Erwachsenenalter mit einer Inzidenz von 5.1 Fällen pro 100.000 Einwohner. Die Letalität geht vornehmlich von dessen hoher Metastasierungsrate aus. Dabei ist am häufigsten die Leber, gefolgt von Lunge, Knochen und der Haut betroffen. Die Diagnose ist oft ein in einer Routineuntersuchung gestellter Zufallsbefund, da dieser Tumor sich lange asymptomatisch entwickelt. Bisher konnte die Mortalitätsrate durch keine neue Behandlungsmöglichkeit gesenkt werden. Wie bei allen Typen von Neoplasien können Störungen der zellulären Homöostase zu einer Progression des Tumors führen. Ein wichtiger sekundärer Botenstoff in diesem Zusammenhang ist Calcium, weil es in viele Signalwege der Zelle involviert ist. Zur Familie der calciumregulierenden Kanäle gehören die Transient-Rezeptor-Potential-Ionenkanäle (TRPs), die in Neoplasien fehlreguliert sein können. In dieser Studie wurden in einer malignen Aderhautmelanomzelllinie und in gesunden Aderhautmelanozyten die funktionale Expression der TRP-Subtypen TRP-Vanilloidrezeptor 1 (TRPV1, Capsaicinrezeptor) und TRP-Melastatinrezeptor 8 (TRPM8, Mentholrezeptor) ermittelt und verglichen. Hierfür wurden hochsensitive Methoden wie Calcium Imaging und die planare Patch-Clamp-Technik verwendet. In den gesunden Aderhautmelanozyten ließen sich mit dem TRPV1-Agonisten Capsaicin (CAP) induzierte Ca^{2+} -Einströme messen. Dagegen waren keine Ströme nach TRPM8-Stimulation mit Icilin zu erkennen. Im Vergleich dazu zeigten die malignen Aderhautmelanozyten CAP und Icilin induzierte Ca^{2+} -Einströme sowie erhöhte Ganzzellströme. Die Stromantwortmuster sind charakteristisch für TRPM8- und TRPV1-Expression. Zusätzlich konnten die Calcium- und Stromantworten durch die TRPV1- und TRPM8-spezifischen Blocker Capsazepin (CPZ) und BCTC unterdrückt werden. Die Identifizierung von signifikanten Unterschieden in der funktionalen Expression dieser beiden Kanäle eröffnet neue Möglichkeiten der gezielten Entwicklung neuer Behandlungsmethoden unter möglicher Schonung von gesundem Gewebe.

Dennoch können diese Erkenntnisse nur sehr vorsichtig auf dem lebenden menschlichen Organismus übertragen werden. Zum einen wurden in dieser Studie als Kontrollgruppe als Modell keine menschlichen Aderhautmelanozyten verwendet, sondern Zellen aus dem Schwein isoliert. Zum anderen ist es ein allgemein anerkannter Fakt, dass man In-vitro-Daten nur schlecht auf einen lebenden Organismus übertragen kann. Es braucht

weitere Untersuchungen, um diese Erkenntnisse zu verifizieren und daraus einen klinischen Nutzen zu ziehen.

Abstract

Uveal melanoma is the most common malignant intraocular cancer among adults with an incidence of 5.1 cases per 100.000 inhabitants. The case fatality rate is accounted for by the high risk of metastasis. The most affected organs are the liver, followed by lung, bone and skin. The diagnosis is often found in a routine examination because of the long asymptotically development of this cancer. To diagnose this disease different techniques can be used, which until have not reduced the mortality rate. As with all kinds of neoplasia, dysfunctions of cellular homeostasis may lead to a progression of the cancer. An important second messenger is calcium because it is involved in many signalling pathways within the cell. The family of calcium-regulated channels involves transient receptor potential channels (TRPs), which are often dysregulated in neoplasia. In this study, we compared the malignant uveal melanoma cell line 92.1 with healthy uveal melanocytes from pigs for functional expression of the TRP subtypes TRPV1 (vanilloid receptor, capsaicin receptor) and TRPM8 (melastatin receptor, menthol receptor). For the investigations, we used high sensitive functional assays like calcium imaging and planar patch-clamping. In healthy uveal melanocytes capsaicin, a TRPV1 agonist, induced increases of intracellular calcium and whole-cell currents whereas the TRPM8 agonist icilin did not clearly induce calcium regulation in these cells. In contrast such calcium increase could be stimulated by both, capsaicin and icilin in malignant uveal melanoma cells. The changes in ion current behaviour indicate functional TRPM8 and TRPV1 expression since their activation could be blocked with either capsazepine (CPZ, TRPV1 blocker) or BCTC (TRPM8 blocker). The identification of significant differences in the functional expression of both channels opens new treatment options. Nether the less these new findings can not be easily transferred to a living organism. On the one side, we used uveal cells out of a pig eye. On the other hand, it is problematic to compare in vitro data with a complex human being. There is a need for much more research before a clinical benefit can be achieved.

1 Einführung

1.1 Charakterisierung des Aderhautmelanoms und Therapieoptionen

Die Uvea ist die mittlere der drei Schichten des Auges. Sie unterteilt sich wiederum in einen vorderen und einen hinteren Abschnitt mit unterschiedlichen Funktionen. Zum vorderen Abschnitt gehören die Iris, die die Adaption an verschiedene Lichtverhältnisse steuert, und der Ziliarkörper, der essenziell für die Kammerwasserproduktion und die Akkommodation ist. Der hintere Abschnitt besteht aus der Choroidea, die den größten Teil der Uvea ausmacht und auch als Aderhaut bezeichnet wird. Die Hauptaufgabe der Choroidea ist die Ernährung der weiter innen gelegenen Netzhaut, weshalb sie ein sehr stark durchblutetes Gewebe darstellt. Eine weitere Funktion der Uvea ist die Absorption von Streustrahlen von innen und außen. Dafür ist eine Pigmentierung vorhanden, die individuell unterschiedlich ausgeprägt ist. Die pigmentproduzierenden Zellen werden wie in der Haut Melanozyten genannt. Sie können durch onkogenetische Mutationen zur Entstehung eines Aderhautmelanoms führen, das hoch proliferativ ist und eine hohe Metastasierungsrate aufweist.¹

Es gibt verschiedene Risikofaktoren, die bei der Entstehung eines Aderhautmelanoms eine Rolle spielen. Dazu gehört wie bei den Hautmelanomen eine Vorläuferläsion, genannt Nävus. Nävi sind pigmentierte Läsionen, die prinzipiell benigne sind, jedoch ein erhöhtes Risiko zur Zellentartung haben. Eine regelmäßige Beobachtung ist bei uvealen Nävi besonders wichtig, da suspekter Herde einem Aderhautmelanom ähneln (Abb. 1) und nicht einfach entfernt werden können, wie beispielweise bei Hautläsionen.² Eine operative Behandlung hätte für den Patienten weitreichende Folgen, unter Umständen sogar den Sehverlust. Die jährliche Rate von maligner Entartung eines choroidalen Nävus wird auf 1 von 8.845 Fällen geschätzt.³ Jedoch beträgt die kumulierte Rate für einen 80-jährigen Patienten mit einem Nävus immerhin 1/100, was einen nicht unerheblichen Fakt darstellt.⁴ Ebenfalls ein erhöhtes Risiko für die Erkrankung haben hellhäutige Patienten mit einer hellen Augenfarbe und einer Unfähigkeit, Bräune zu entwickeln.⁵ Dabei scheint eine erhöhte Lichtexposition eine untergeordnete Rolle zu spielen, da sich im Gegensatz zu Hautmelanomen die Inzidenz des Aderhautmelanoms in den letzten Jahrzehnten nicht erhöht hat (Abb. 2).⁶

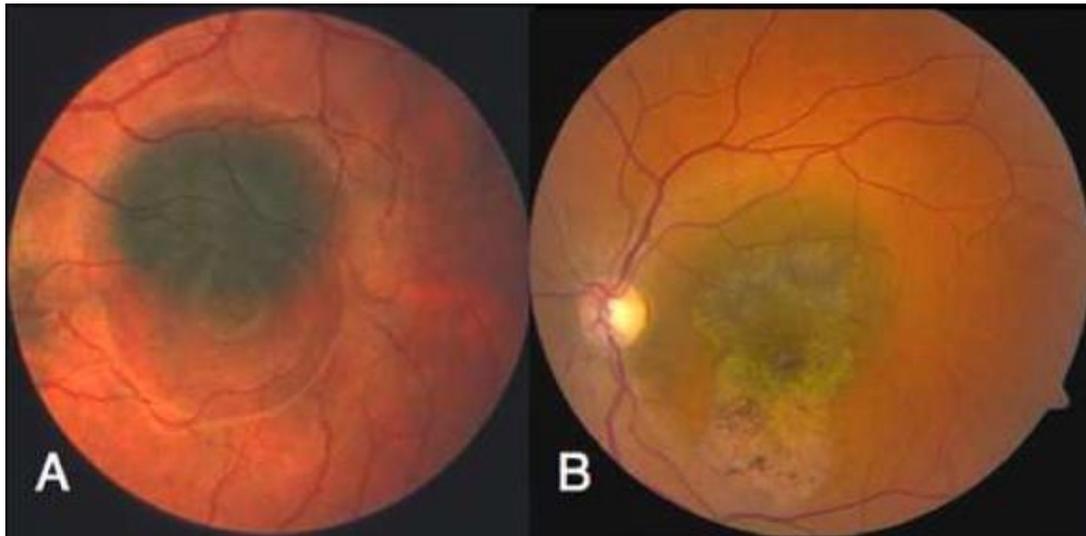


Abb. 1: Choroidaler Nävus beobachtet über 35 Jahre (A) Entdeckt 1970, beim 18-Jährigen findet sich ein submakularer choroidaler Nävus. (B) 2005 zeigt der Nävus desselben Patienten eine leichte Vergrößerung von < 1 mm. Darüberliegend zeigt sich eine chronische Veränderung des retinalen Pigmentepithels²

Das Aderhautmelanom ist der häufigste maligne intraokulare Tumor im Erwachsenenalter mit einer Inzidenz von 5.1 Fällen pro 100.000 Einwohnern in den USA⁶ und der zweithäufigste von Melanozyten ausgehende Tumor nach den Hautmelanomen mit einem Anteil von 5,2%.⁷ Der Tumor kann aus beiden Abschnitten hervorgehen, wobei 90% aller uvealen Tumoren von der Choroidea ausgehen, 7% vom Ziliarkörper und 2% von der Iris.⁸ Damit ist dieser Tumor zwar relativ selten, jedoch durch seine Aggressivität eine lebensbedrohliche Erkrankung. Die Letalität ist vornehmlich auf seine hohe Metastasierungsrate zurückzuführen. Dabei ist am häufigsten die Leber (95%), gefolgt von Lunge (24%), Knochen (16%) und der Haut (11%) betroffen.⁹⁻¹¹ Auch bei lokaler Kontrolle und Behandlung des Primärtumors können noch Jahre später Metastasen auftreten. So wurde gezeigt, dass 5 und 10 Jahre nach der ersten Diagnosestellung gehäufte Metastasierungsraten von 25% und 34% unabhängig von der erfolgreichen Behandlung des Primärtumors auftraten.^{11,12}

Die Diagnose ist häufig ein in einer Routineuntersuchung gestellter Zufallsbefund, da dieser Tumor sich lange asymptomatisch entwickelt. Erst im weiteren Verlauf kann ein schmerzloser Sehverlust durch eine tumorbedingte Netzhautablösung oder neoplastisches Wachstum entstehen. Im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung können Schmerzen infolge einer durch den Tumor ausgelösten Entzündung oder durch die Entstehung eines sekundären Glaukoms auftreten.¹²

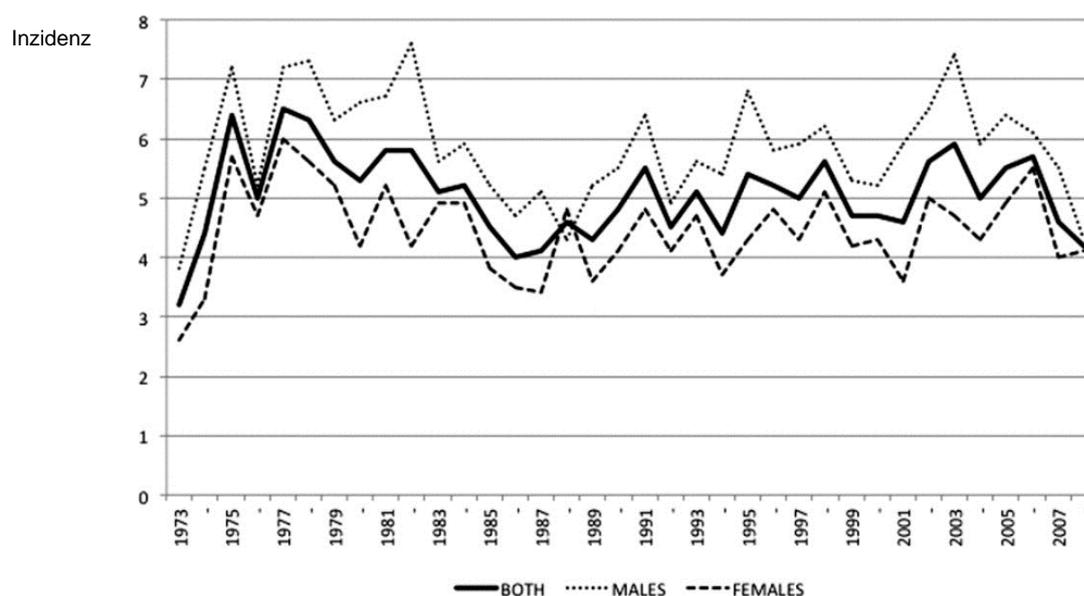


Abb. 2: Altersadjustierte Inzidenz des Aderhautmelanoms von 1973 bis 2008 Rate pro Million Einwohner und adjustiert an die Bevölkerung der USA. ⁶

Um eine Diagnose zu stellen, werden verschiedene Methoden und Techniken eingesetzt. Ein erfahrener Ophthalmologe kann ein Aderhautmelanom mithilfe einer Augenspiegelung (Funduskopie) diagnostizieren. Dabei kann der Augenhintergrund betrachtet werden, wobei ein Melanom sich häufig als erhabene pigmenthaltige Läsion (85%) darstellt (Abb. 3).

Die Prognose hängt vornehmlich von der Dicke des Tumors und seiner genetischen Veränderung ab. Jeder Millimeter, den der Tumor an Dicke zunimmt, geht mit einem um 5% steigenden Risiko für Metastasen einher.¹³ Zusätzlich wurde im Jahr 1996 von Prescher et al. gezeigt, dass das Aderhautmelanom oft eine Monosomie von Chromosom 3 aufweist. Dies korreliert mit einem um 50% gestiegenen Risiko für Metastasen nach 3 Jahren im Gegensatz zu Tumoren mit einer Disomie 3, die ein geringeres Metastasierungsrisiko aufwiesen.^{13,14}

Zur Behandlung des Primärtumors kommen verschiedene Therapiemöglichkeiten infrage. Eine davon ist die Plaque Brachytherapie, bei der eine radioaktive Platte episkleral über dem Tumorgewebe angebracht wird. Dadurch wird ionisierende Strahlung freigesetzt, die die DNS des Tumors zerstört. Eine weitere Möglichkeit ist die Protonentherapie, die ebenfalls auf ionisierender Strahlung basiert. Dazu werden Protonenstrahlen erzeugt, die präzise auf den Tumor fokussiert werden können, womit

eine optimale Dosisverteilung gewährleistet ist. Hierbei kann umgebendes gesundes Aderhautgewebe größtenteils geschont werden. Beide Therapien können zu

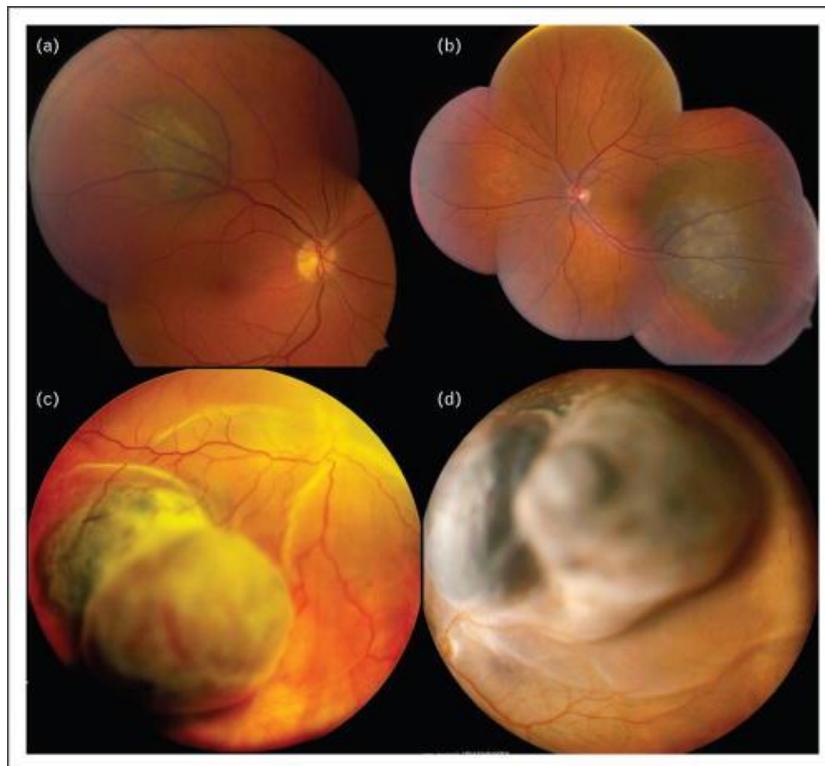


Abb. 3: Aderhautmelanome (a) Kleines Aderhautmelanom mit oranger Pigmentierung und subretinaler Flüssigkeit. (b) Mittelgroßes Aderhautmelanom mit oranger Pigmentierung und subretinaler Flüssigkeit. (c) Großes Aderhautmelanom mit erheblicher Ansammlung von subretinaler Flüssigkeit. (d) Extra großes Aderhautmelanom von pilzförmiger Gestalt und mit subretinaler Flüssigkeit.¹³

Makulopathien, Papillopathien und Neovaskularisierung führen.^{1,15,16} Weiterhin gibt es die transpupilläre Thermotherapie (TTT) als begleitende Zusatztherapie, bei der ein Infrarotlaser durch die geweitete Pupille direkt auf die Tumoroberfläche gerichtet wird. Auf diese Weise werden die Zellen durch Überhitzung zerstört.¹⁷ Leider ist hierbei das Risiko für ein Lokalrezidiv mit 10% nach 3 Jahren und 33% nach 10 Jahren sehr hoch.¹⁸ Dennoch wird die TTT verwendet, um das Rezidivrisiko nach Radiotherapie von 10% auf 3% zu senken.¹⁹ Wenn eine Teilresektion nicht möglich ist, folgt als Ultima Ratio die Enukleation, die jedoch nur eingesetzt wird, wenn die Chancen, die Sehkraft zu erhalten, sehr gering sind.²⁰ Insgesamt wird diese drastische Therapieoption immer seltener gewählt (Abb. 4).

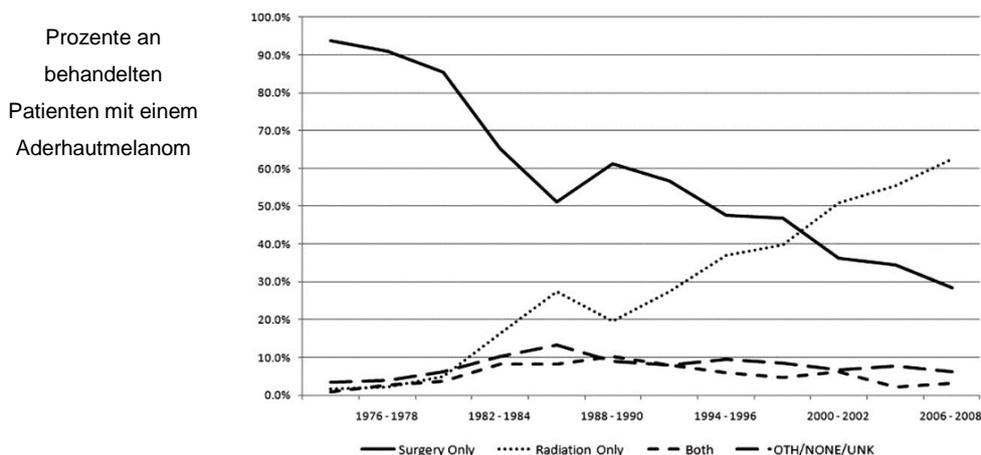


Abb. 4: Trend der Therapie des Aderhautmelanoms von 1973 bis 2008⁶

Eine systemische Therapie ist in Studien bisher jedoch nicht ausreichend belegt.¹⁷ Trotz der zuvor genannten Therapieoptionen konnte die Mortalitätsrate bis heute nicht gesenkt werden. So blieb die 5-Jahres-Überlebensrate in den letzten 3 Jahrzehnten konstant bei 81,6% (Abb. 5).⁶

Dieses wissenschaftliche Defizit macht weitere Forschungen zwingend notwendig, um die Physiologie des Aderhautmelanoms besser zu verstehen. Das Auffinden molekularer Strukturen auf Zellebene kann helfen, pharmakologische Substanzen zu entwickeln, die neue Behandlungsmöglichkeiten eröffnen. Dabei spielen die Calciumregulation und die damit verbundenen Calciumkanäle eine eminente Rolle, was in den folgenden Kapiteln näher beschrieben wird.

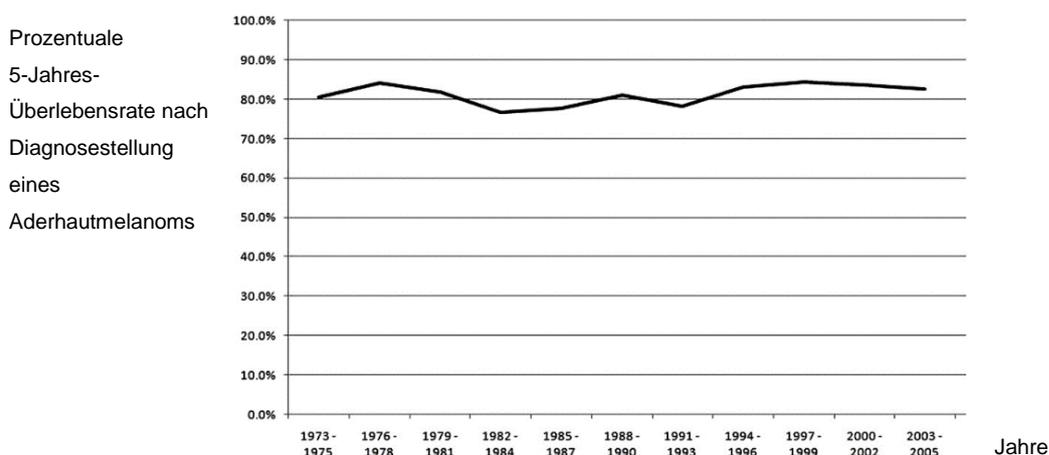


Abb. 5: Relative 5-Jahres-Überlebensrate mit einem Aderhautmelanom von 1973 bis 2006⁶

1.2 Bedeutung von Calcium und dessen Regulation in der Physiologie der Zelle

Calcium ist ein Erdalkalimetall, das an einer Vielzahl von Zellfunktionen beteiligt ist. Es ist ein universaler Überträger biologischer Signale. Drei Eigenschaften stehen dabei im Vordergrund. Zunächst dient Calcium als primärer sowie als sekundärer Botenstoff („second messenger“). Auch besitzt es autoregulative Eigenschaften, wodurch es die Information, die es trägt, selbst regulieren kann. Des Weiteren hat es einen ambivalenten Charakter, da es einerseits essenziell ist für die korrekte Funktionsweise der Zelle und andererseits auch die Apoptose triggern kann, den programmierten Zelltod.²¹ Die Fülle an Funktionen kann u. a. durch die Regulation der verschiedenen Konzentrationen an Calcium ermöglicht werden. Im Extrazellularraum beträgt die Konzentration 1 bis 1,5 mM, während die freie Calciumkonzentration im Intrazellularraum mit 100 nM 10.000-mal geringer ist. Um diesen Gradienten aufrechtzuerhalten, wird die Calciumhomöostase durch calciumpermeable Kanäle, Natrium-Calcium-Austauscher sowie über diverse Pumpen reguliert. Verschiedene Stimulationen können jedoch die Calciumkonzentration im Inneren der Zelle erhöhen. Dazu gehören der Calciumeinstrom über die Zellmembran von extrazellulär oder die Calciumfreisetzung aus intrazellulären Speichern, den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum.²¹

Zu den Strukturen, die die Calciumhomöostase regulieren, gehören vor allem Ionenkanäle. Sie sind in jeder Zelle vorhanden und befinden sich in der Regel an deren Oberfläche (Zellmembran), aber auch auf inneren Zellorganellen. Sie sind an allen wichtigen zellulären Prozessen beteiligt. Dazu gehören u. a. Zellwachstum, Migration, Proliferation, Sekretion und die Aufrechterhaltung des Membranpotenzials. Man kann sie grob beschreiben als Transmembranproteine, die Poren formen, durch die Ionen nach ihren elektrochemischen Gradienten passieren können. Es gibt verschiedene Arten von Ionenkanälen, die man nach der Art der für sie durchlässigen Ionen und nach ihren Aktivierungswegen klassifizieren kann. Eine recht grobe Einteilung ist die nach ihrer Ionenselektivität (z. B. in Na⁺-, K⁺-, Ca²⁺- und Cl⁻-Kanäle).²² Unabhängig von der Öffnungsart können in einem geöffneten Kanal bis zu zehn Millionen Ionen in 1 Sek. passieren.²³

Ionenkanäle können molekulare Strukturen darstellen, die sich als therapeutische Zielstruktur nutzen lassen, nicht nur für Behandlungsmöglichkeiten des

Aderhautmelanoms, sondern auch allgemein gegen mutiertes Gewebe. Unter der Berücksichtigung, dass Tumoren die zweithäufigste Todesursache in Industrienationen darstellen, ist dies ein vielversprechendes Forschungsgebiet.²⁴ In dieser Arbeit werden bestimmte Mitglieder einer großen Gruppe von nicht spannungsabhängigen Ionenkanälen, die sog. *Transient Receptor Potential Channels* (TRPs) näher untersucht. TRPs sind nicht selektive Kationenkanäle, die hauptsächlich calciumpermeabel und in fast allen Geweben und Zelltypen zu finden sind.²⁵ Ihre Aktivierungsmechanismen, die bisher noch nicht vollständig aufgeklärt wurden, sind polymodal. Im menschlichen Körper reagieren TRPs u. a. auf Umgebungsreize wie Geschmack (süß, bitter und umami), Temperaturen wie Wärme, Hitze und Kälte²³, pH-Wert und Osmolarität.²⁶ Auch interagieren sie mit intrazellulären Stimuli wie dem Calcium- und dem Phosphatidylinositol-Signaltransduktionsweg.²⁶ Aufgrund ihrer vielseitigen Funktionen und ihrer Auswirkungen auf die Calciumhomöostase ist es nicht abwegig, dass bestimmte TRPs mit Tumoren in Verbindung gebracht werden. Dazu gehören u. a. TRP-Melastatin-Kanal 8 (TRPM8), TRPM1 und TRP-Vanilloid-Kanal 6 (TRPV6).²⁴ So wurde z. B. eine Hochregulierung der TRPV6-Expression in Prostata-, Brust-, Colon- und Ovarialkarzinomen nachgewiesen.^{24,27,28}

1.3 Transient receptor potential channels (TRPs)

TRPs wurden das erste Mal in einer Mutante der *Drosophila* beschrieben, wobei man bei ihnen Photorezeptoren fand, die auf bestimmte Lichtreize mit nur einem transienten Membranstrom reagierten. Der Wildtyp hingegen reagierte mit einem persistierenden Strom.²⁹ Im Jahr 1989 konnte das hierfür verantwortliche Gen das erste Mal geklont und das Genprodukt als Transmembranprotein identifiziert werden.³⁰ Zurzeit gibt es rund 30 TRPs, die in Säugetieren entdeckt wurden. Man teilt sie auf der Basis ihrer Aminosäuresequenz in sechs Unterfamilien ein: TRPC (canonical), TRPV (vanilloid), TRPM (melastatin), TRPA (ankyrin), TRPP (polycystin) und TRPML (mucolipin)^{25,26,31} (Abb. 6).

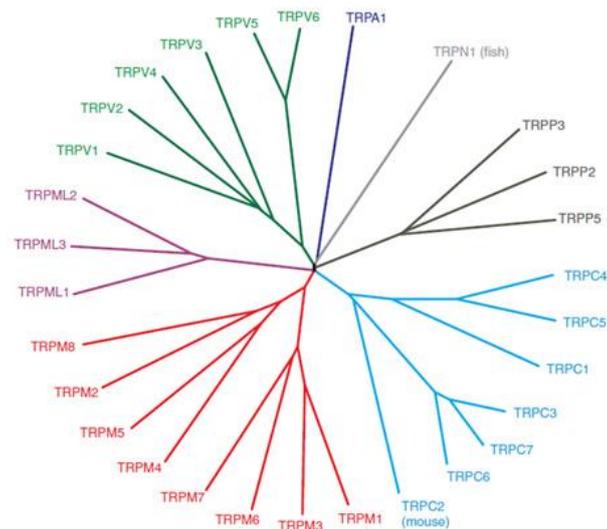


Abb. 6: Die TRP-Familie übernommen von Nilius et al. 2011 Die einzelnen Familien sind durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet. Alle dargestellten TRPs finden sich im Menschen, außer TRPN1, der in Fischen exprimiert wird.³²

Gemeinsam haben sie ihre molekulare Struktur, durch die sie auch identifiziert werden.²⁶ Alle TRPs sind aus sechs Transmembrandomänen aufgebaut, mit einer kationenpermeablen Pore zwischen dem fünften und sechsten Segment, wobei das Carboxyl- und das Aminoende intrazellulär gelegen sind (Abb. 7).²⁶ Die Unterschiede zwischen den einzelnen Kanälen in ihren Unterfamilien bestehen im Aktivierungsweg, ihren physiologischen Funktionen und ihrer Selektivität für Ionen. Die Lokalisation von TRPs kann variieren. Es wird angenommen, dass sie überwiegend in der Plasmamembran lokalisiert sind. Jedoch gibt es Studien, die für z. B. TRPV1 und TRPM8 zeigen, dass sie zusätzlich auf intrazellulären Membranen vorkommen können. Somit sind sie vermutlich auch an der intrazellulären Calciumfreisetzung beteiligt.²⁵

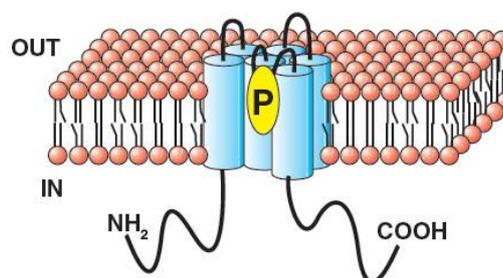


Abb. 7: Die allgemeine Struktur von TRPs Die Kanäle bestehen aus sechs Transmembrandomänen, die eine Pore formen. Die intrazellulär gelegenen Carboxyl- und Aminoenden sind von variabler Länge, je nachdem, um welchen TRP-Kanal es sich handelt.³²

1.4 TRPs in Tumoren

TRPs sind an zahlreichen biologischen Prozessen wie z. B. der Proliferation, dem Zellwachstum sowie der Sekretion beteiligt. Daraus folgt, dass eine Dysfunktion auch zu Neoplasien führen kann.²⁵ In Studien konnte gezeigt werden, dass viele Tumoren mit TRPs assoziiert sind, welche scheinbar einen Einfluss auf die Tumorphysiologie ausüben.²⁴ Während der tumorgenetischen Prozesse kann sich die Zusammensetzung eines oder mehrerer TRPs verändern.^{25,33} Die meisten Veränderungen scheinen nicht mit einer Mutation des Kanales selbst einherzugehen, sondern eher mit einer erhöhten oder verminderten Expression. Bisher ist nicht klar, ob die Veränderung zentraler Bestandteil der Progression des Tumors ist oder ob es sekundär durch andere Veränderungen dazu kommt. Außerdem können TRPs als wertvolle Marker der Progression oder als möglicher Ansatzpunkt für pharmakologische Interventionen dienen. Dabei können TRP-Kanäle gegensätzliche Rollen spielen. Einerseits können sie onkogenetische Eigenschaften aufweisen und Progression sowie Metastasierung beschleunigen, andererseits dienen sie gleichzeitig in anderen Zelltypen als Tumorsuppressoren.³⁴ Ein eindrückliches Beispiel dafür ist die Expression von TRPV2.

TRPV2 kommt praktisch nicht im gesunden Prostatagewebe vor, währenddessen der Kanal in metastatischen androgenresistenten Prostatakarzinomen hochreguliert ist.³⁵ Im Kontrast dazu ist derselbe Kanal im Gehirngewebe hochreguliert, wobei er im tumorös veränderten Gewebe (Glioblastom) fast gar nicht zu finden ist.³⁶ Somit besitzt ein Kanal das Potenzial, sowohl onkogenetisch als auch als Tumorsuppressor zu wirken. Ähnliches gilt auch für den TRPM 8, der als ein möglicher diagnostischer und prognostischer Marker beschrieben wurde.³⁷

Da TRPs auch im sensorischen System eine Rolle spielen und u. a. zur Nozizeption dienen, können sie auch Ansatzpunkte für die Behandlung von Tumorschmerzen sein.²⁵

1.4.1 TRPV1

Die Gruppe der TRPV-(vanilloid)Kanäle beinhaltet sechs Mitglieder (TRPV1-6), wobei der TRPV1 der am besten untersuchte und bekannteste TRP-Kanal ist. Er ist auch als Hitzerezeptor bekannt. Dies beruht auf seinen Aktivierungsmechanismen, zu denen u. a. erhöhte Temperaturen (> 43 °C) gehören. Pharmakologisch kann der Kanal durch den

selektiven Agonisten Capsaicin (CAP), einen Bestandteil von Chilischoten, stimuliert werden.^{31,38} Des Weiteren gibt es viele andere Aktivierungsmechanismen, zu denen u. a. eine Abhängigkeit vom pH-Wertes und eine Aktivierung durch andere zweiwertige (z. B. Ni^{2+}) und dreiwertige Ionen (z.B. Gd^{3+}) gehören.³⁹ Diese Stimulationen lösen eine Depolarisation der Zelle aus und können letztendlich zur Schmerzwahrnehmung führen.⁴⁰ Initial wurde TRPV1 vor allem in sensorischen Neuronen nachgewiesen. Dabei hat sich ergeben, dass TRPV1 in vielen unterschiedlichen Geweben vorhanden ist, von Neuronen bis hin zu nicht neuronalem Gewebe (jedoch in niedrigeren Konzentrationen als in sensorischen Ganglien).³⁹ Analog dazu ist TRPV1 in Zellen der Augenoberfläche exprimiert.⁴¹⁻⁴³

Eine funktionale Aktivität von TRPV1 wurde schon für diverse Tumorzelltypen beschrieben. Dazu gehören z. B. das Retinoblastom⁴⁴, das Prostatakarzinom⁴⁵, der neuroendokrine Tumor⁴⁶ und das Urothelkarzinom⁴⁷. Ähnlich wie im zuvor genannten Beispiel mit dem Kanal TRPV6 verhält es sich auch mit dem aus derselben Untergruppe stammenden Kanal TRPV1. So wurde eine TRPV1-Expression in gesundem Urothelgewebe nachgewiesen⁴⁸, wohingegen die Expression im invasiven Urothelkarzinom nicht mehr nachweisbar war.⁴⁹ Somit wird TRPV1 eine antitumoröse Wirkung zugeschrieben, die durch intrazellulären Calciumanstieg eine Wachstumsinhibition und Apoptose (programmierten Zelltod) auslösen kann. Zusätzlich vermutet man eine Hemmung der Metastasierung.⁴⁷ Im Gegensatz dazu scheint TRPV1 in hochgradigen Astrozytomen vermehrt exprimiert zu werden, wobei im umliegenden Gewebe nur eine schwache Expression nachweisbar ist.⁵⁰ Daraus resultiert ein vermeintliches Problem in der Entwicklung von wirksamen Pharmaka. Durch die Verabreichung eines TRP-Kanal-modulierenden Pharmakons kann es zur Induktion anderer maligner Entartungen kommen. Zum Beispiel spielt die Entwicklung bei einem hoch malignen Glioblastom, das im Median innerhalb von 3 Monaten tödlich endet, die Entwicklung späterer Malignitäten eine untergeordnete Rolle.³⁹

Zusätzlich konnte ein Zusammenhang zwischen TRPV1 und der Apoptose und somit eine antitumoröse Wirkung gefunden werden.⁵¹ So zeigte sich, dass CAP zu einem Untergang von pankreatischen neuroendokrinen Tumorzellen führte. Es konnte die Lebensfähigkeit und die Proliferation reduzieren und die Apoptose stimulieren. Diese Wirkung wird auf eine Störung des mitochondrialen Membranpotenzials und einer inhibierten ATP-Synthese zurückgeführt.⁵² Außer an den neuroendokrinen Tumorzellen lässt sich der Effekt auch an Pankreaskarzinomen feststellen. Hierbei ließ sich eine

dosisabhängige Inhibition des Zellüberlebens und der Induktion der Apoptose in vitro und in vivo an Mäusen konstatieren.⁵³

1.4.2 TRPM8

Ein weiterer Kanal, der in der Ätiologie von diversen Tumoren eine Rolle zu spielen scheint, ist der bereits erwähnte TRPM8. Er gehört zur Gruppe der Melastatin-Kanäle, die aus acht Mitgliedern besteht. Er ist vor allem als Kälte- oder Mentholrezeptor bekannt. Dies lässt bereits auf seine Aktivierungsmechanismen schließen, die aus moderater Kühlung auf unter 23 °C bis 28 °C oder Stimulation durch eine künstliche Kühlungsagenz bestehen. Zu diesen Pharmaka gehören neben Menthol auch Eukalyptol sowie Icilin.⁵⁴

Wie der TRPV1-Kanal ist auch der TRPM8 mit diversen Tumoren assoziiert. Dazu gehört u. a. eine erhöhte Expression in Prostatakarzinomen. Dort wurde der Kanal zum ersten Mal entdeckt und als prostataspezifisches Gen identifiziert.⁵⁵ Im gesunden Prostatagewebe entdeckte man eine eher moderate Proteinexpression von TRPM8, wohingegen sie im Prostatakarzinom stark erhöht ist. Interessanterweise steht die Expression wahrscheinlich im Zusammenhang mit Androgenen, da durch eine Anti-Androgen-Therapie die Expression von TRPM8 erheblich gesenkt werden konnte.^{56,57} Zusätzlich scheint der TRPM8 ein Marker für die Aggressivität des Tumors zu sein. So zeigte sich, dass die Expression in androgenabhängigen Tumorzellen gesteigert ist, währenddessen sie in androgenunabhängigen Zellen und in metastasierten Prostatakarzinomzellen gesunken ist.³³ Weitere Tumoren, die eine TRPM8-Assoziation aufweisen, sind neuroendokrine Tumoren und das Retinoblastom.⁴⁴

Interessant ist auch die Assoziation von TRPM8 zu malignen Melanomen der Haut. Analog zum Prostatakarzinom ließ sich auch bei diesen Tumoren eine erhöhte Expression nachweisen.⁵⁸ So konnte gezeigt werden, dass sich die Vitalität dieser Tumorzellen durch eine TRPM8-Aktivierung reduzieren lässt.⁵⁸ Dies unterstreicht die Wichtigkeit der Erforschung dieses Kanalsubtypen auch bei Aderhautmelanomen.

1.4.3 Genexpression von TRPM8 und TRPV1 in gesunden und in Tumorzellen

Bevor eine funktionelle Untersuchung durchgeführt wird, spielt der Nachweis der Genexpression eine große Rolle. Hierzu führte die Arbeitsgruppe von Mergler et al. zuvor eine Polymerasekettenreaktion (PCR) durch. Dabei konnte ein mRNA-Signal sowohl von TRPV1 als auch von TRPM8 in der Aderhautmelanomzelllinie 92.1 nachgewiesen werden.⁶¹ In gesunder Aderhaut war eine TRPM8-Expression nur schwach darstellbar, wobei die TRPV1-Expression eindeutig war (Abb. 8).⁶¹ Auf dieser Grundlage wurde eine funktionelle Untersuchung der Kanäle im gesunden und im tumorös veränderten Gewebe der Aderhaut durchgeführt.

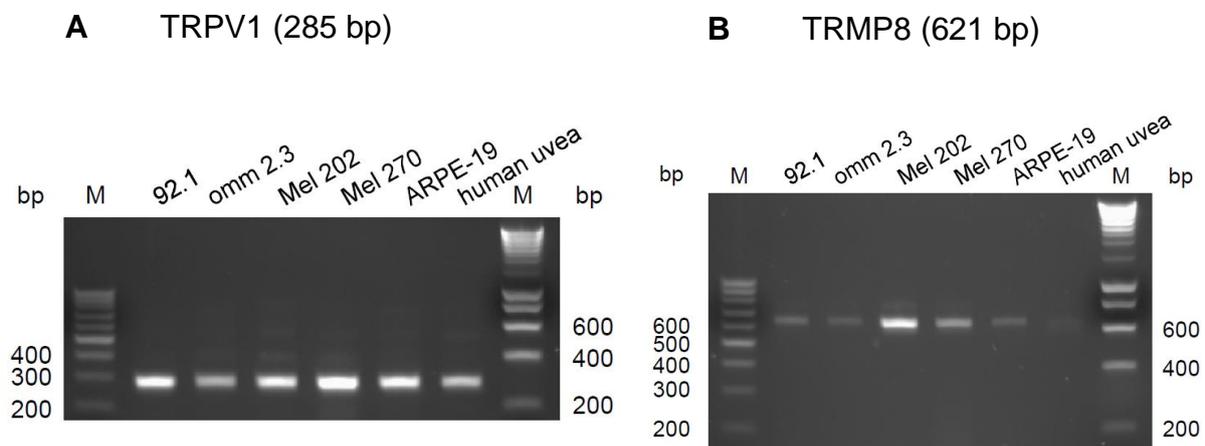


Abb. 8: TRPV1- und TRPM8-Genexpression in humanen Aderhautmelanomzelllinien und in gesunder humaner Aderhaut (A) RT-PCR nebeneinander unter denselben Bedingungen finden sich die Aderhautmelanomzelllinien 92.1, omm 2.3, Mel 202, Mel 270, die humane retinale Pigmentepithelzelllinie ARPE-19 und gesunde Aderhaut. TRPV1-Expression konnte in allen Aderhautmelanomzelllinien, ARPE-19 und gesunder Aderhaut nachgewiesen werden. (B) TRPM8-Expression konnte ebenfalls in allen Aderhautmelanomzelllinien und ARPE-19 nachgewiesen werden. Der Nachweis für die Expression in gesunder Aderhaut konnte nur schwach erbracht werden.⁶¹

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, herauszufinden, welche mögliche Bedeutung den TRP-Kanälen TRPV1 und TRPM8 im Aderhautmelanom zukommt. Beide Kanäle wurden in den zuvor genannten Tumoren beschrieben und konnten mit der Aggressivität der Erkrankung in Verbindung gebracht werden. Informationen über das Aderhautmelanom, die Aussagen über eine mögliche therapeutische Intervention oder auch eine Prognoseeinschätzung liefern, können somit sehr wertvoll sein. Mit hochsensitiven Messmethoden kann nicht nur eine Aussage über die Expression getroffen, sondern vielmehr auch auf deren Funktion innerhalb der Zelle geschlossen werden.

Die Ziele der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente lauten daher:

- 1) In vitro fluoreszenzoptische und elektrophysiologische Charakterisierung von TRPV1 und TRPM8 im uvealen Melanom (UM) unter Verwendung einer etablierten UM-Zelllinie
- 2) Analyse von Unterschieden zwischen humanen UM-Zellen und gesunden Aderhautmelanozyten aus Schweineaugen

Die Arbeitsgruppe um Mergler et al. in der Forschungseinrichtung der Klinik für Augenheilkunde an der Charité – Universitätsmedizin Berlin ist nach jetzigem Kenntnisstand die erste, die die Expression von TRPV1- und TRPM8-Kanälen in Aderhautmelanomzellen beschrieben hat. Durch die nähere Erforschung der funktionalen Expression dieser TRPs werden wichtige Erkenntnisse der Pathophysiologie des Aderhautmelanoms erwartet. Deren spezifische Charakterisierung soll dazu beitragen, einen neuen Ansatzpunkt für eine mögliche Modulation der Zellproliferation und der Apoptose zu erschließen.

Für die Untersuchungen wurden zwei funktionelle Methoden angewendet:

- a) Calcium Imaging (Fura-2/AM)
- b) Planare Patch-Clamp-Technik

Beide Methoden sind für die funktionelle Charakterisierung von Ionenkanälen sehr gut geeignet und wurden in den Laboren der Experimentellen Ophthalmologie angewandt.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Lösungen

Kulturmedium für die zu untersuchenden Zellen:

500 ml RPMI-1640 Kulturmedium mit L-Glutamin (Life Technologies Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland und Biochrom AG, Berlin, Deutschland), 2 ml Penicillin /Streptomycin (100 µg/ml) (Gibco Invitrogen, Darmstadt, Deutschland), 50 ml fetales Kalbserum (FCS) (10% Zielkonzentration) (PAA GmbH, Pasching, Österreich) und PBS zum Waschen der Zellkultur: 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 12 mM PO₄³⁻.

Accutase-Lösung:

500 µM Accutase (PAA GmbH, Pasching, Österreich) wurde verwendet in einer 25-ml-Flasche, um die Zellen zu lösen. Für die Zellpassage wurden die Zellen verdünnt und für die Patch-Clamp-Technik in einer Suspension weiterverwendet.

Zusammensetzung der Lösung für das Fluoreszenz-Calcium-Imaging:

Ringer-ähnliche Lösung: 150 mM NaCl, 6 mM CsCl, 1 mM MgCl₂, 1.5 mM CaCl₂, 10 mM Glukose und 10 mM HEPES (pH eingestellt auf 7.4). Kalium wurde durch Cäsium ersetzt, um mögliche Kaliumströme zu blockieren.

Zusammensetzung der intrazellulären Lösung für die Patch-Clamp-Messungen:

50 mM CsCl, 10 mM NaCl, 2 mM MgCl₂, 60 mM CsF, 20 mM EGTA und 10 mM HEPES (pH eingestellt auf 7.2 mit KOH) (Osmolarität: 288 mOsMol). Cäsium blockiert nach außen gerichtete Ströme von Kalium und die Hydrathülle von Fluorid blockiert mögliche Anionen-Chlorid-Kanäle. Diese Lösung wurde von der Firma Nanion entwickelt, um nicht selektive Kationenströme speziell mit der planaren Patch-Clamp-Methode zu messen (Nanion Technologies, München, Deutschland).

Zusammensetzung der extrazellulären Lösung für die Patch-Clamp-Messungen:

140 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 5 mM D-Glukose-Monohydrat und 10 mM HEPES (pH eingestellt auf 7.4 mit NaOH) (Osmolarität: 298 mOsMol). Diese Lösung wurde ebenfalls von der Firma Nanion entwickelt und kann u. a. auch für die Messung von nicht selektiven Kationenkanalströmen verwendet werden (Nanion Technologies, München, Deutschland).

Zusammensetzung der extrazellulären Seal-Enhancer-Lösung:

80 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 35 mM CaCl₂ und 10 mM HEPES (pH eingestellt auf 7.4 mit HCl) (Osmolarität: 298 mOsmol). Auch diese Lösung wurde von der Firma Nanion entwickelt, um die Dichtigkeit der Verbindung zwischen Zelle und Mikrochip zu erhöhen (Nanion Technologies, München, Deutschland).

Chemikalien:

CAP, CPZ und Icilin wurden von Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, USA) erworben. Fura-2AM (Fura-2/acetoxymethylester) und BTC wurden von TOCRIS Bioscience (Bristol, Großbritannien) bezogen. Alle anderen Substanzen wurden bei Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) gekauft. Alle Substanzen wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst, wobei die DMSO-Konzentration 0.1% nicht überstieg.

2.2 Zellkultur

Um die Eigenschaften des Aderhautmelanoms zu charakterisieren, wurde die etablierte Zelllinie namens 92.1 verwendet. Sie wurde freundlicherweise von Martine Jager und Kollegen (Leiden Universität; Niederlande) bereitgestellt. Diese Zelllinie wurde in deren Labor etabliert und stammt von einem primären Aderhautmelanom.⁵⁹ Sie gilt als gut charakterisiert und wurde schon für mehrere Studien verwendet.^{60,61}

Um eine möglichst hohe Vergleichbarkeit zu erreichen, wurden für die gesunden Aderhautmelanozyten Zellen aus Schweineaugen isoliert. Dabei diente ein Protokoll von Monika Valtink und Katrin Engelmann als Vorlage für die Präparation.⁶² Die erhaltene Primärzellkultur wurde zur Messung mittels der Calcium-Imaging-Technik verwendet.

Die Kultivierung der Zellen wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen beschrieben.^{59,61}

Die Zellen wurden in einem Zellkulturmedium (RPMI-1640) mit 10% FCS und Antibiotika bei einer Luftfeuchtigkeit von 80%, einer Temperatur von 37 °C und in 5% CO₂ kultiviert. Für die Calciummessungen wurden die Zellen unter denselben Bedingungen auf Glasplättchen gezüchtet. Für die Patch-Clamp-Aufnahmen und die Zellpassagierung wurden die Zellen in eine Suspension gebracht. Für das Ablösen der Zellen wurde Accutase verwendet, wobei die chemische Reaktion durch die Zugabe von serumhaltigem Zellkulturmedium gestoppt wurde. Daraufhin wurden die Zellen bei 800 Umdrehungen pro Min. für 5 Min. zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen in einem

Verhältnis von 1:10 in T25-Flaschen ausgesät. Das Medium wurde dreimal in der Woche gewechselt. Der früheste Zeitpunkt der Messungen lag 24 Stunden nach der Aussaat.

2.3 Calcium Imaging

Calcium Imaging ist eine etablierte und hochsensitive Methode, um sehr kleine Änderungen der intrazellulären Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) in kultivierten Zellen zu detektieren.⁶³ Um die Änderung der Calciumkonzentration messen zu können, wurden die Zellen zuvor mit dem calciumsensitiven Fluoreszenzfarbstoff Fura-2/AM inkubiert. Nachdem dieser über die Zellmembran diffundiert ist, bildet er in der Zelle Chelatkomplexe mit einer hohen Selektivität für Calcium.⁶⁴ Die Bindung an Calcium führt zu einer Strukturveränderung des Farbstoffmoleküls, wodurch die Fluoreszenzeigenschaften verändert werden. Diese Änderungen können mithilfe eines Photomultipliers (Hamamatsu, Japan) und einer Fluoreszenzdetektionseinheit gemessen werden. In dieser Arbeit wurden die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2/AM für 20 bis 40 Min. bei 37 °C vorinkubiert. Dabei wurden die Zellen im Medium mit einer Fura-2/AM-Konzentration von 1 bis 4 μM inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Glasplättchen mit den darauf befindlichen Zellen in der oben genannten ringerähnlichen Lösung gewaschen (siehe Kapitel 2.1). Diese stoppte den Färbeprozess und entfernte gleichzeitig lose Zellen und Zellbestandteile. In manchen Experimenten wurden die Zellen zuvor für 30 bis 60 Min. mit verschiedenen Calciumkanalantagonisten (z. B. 20 μM CPZ oder 10 μM BCTC) inkubiert, um deren Auswirkungen auf bestimmte TRP-Kanäle darzustellen. Für diesen Zweck wurden diese Antagonisten dem Zellkulturmedium vor der Fura-2/AM-Gabe hinzugefügt. Von Bedeutung war, dass alle Messlösungen mit diesem Zusatz inkubiert wurden, um eine erneute Kanalaktivierung zu vermeiden. Das Glasplättchen mit den angefärbten Zellen wurde dann in eine Badkammer gegeben, die ebenfalls die ringerähnliche Lösung enthält. Diese Kammer befand sich auf dem Objektisch des Mikroskops (Olympus BW50WI, Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Deutschland) (Abb. 9). Nach einigen Minuten konnten sich die Zellen an die Raumtemperatur adaptieren (ca. 22 °C) und es konnte für die Messung eine Gruppe von grün fluoreszierenden Zellen ausgewählt werden (Abb. 10). Fura-2/AM weist zwei spezifische Absorptionsmaxima auf, die sich bei 340 nm und 380 nm befinden. Das Emissionsmaximum liegt bei 510 nm. Das Verhältnis (Ratio) (f_{340}/f_{380}) korreliert direkt



Abb. 9: Fotos vom Calcium-Imaging-Labor Die Calcium-Imaging-Apparatur der AG Mergler steht in der Forschungsabteilung der Klinik für Augenheilkunde an der Charité Universität – Campus Virchow Klinikum. Dieses Labor wurde verwendet, um die Experimente durchzuführen. Das obere rechte Bild zeigt das Photometrie-Setup, das aus einem Mikroskop, einem Photomultiplier und einer Kamera besteht. Die Experimente fanden in Dunkelheit statt, um Ausbleichprozesse zu vermeiden. Es wurde nur eine schwache Lampe eingesetzt, um ein akkurates Pipettieren zu ermöglichen. Das untere rechte Bild zeigt die Zellkulturbank, in der die Zellen präpariert wurden (Fotos A. Böhm).

mit der $[Ca^{2+}]$.⁶⁴ Das digitale Photometrie-Imaging-System (T.I.L.L. Photonics, München, Deutschland) diente zur Aufzeichnung der Fluoreszenzsignale bei diesen beiden Wellenlängen. Zusätzlich wurden für die Messungen ein Photomultiplier, ein Kameraverstärker (beides von Hamamatsu, Japan) und die spezielle Aufzeichnungs- und Auswertungssoftware TIDA (HEKA, Lamprecht, Deutschland) verwendet.

Zunächst wurden unabhängige Kontrollmessungen durchgeführt (10 Min.), um die Calciumhomöostase zu prüfen (Ca^{2+} -Basislinie). Die weiteren Messungen dauerten ebenfalls 10 Min., wobei in den ersten 3 Min. keine Stimulation erfolgte und

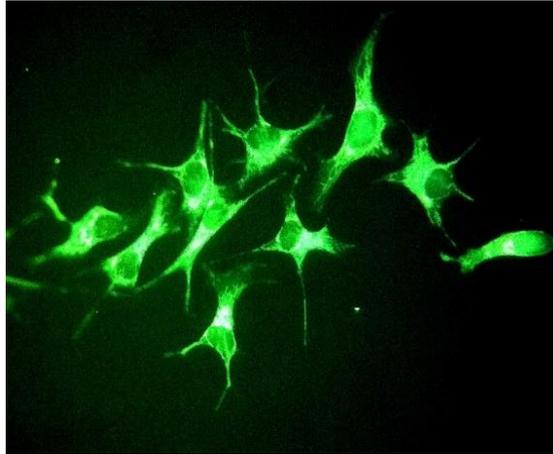


Abb. 10: Mikroskopische Darstellung von Aderhautmelanomzellen (92.1) nach der Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fura-2/AM (Vergrößerung x 400)⁶¹

erneut die Ca^{2+} -Basislinie aufgezeichnet wurde (Kontrolle). Nach 3 Min. (Stoppuhr) wurden die verschiedenen Pharmaka hinzugefügt (z.B. 20 μM CAP, 20 μM Icilin). Die Fluoreszenz wurde gleichzeitig gemessen und von der TIDA-Software aufgezeichnet.

2.4 Planare Patch-Clamp-Technik

Die Patch-Clamp-Technik^{65,66} ist eine hochempfindliche Methode zur Messung der Funktionen von Ionenkanälen. Sie kann zur Messung eines winzigen Membranabschnitts („Patch“) bis hin zur gesamten Zellmembran angewandt werden. Dabei werden kleinste Veränderungen des Ionenstroms registriert, die durch in millionstel Sek. stattfindenden Formveränderungen der Ionenkanäle ausgelöst werden. Mithilfe dieser Messtechnik können sehr kleine Ströme in der Größenordnung von tausendmilliardstel Ampere an Zellmembranen registriert werden, was einen Durchbruch in der Ionenkanalforschung darstellt. Erwin Neher und Bert Sakmann waren die Erfinder dieser bahnbrechenden Messmethode und erhielten für ihre Forschung 1991 den Nobelpreis für Physiologie.^{67,68} Bei der vorherrschenden klassischen Patch-Clamp-Technik wurden für die einzelnen Messungen verschiedene Glasmikropipetten (Patchpipetten) verwendet, die mittels eines Elektrodenziehgerätes hergestellt wurden. Jede Pipette wurde durch ihre Wandstärke und ihren Widerstand charakterisiert.⁶⁶ Die Untersuchung benötigte sehr viel Geschick des Experimentators, der unter dem Mikroskop eine geeignete Zelle suchen musste und

diese individuell gemessen hat. In der vorliegenden Arbeit wurde für die elektrophysikalischen Aufzeichnungen von Ganzzellströmen die neuere und effizientere planare Patch-Clamp-Technik (Port-a-Patch®, Nanion, München, Deutschland) gewählt (Abb. 11).^{67,69} Hierfür wurden spezielle Mikrochips mit einem Widerstand von rund 3 bis 3.5 M Ω verwendet, die mit Nanotechnologie hergestellt wurden. Vor Beginn der Messung wurde auf die Innenseite des Mikrochips intrazelluläre Lösung (siehe Kapitel 2.1) pipettiert (Osmolarität: 288 mOsmol). Daraufhin wurde der Chip auf den Patch-Clamp-Halter aufgeschraubt und danach die extrazelluläre Lösung (siehe Kapitel 2.1) auf die Außenseite des Mikrochips pipettiert. Für die Messung wurde eine Zellsuspension mit den UM-Zellen zu der extrazellulären Lösung hinzugegeben und gleichzeitig die Software gestartet. Das führte zum Starten einer Pumpe, die einen negativen Druck ausübt, um eine einzelne Zelle auf die Öffnung des Mikrochips zu platzieren und mit dem elektrischen System zu verbinden (Cell-attached-Konfiguration). Nachdem der Kontakt zwischen der Zelle und dem Chip mit einer sog. Seal-Enhancing-Lösung etabliert wurde (Seal), führten weitere negative Druckimpulse zum Einbruch in die sog. Ganzzellkonfiguration (Abb. 12). Dies ermöglichte die Messung von Strömen über die gesamte Zellmembran. Die Ströme wurden mithilfe eines Patch-Clamp-Verstärkers (HEKA, EPC 10) in Verbindung mit der Patchmaster-Version-2.6-Software für Windows (HEKA, Lambrecht, Deutschland) aufgezeichnet. Die Membrankapazität (C_m) und der Zugangswiderstand (R_s) der UM-Zellen wurden ebenfalls über die Software berechnet und durch den Patch-Clamp-Verstärker kompensiert. Der durchschnittliche Zugangswiderstand (R_s) betrug 34 ± 3 M Ω ($n = 10$) und die durchschnittliche Membrankapazität lag bei (C_m) 9 ± 2 pF ($n = 10$). Alle Experimente wurden bei konstanter Raumtemperatur (ca. 22 °C) in einem klimatisierten Raum durchgeführt. Für die Registrierung der Stromantworten wurden die Zellen vorher mit unterschiedlichen Spannungsprotokollen stimuliert. Einerseits wurden jeweils für eine Dauer von 400 ms Spannungsstufen von -60 bis +130 mV in 10-mV-Schritten appliziert (Stufenprotokoll). Andererseits wurden Zellen über Spannungsrampen von -60 bis +130 mV (stetig, ohne Spannungsstufen) für eine Dauer von 500 ms stimuliert. Da die Einzelzelle nicht immer optimal mit dem Chip verbunden war, entstanden sog. Leckströme, die durch die Lücke bzw. Lücken zwischen Chip und Zelle flossen. Über den Verstärker und die Software konnten diese Ströme größtenteils kompensiert werden. Sobald der Anteil dieser Ströme über 100 pA lag, wurden die Patch-Clamp-Aufzeichnungen verworfen. Für eine bessere Vergleichbarkeit der Messung wurde die Stromdichte ([pA/pF]) berechnet (Normalisierung), wobei die Zellmembrankapazität

ungefähr mit der Zellgröße korrelierte. Hierfür wurde die Stromamplitude (μA) durch die Zellmembrankapazität dividiert (pF), die zuvor über den Verstärker gemessen und aufgezeichnet wurde.

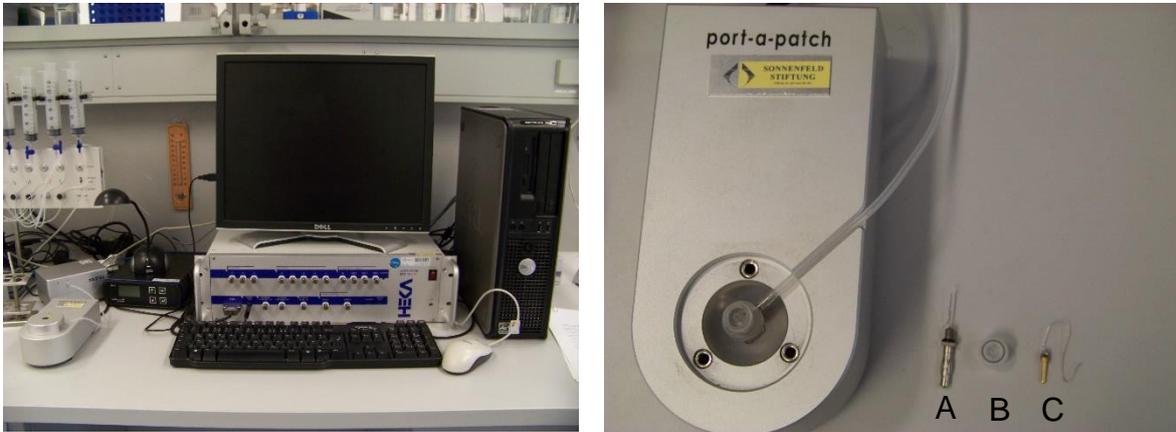


Abb. 11: Fotos des Planar-Patch-Clamp-Systems Die Planar-Patch-Clamp-Apparatur der AG Mergler steht in der Forschungsabteilung der Klinik für Augenheilkunde an der Charité Universität – Campus Virchow Klinikum. Dieses Labor wurde verwendet, um die Patch-Clamp-Experimente durchzuführen. Die Apparatur (Port-a-Patch, Nanion, München, Deutschland) besteht aus einem Mikrochiphalter, zwei Elektroden, einer Pumpe, einem Verstärker und einem Computer. (A) Intrazelluläre Elektrode (B) Mikrochip (C) Extrazelluläre Elektrode (Fotos A. Böhm)

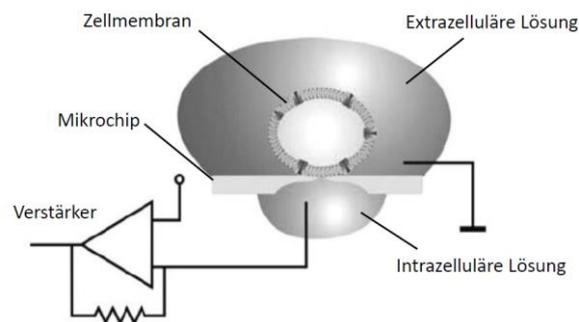


Abb. 12 Vereinfachte schematische Darstellung der Mikrochipeinheit⁶⁹

2.5 Datenanalyse und Statistik

Bei jedem Experiment steht die Anzahl der Einzelexperimente in Klammern daneben und ist mit einem „n“ markiert. Diese Angabe findet sich in allen Grafiken. Alle Werte sind mit ihrem Standardfehler angegeben (\pm SEM). Wenn die Werte der Gaußschen Normalverteilung entsprachen, wurde zur Bestimmung der statistischen Relevanz der sog. parametrische Student's t-Test und ansonsten der nicht parametrische Test verwendet (Mann-Whitney-Test). Der gepaarte t-Test wurde benutzt, um Beobachtungen zu analysieren, die aufeinander aufbauen (z. B. die Messung des $[Ca^{2+}]_i$ vor und nach Zugabe eines Pharmakons). Bei Normalverteilung wurde der Student's t-Test eingesetzt, ansonsten der nicht parametrische Wilcoxon-Test. Der gepaarte t-Test ist in allen Grafiken mit einem „*“ markiert. Um zwei unterschiedliche Reihen von Experimenten zu analysieren, wurde der ungepaarte t-Test verwendet (z. B. die Messung des $[Ca^{2+}]_i$ nach der Zugabe eines Pharmakon versus eines anderen Pharmakons zu einem bestimmten Zeitpunkt). Der ungepaarte t-Test ist in allen Grafiken mit einem „#“ markiert. Der Grad der Signifikanz wird durch die Anzahl der Zeichen verbildlicht. */# korreliert mit einem p-Wert $< 0,05$; **/## korreliert mit $< 0,01$, wohingegen ***/### mit $< 0,005$ korreliert. Alle statistischen Analysen und die Erstellung der Diagramme wurden mit Sigma Plot Version 11.0 bis 13.0 (Systat Software, San José, Kalifornien, USA) und GraphPad Prism Version 5 (GraphPad Software, Kalifornien, USA) ausgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Zellmorphologie der Aderhautmelanozyten und der 92.1-Zellen

Für die Messung der Aderhautmelanozyten aus dem Schweineauge wurde eine Primärzellkultur angelegt (siehe Kapitel 2.2). Die Abbildung 13 A zeigt eine lichtmikroskopische Aufnahme dieser Kultur nach der ersten Zellpassage. Man erkennt noch vorhandenes Pigment als dunkle Stellen. Die Zellen weisen eine unregelmäßige, teils längliche Struktur auf. Es besteht ein starker Zell-Zell-Kontakt. Die etablierte Aderhautmelanomzelllinie 92.1 diente für die Messungen des Tumorgewebes und wurde wie oben beschrieben kultiviert (Abb. 13 B). Die 92.1-Zellen zeichnen sich ebenfalls durch eine unregelmäßige Form aus. Die Zellen liegen selektierter und eher einzeln als im Verbund. Es zeigen sich multiple Ausläufer der Zellen. Morphologisch weisen beide Zellen Gemeinsamkeiten und Unterschiede auf. Beide Zellkulturen besitzen Ausläufer, die anscheinend den Kontakt zu anderen Zellen suchen. Jedoch sind die Melanozyten aus der Primärzellkultur von der Form her an sich regelmäßiger. Sie variiert in ihrer äußeren Darstellung von eher rund bis langgestreckt, jedoch sehen die Zellen an sich homogen und symmetrisch aus. Die Form der Tumorzellen scheint im Vergleich dazu unregelmäßig und ungeordnet mit zwei bis drei Ausläufern. Keine Tumorzelle ist symmetrisch. Die Ausläufer verzweigen sich scheinbar willkürlich in alle Richtungen.

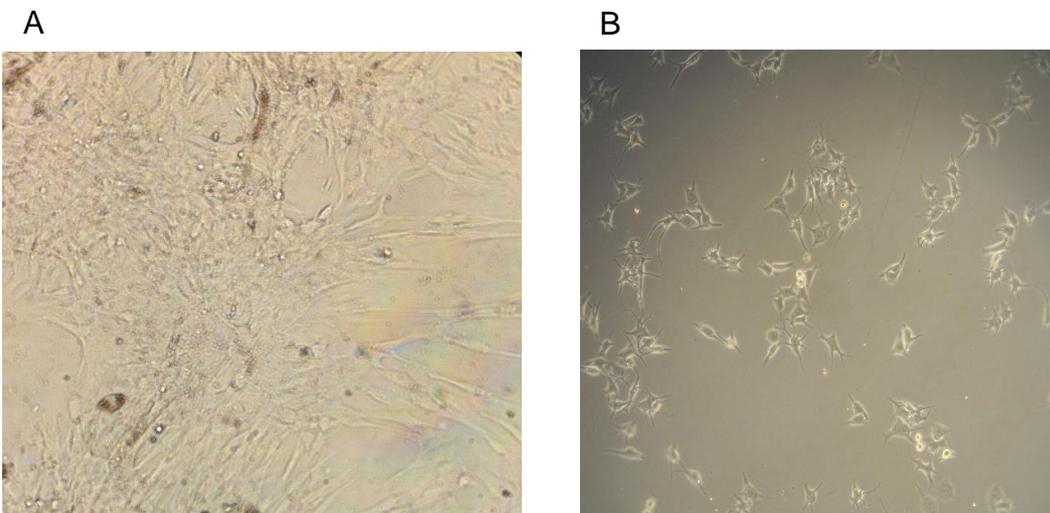


Abb. 13: Lichtmikroskopische Aufnahmen von (A) Aderhautmelanozyten vom Schweineauge und von (B) Aderhautmelanomzellen (92.1) (Vergrößerung x 200; freundlicherweise bereitgestellt von Mergler et. al)

3.2 Fluoreszenzoptische Messung der Aderhautmelanozyten

3.2.1 Capsaicin erhöht die $[Ca^{2+}]_i$ in gesunden Zellen

Die folgenden Experimente wurden durchgeführt, um die elektrophysiologischen Eigenschaften von Aderhautmelanomzellen (92.1) zu untersuchen und sie mit denen von physiologisch gesunden Aderhautmelanozyten zu vergleichen. Für die Gewinnung von Kontrolldaten wurden Aderhautmelanozyten aus gesunden Schweineaugen isoliert (siehe Kapitel 2.2), um mögliche Unterschiede festzustellen. Humanes gesundes Material stand der Arbeitsgruppe aus ethischen Gründen nicht zur Verfügung. In den folgenden Experimenten wurde die in Kapitel 2.6. erwähnte Calcium-Imaging-Technik verwendet, um Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration in den Aderhautmelanozyten nach Zugabe von Capsaicin (CAP) zu registrieren.

Die Abbildung 14 A zeigt nach 590 Sek. einen durch 20 μ M CAP ausgelösten Fluoreszenzratioanstieg (f_{340}/f_{380}) von $1,200 \pm 0,001$ (Basallinie) auf $1,215 \pm 0,004$ (\pm SEM; $n = 7$; oberer Graph mit gefüllten Kreisen). Dieser Anstieg der Fluoreszenzratio verläuft proportional zum Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ ⁶⁴ und ist signifikant ($p < 0,05$; Abb. 14 B). Unter Kontrollbedingungen blieb die $[Ca^{2+}]_i$ konstant (unterer Graph mit offenen Kreisen).

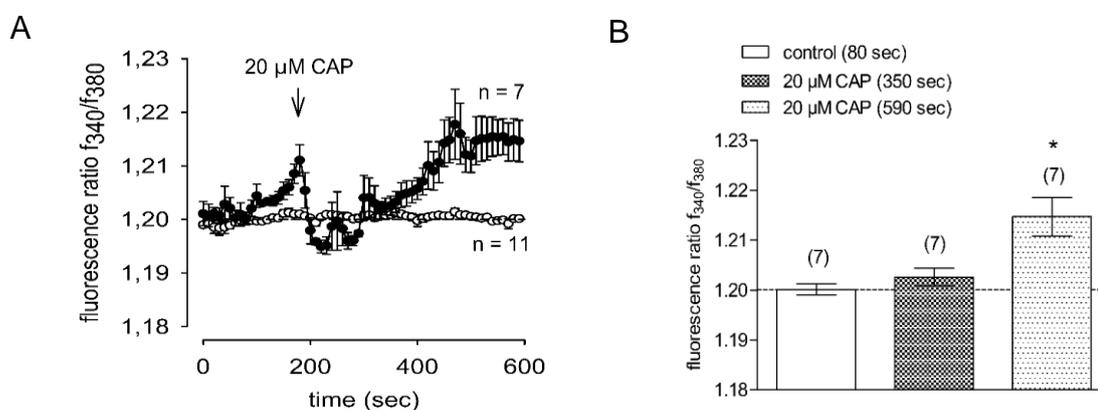


Abb. 14: Effekt von CAP auf die $[Ca^{2+}]_i$ in gesunden Aderhautmelanozyten vom Schweineauge Die Zugabe von CAP erfolgte zum mit dem Pfeil markierten Zeitpunkt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von 7 bzw. 11 Experimenten angegeben ($n = 7 - 11$). (A) Die Zellen wurden vor und nach der Applikation von 20 μ M CAP (gefüllte Kreise; $n = 7$) bzw. ohne eine Stimulation (Basallinie; offene Kreise; $n = 11$) gemessen. CAP führte zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ in den Aderhautmelanozyten. (B) Zusammenfassung der Experimente mit CAP in Aderhautmelanozyten. Die Sterne (***) zeigen die signifikanten Unterschiede ($p < 0,01 - 0,05$; gepaarter Student t-Test) zwischen der Kontrolle (Ca^{2+} Basislevel bei 80 Sek.) und der Applikation von CAP (bei 350 Sek. und 590 Sek.).

3.2.2 Icilin ohne Effekt auf die $[Ca^{2+}]_i$ in gesunden Zellen

Zum weiteren Vergleich der unterschiedlichen Zelltypen wurde die Primärzellkultur aus gesunden Aderhautmelanozyten ebenfalls mittels Calcium-Imaging auf eine Icilinreaktion hin getestet. Nach Zugabe von 20 μ M Icilin konnte kein signifikanter Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ registriert werden (Abb. 15). Das Calciumniveau war nach 10 Min. stabil in der Höhe von $1,202 \pm 0,001$ nach 150 Sek. (\pm SEM; $n = 8$; $p > 0,10$) und $1,204 \pm 0,02$ (\pm SEM; $n = 8$; $p > 0,10$) (Abb. 15 A; obere Kurve mit gefüllten Kreisen). Unter Kontrollbedingungen konnte ein ähnlicher Verlauf dargestellt werden (untere Kurve mit offenen Kreisen).

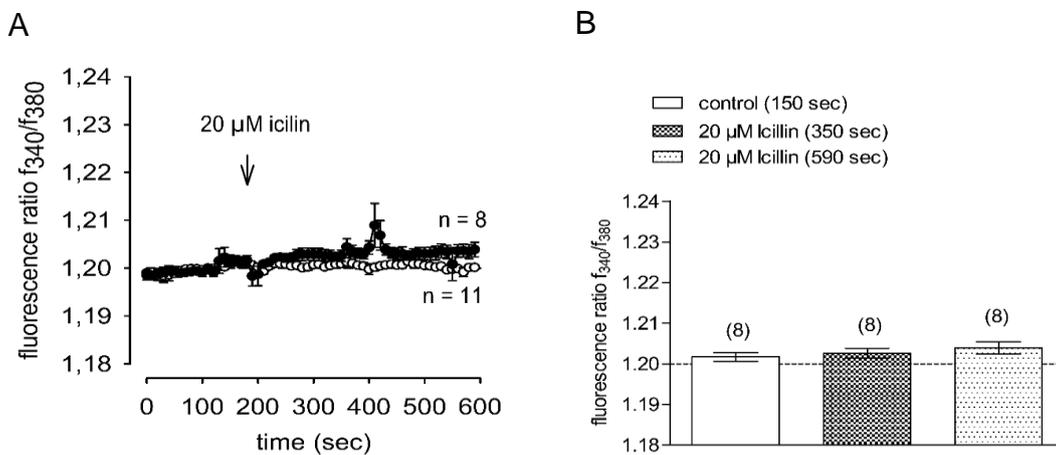


Abb. 15: Effekt von Icilin auf die $[Ca^{2+}]_i$ in gesunden Aderhautmelanozyten vom Schweineauge Die Zugabe von Icilin erfolgte zum mit dem Pfeil markierten Zeitpunkt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM aus 8 bzw. 11 Experimenten angegeben ($n = 8 - 11$). (A) Die Zellen wurden vor und nach der Applikation von 20 μ M Icilin (gefüllte Kreise; $n = 8$) bzw. ohne eine Stimulation (Basallinie; offene Kreise; $n = 11$) gemessen. Icilin führte zu keinem signifikanten Anstieg von der $[Ca^{2+}]_i$ in Aderhautmelanozyten (B) Zusammenfassung der Experimente mit Icilin in Aderhautmelanozyten.

3.3 Elektrophysiologische und fluoreszenzoptische Untersuchung der Aderhautmelanomzelllinie 92.1

3.3.1 Capsaicin erhöht die $[Ca^{2+}]_i$ in 92.1-Zellen

Dieselben Messungen, die bei den gesunden Kontrollzellen durchgeführt wurden, wurden jetzt unter möglichst gleichen Bedingungen mit den Tumorzellen wiederholt, um eine Vergleichbarkeit zu erreichen. Hierbei zeigte sich, wie in Abbildung 16 A dargestellt, ein durch 20 μ M CAP ausgelöster Fluoreszenzratioanstieg (f_{340}/f_{380}). Der Kontrollwert in Höhe von $1,200 \pm 0,001$ (Basislinie) stieg nach 590 Sek. auf $1,214 \pm 0,002$ (\pm SEM; $n = 7$, $p < 0,005$) an (oberer Graph mit gefüllten Kreisen). Unter Kontrollbedingungen (ohne Stimulationen) konnten keine Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ festgestellt werden (unterer Graph mit offenen Kreisen). Um zusätzlich zu gewährleisten, dass die erhöhte $[Ca^{2+}]_i$ auf die Aktivierung von TRPV1 zurückzuführen ist, wurde das Experiment in Gegenwart des spezifischen TRPV1-Blockers Capsazepin (CPZ) wiederholt.⁷⁰⁻⁷² Hierfür wurden die in Kapitel 2.5 beschriebenen Aderhautmelanomzellen (92.1) verwendet und für 20 bis 30 Min. mit 20 μ M CPZ in der bereits genannten Ringer-ähnlichen Badlösung vorinkubiert. Außerdem wurde für die Experimente CPZ der Lösung der Badkammer hinzugefügt, sodass die Zellen ununterbrochen mit dem Blocker in Kontakt waren. Die Abbildung 15 C fasst den Effekt von CAP unter dem Einfluss von CPZ zusammen. In Gegenwart des spezifischen TRPV1-Blockers konnte der CAP-induzierte Ca^{2+} -Anstieg deutlich unterdrückt werden, und zwar von $1,215 \pm 0,013$ auf $1,205 \pm 0,004$ ($n = 4$; $p < 0,05$). Somit konnte der durch CAP induzierte Calciumanstieg durch CPZ erfolgreich blockiert werden. Diese Experimente deuten erstmals auf die funktionelle Expression von TRPV1 in kultivierten Aderhautmelanomzellen (92.1) hin.

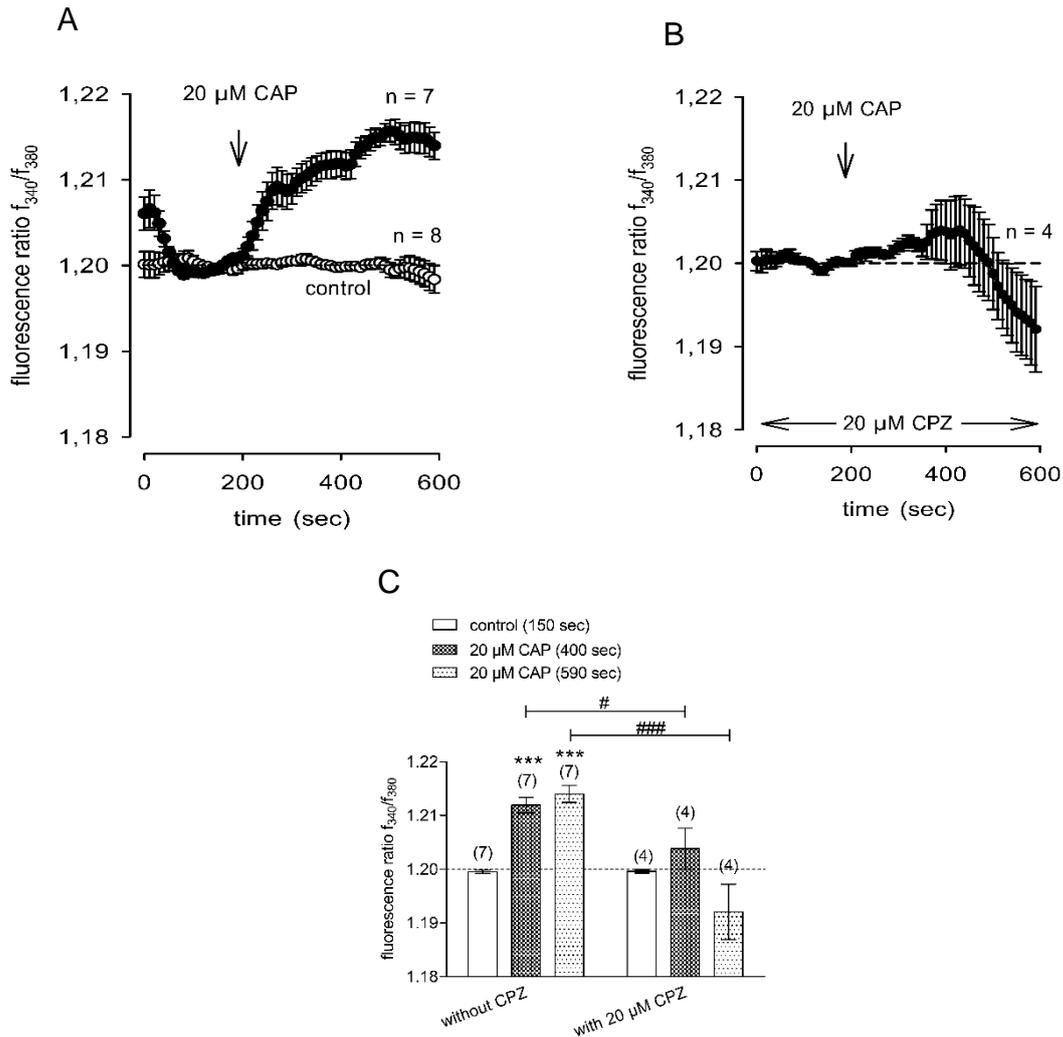


Abb. 16: Effekt von CAP und CPZ auf die $[Ca^{2+}]_i$ in 92.1-Aderhautmelanomzellen Die Zugabe von CAP erfolgte zum Zeitpunkt, der mit dem Pfeil markiert ist. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM von 4 bis 8 Experimenten angegeben ($n = 4 - 8$). (A) Die Graphen zeigen das durchschnittliche Fluoreszenzratio, das proportional zur $[Ca^{2+}]_i$ ist. Mehrere benachbarte Zellen wurden vor und nach der Applikation von 20 μ M CAP (gefüllte Kreise; $n = 7$) bzw. ohne eine Stimulation (Basislinie; weiße Kreise; $n = 8$) gemessen. CAP führte zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. (B) Es handelt sich um den gleichen experimentellen Ablauf wie in (A), jedoch in Gegenwart von CPZ (20 μ M) in der Badlösung ($n = 4$). (C) Statistische Analyse der Experimente mit CAP und CPZ. Die Sterne (***) zeigen die signifikanten Unterschiede ($p < 0,005$; gepaarter Student t-Test) zwischen der Kontrolle (Ca^{2+} Basislevel bei 150 Sek.) und der Applikation von CAP (bei 400 Sek. und 590 Sek.). Die Rautenzeichen (###) markieren die signifikanten Unterschiede ($p < 0,05$; ungepaarter Student t-Test) zwischen CAP- und CPZ-Werten bei 400 Sek. und 590 Sek.⁶¹

3.3.2 CAP erhöht Ganzzellströme in 92.1-Zellen

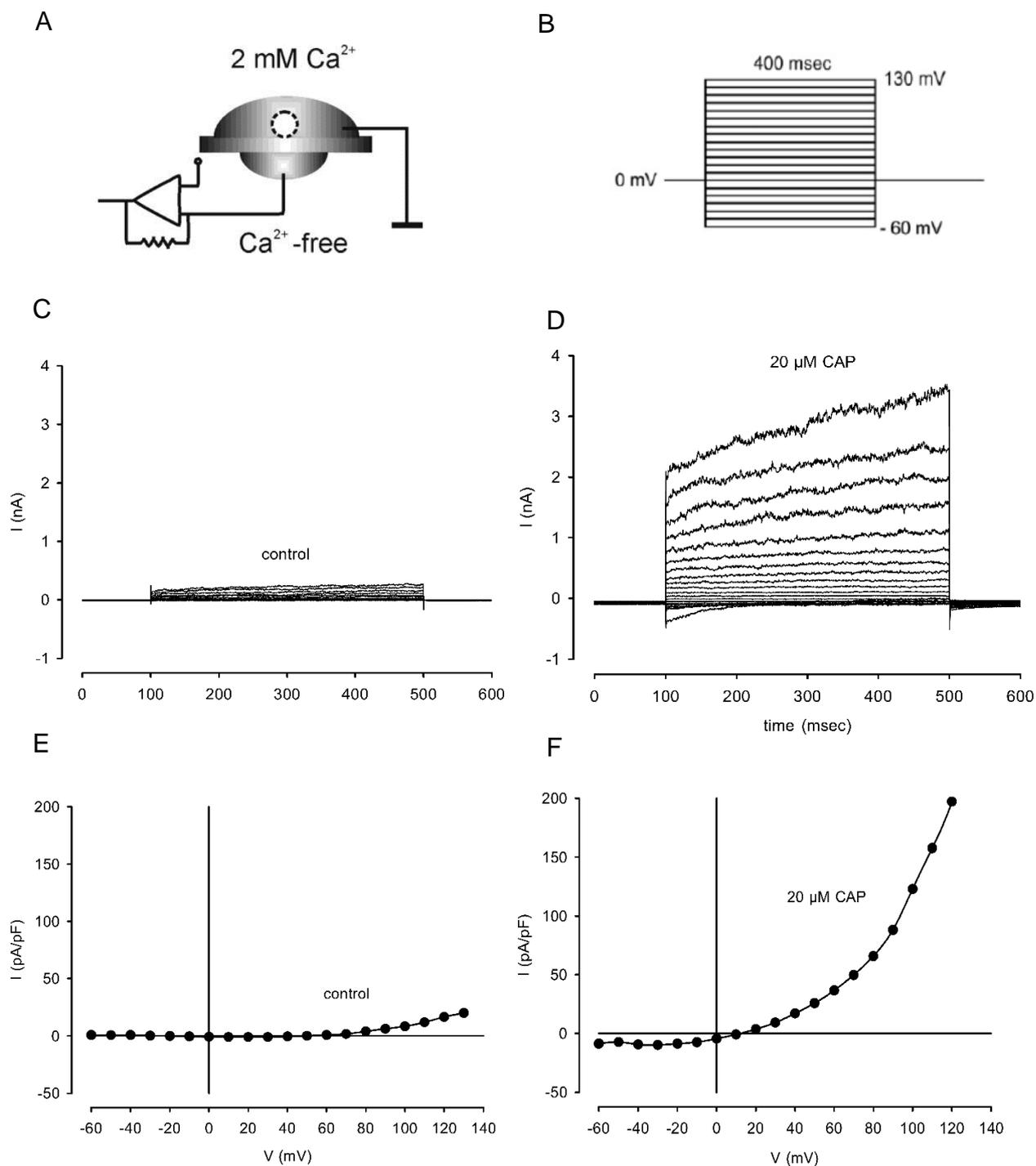


Abb. 17: Ganzzellströme gemessen in Aderhautmelanomzellen (92.1) vor und nach der Applikation von CAP (n = 1) (A) Vereinfachte Darstellung der Mikrochipeinheit (B) Darstellung des Stufenprotokolls (C) Kontrollströme ohne Stimulation (D) Einwärts- und Auswärtsströme nach extrazellulärer Gabe von 20 μM CAP (E) Stromdichte (pA/pF) ohne CAP (Kontrolle), aufgezeichnet gegen die Spannung (mV). Die Daten wurden aus A gewonnen. (F) Wie Abbildung 17 E, jedoch in Gegenwart von 20 μM CAP.

Um die funktionelle Expression des Hitzerezeptors TRPV1 über eine weitere Methode nachzuweisen, wurden Ganzzellströme in Aderhautmelanomzellen mithilfe der in Kapitel 2.4. beschriebenen planaren Patch-Clamp-Technik gemessen. Um Kalium- und Chloridströme zu unterdrücken, wurde CsF (60 mM) zur intrazellulären Lösung hinzugegeben. Die Abbildung 17 D zeigt stark auswärts rektifizierende Ströme nach Stimulation über ein Stufenprotokoll (Abb. 16 B) und nach Zugabe von 20 μM CAP. Ohne CAP konnten nur geringe Ströme gemessen werden (Kontrolle, Abb. 17 C). Die Abbildung 17 D + F zeigt in Gegenwart von CAP sehr hohe Stromdichten von bis zu 200 pA/pF bei 130 mV. Deutlich ist auch ein Anstieg der einwärts gerichteten Ströme (Abb. 17 F) zu sehen. Dieser für TRPV1 typische Stromverlauf als Reaktion auf CAP deutet auf eine funktionale Expression von TRPV1-Kanälen in Aderhautmelanomzellen hin. Die Abbildung 17 zeigt exemplarisch die Werte einer Messung. Insgesamt wurden neun Messungen durchgeführt, die ein ähnliches Ergebnis erbrachten. Eine statistische Auswertung hierfür wurde von Mergler et. al. durchgeführt und veröffentlicht.⁶¹ Einen Auszug hieraus stellt die Abbildung 18 dar.⁶¹

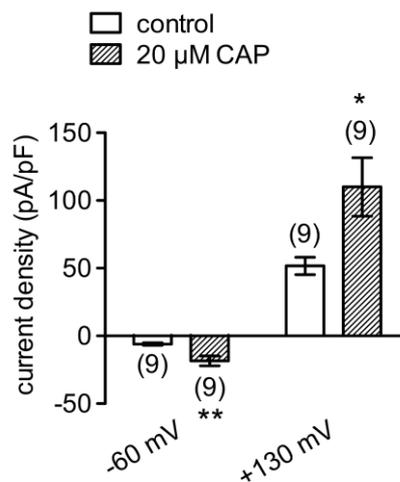


Abb. 18: Zusammenfassung der Patch-Clamp-Experimente mit CAP Die Ströme wurden bezüglich der Kapazität normalisiert, um eine Stromdichte zu errechnen (pA/pF)⁶¹

3.3.3 Icilin erhöht die $[Ca^{2+}]_i$ in 92.1-Zellen

Im Folgenden wurden die Icilin-Experimente mit den 92.1-Zellen durchgeführt, um mögliche Veränderungen im Vergleich zu den gesunden Zellen zu erforschen. Die Abbildung 19 zeigt einen durch 20 μ M Icilin signifikant erhöhten Fluoreszenzratioanstieg (f_{340}/f_{380}) von $1,20 \pm 0,001$ auf $1,22 \pm 0,005$ nach 6 Min (\pm SEM; $n = 6$, $p < 0.01$; oberer Graph mit gefüllten Kreisen). Um zu prüfen, ob der Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ auf einer Aktivierung von TRPM8 beruht, wurden die Experimente in Gegenwart von 10 μ M BCTC (N-(4-tert-butylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)tetrahydropyrazine-1(2H)-carboxamide) wiederholt. BCTC gilt als ein spezifischer Blocker von TRPM8.⁷³ Hierfür wurden die Aderhautmelanomzellen für 20 bis 30 Min mit 10 μ M BCTC in der Badlösung vorinkubiert. Zusätzlich wurde für die Experimente BCTC der Lösung in der Badkammer zugegeben. Die Abbildung 19 B zeigt, dass der Icilininduzierte Ca^{2+} -Anstieg durch BCTC auf einen Wert ähnlich der Ca^{2+} -Basislinie von $1,200 \pm 0,001$ bzw. $1,190 \pm 0,008$ bei 600 Sek. ($n = 6$) unterdrückt wird. Zusammenfassend kann man sagen, dass die deutlichen Effekte von Icilin und BCTC auf eine funktionelle Expression von TRPM8-Kanälen in den Tumorzellen hinweisen.

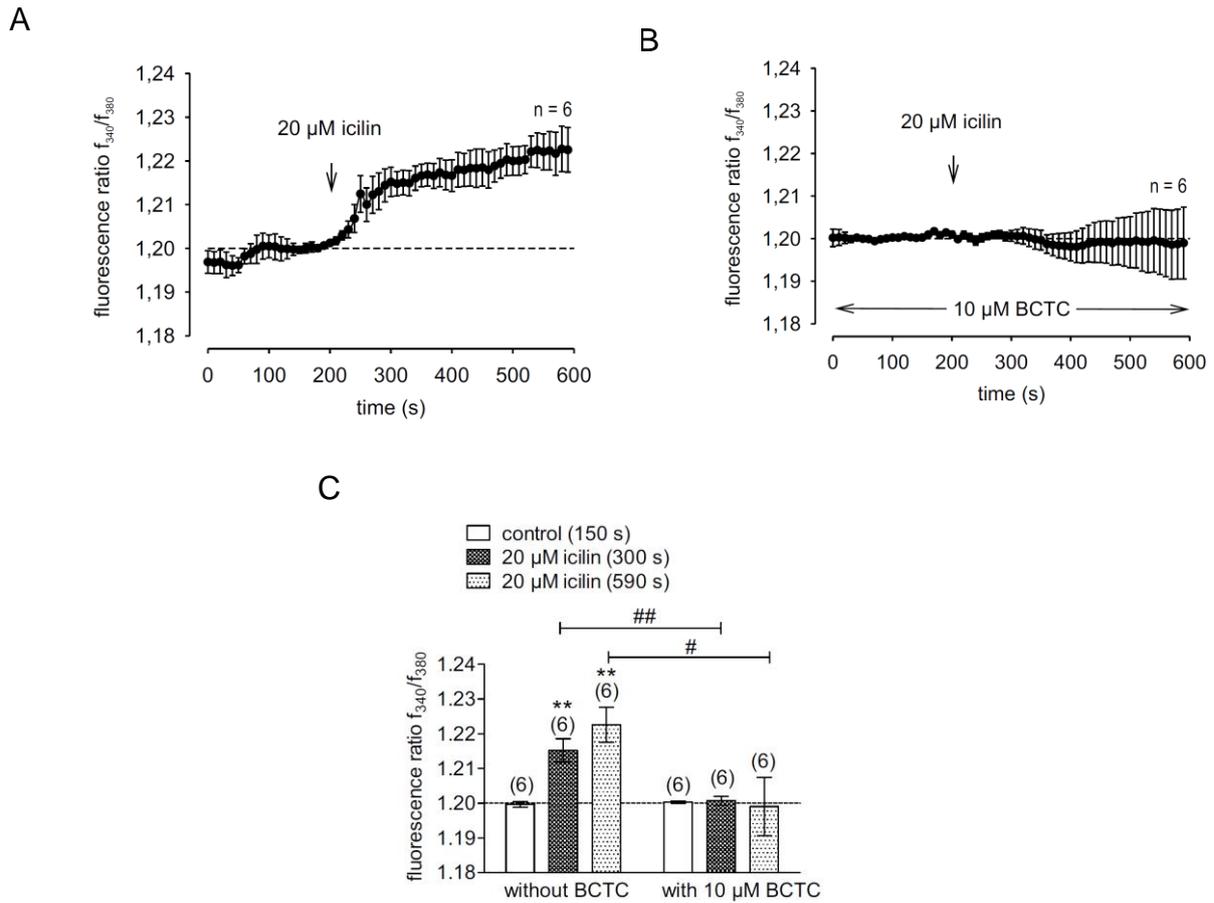


Abb. 19: Effekt von Icilin und BCTC auf die $[Ca^{2+}]_i$ in 92.1-Aderhautmelanomzellen Die Applikation von Icilin erfolgte zum mit dem Pfeil markierten Zeitpunkt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM aus sechs Experimenten angegeben (n = 6). (A) Mehrere benachbarte Zellen wurden vor und nach der Applikation von 20 μ M Icilin (n = 6) gemessen. Icilin führte zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. (B) Applikation von Icilin in Gegenwart von 10 μ M BCTC (n = 6). Durch Zugabe von BCTC in die Badlösung konnte der durch Icilin hervorgerufene Effekt inhibiert werden. (C) Statistische Analyse der Experimente mit Icilin und BCTC. Die Sterne (***) zeigen die signifikanten Unterschiede (p < 0,01; gepaarter Student t-Test) zwischen der Kontrolle (Ca^{2+} Basislevel bei 150 Sek.) und der Applikation von Icilin (bei 300 Sek. und 590 Sek.). Die Rautenzeichen (###) markieren die signifikanten Unterschiede (p < 0,01 – 0,05; ungepaarter Student t-Test) zwischen Icilin- und BCTC-Werten bei 400 Sek. und 590 Sek.

3.4 Vergleich von gesunden Aderhautmelanozyten mit 92.1-Zellen

3.4.1 Vergleich des capsaicininduzierten Effektes

Die Abbildung 20 zeigt eine statistische Auswertung der Daten, die in der Aderhautmelanomzelllinie (92.1) und den aus den Schweineaugen isolierten Aderhautmelanozyten gemessen wurden. Sowohl die Tumorzellen als auch die gesunden Zellen zeigen einen CAP-induzierten Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$. Dabei wird nach 590 Sek. ein ähnliches Niveau wie bei den Tumorzellen erreicht [$1,214 \pm 0,002$ beim Tumor und $1,215 \pm 0,004$ bei den gesunden Aderhautmelanozyten (jeweils $n = 7$)]. Der Anstieg bei den gesunden Zellen ist im Gegensatz zu den Tumorzellen jedoch etwas verzögert ($1,211 \pm 0,002$ nach 350 Sek. beim Tumor und $1,203 \pm 0,002$ nach derselben Zeit bei den gesunden Aderhautmelanozyten). Zusammenfassend kann man sagen, dass sowohl in den humanen Aderhautmelanomzellen als auch in den gesunden Melanozyten vom Schweineauge TRPV1 funktionell exprimiert wird. Jedoch deutet das höhere Ca^{2+} -Niveau bei 350 Sek. und damit der schnellere Ca^{2+} -Anstieg in den Tumorzellen auf eine höhere funktionelle TRPV1-Expression in diesen Zellen hin.

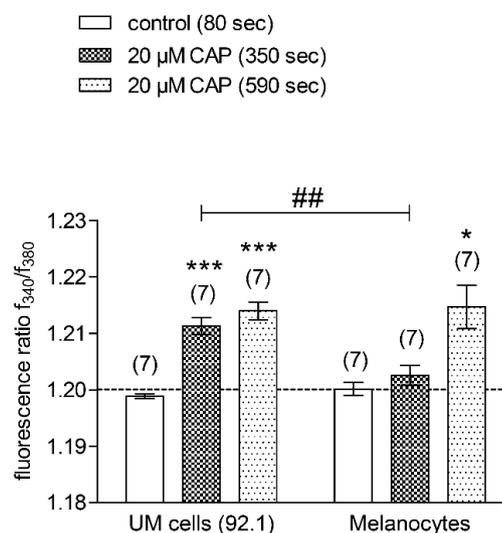


Abb. 20: Zusammenfassung der Experimente mit CAP in Aderhautmelanomzellen und in gesunden Aderhautmelanozyten Die Sterne (***) zeigen die signifikanten Unterschiede ($p < 0,01 - 0,05$; gepaarter Student t-Test) zwischen der Kontrolle (Ca^{2+} Basislevel bei 150 Sek.) und der Applikation von CAP (bei 350 Sek. und 590 Sek.). Die Rautenzeichen (##) markieren die signifikanten Unterschiede (als Minimum $p < 0,01$; ungepaarter Student t-Test) zwischen dem Tumor und den gesunden Zellen bei 350 Sek.

3.4.2 Vergleich des icilininduzierten Effektes

Eine statistische Analyse ergab signifikante Unterschiede zwischen der Aderhautmelanomzelllinie (92.1; Abb. 21) und den Aderhautmelanozyten ($p < 0,1$). Hier lässt sich zusammenfassend sagen, dass die gesunden Melanozyten im Vergleich zu den Tumorzellen keine wesentliche Reaktion auf Icilin zeigen. In den 92.1-Zellen ergibt sich dagegen eine signifikante Steigerung der $[Ca^{2+}]_i$, was vermuten lässt, dass der TRPM8 erst im Verlauf der Tumorprogression exprimiert wird.

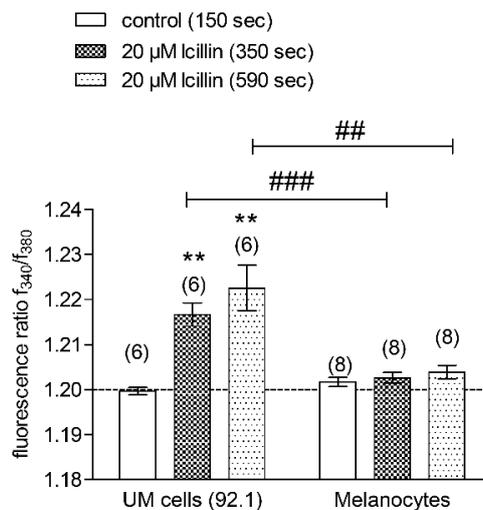


Abb. 21: Zusammenfassung der Experimente mit Icilin in Aderhautmelanomzellen und in gesunden Aderhautmelanozyten Die Rautenzeichen (###) zeigen den signifikanten Unterschied ($p < 0,01$; ungepaarter Student t-Test) zwischen dem Tumor und den gesunden Zellen bei 350 Sek. und 590 Sek.

4 Diskussion

Das Aderhautmelanom ist der am häufigsten auftretende Augentumor bei Erwachsenen⁷⁴, weshalb die Erforschung dieses Tumors eine weitreichende Bedeutung hat. Die Ergebnisse der hier gezeigten Untersuchungen haben das Wissen um die Rolle und Funktion von TRP-Kanälen in der Ca²⁺-Regulation speziell im Aderhautmelanom erweitert. Die erhaltenen Ergebnisse decken sich im Wesentlichen mit den Beiträgen in der Literatur zu anderen Tumoren.^{24,33} Diese Studie ist initial die erste, die überhaupt die funktionale Expression von TRP-Kanälen im Aderhautmelanom nachweisen konnte.⁶¹ Dabei ist sie an die Untersuchungen zu TRP-Kanälen im Retinoblastom (bei Kindern) angelehnt, die in der gleichen Arbeitsgruppe erfolgten.⁴⁴

Durch den Vergleich von TRPV1- und TRPM8-Eigenschaften in frisch isolierten Aderhautmelanozyten und der etablierten Aderhautmelanomzelllinie 92.1 konnten deutliche Unterschiede festgestellt werden. So zeigen sich eine erhöhte TRPM8-Expression und eine erhöhte funktionale Aktivität in tumorös veränderten Zellen. Dies deckt sich mit Ergebnissen aus Studien zu anderen Tumoren und ist auch für diagnostische Zwecke interessant.^{37,75} Zellbiologisch lässt sich vermuten, dass eine höhere TRPM8-Aktivierung einen möglichen Ca²⁺-Einstrom triggern kann. Dieser wiederum könnte den MAP-Kinase-Signalweg (MAP, englisch *mitogen activated protein*) aktivieren, der Zellprozesse wie die Proliferation oder den programmierten Zelltod steuert.⁴² Solche Unterschiede zeigten sich auch in anderen Tumorgeweben, wie z. B. dem Hautmelanom.⁵⁸ Es ergab sich bereits ein möglicher Ansatzpunkt für ein Therapieverfahren, da gezeigt werden konnte, dass sich die zelluläre Überlebensfähigkeit durch die TRPM8-Aktivierung einschränken lässt.⁵⁸ Ähnliche TRPM8-bezogene Ergebnisse konnten auch in dem zuvor genannten Retinoblastom nachgewiesen werden.⁴⁴ Ebenso war in anderen entarteten Geweben wie z. B. neuroendokrinen Tumoren eine TRPM8-Aktivität festzustellen.⁷⁶ Dabei scheint es eine Korrelation der TRP-Kanal-Expression mit der Aggressivität des Tumors zu geben, wie u. a. für das Prostatakarzinom belegt wurde.⁷⁷ Ähnliches konnten auch im Hinblick auf den TRPV1 beobachtet werden, der interaktiv im Zusammenhang mit dem TRPM8 steht, da beide Kanäle oft gemeinsam exprimiert werden, wie z. B. in menschlichen Neuronen.⁷⁸ So konnte die funktionale Expression von TRPV1 u. a. im Prostatakarzinom^{45,47}, in Urothelkarzinomzellen⁴⁷ sowie in anderen Augentumoren wie dem Retinoblastom⁴⁴

nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen gelten nicht nur für maligne Prozesse, sondern konnten auch in dem benignen Augentumor den Pterygium nachgewiesen werden.⁷⁹ In diesen Studien zeigte sich eine Hochregulierung des TRPV1-Kanals, was vermuten lässt, dass er eine entscheidende Bedeutung für die Tumorprogression hat.

4.1 Analyse der Zellmorphologie der Tumor- und der gesunden Zellen

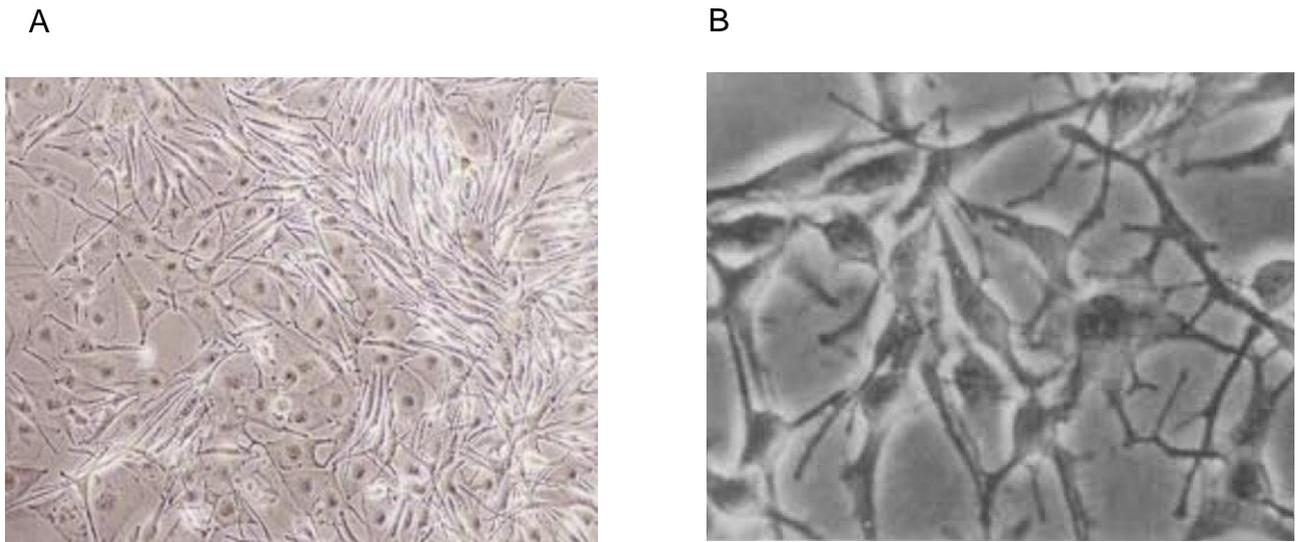


Abb. 22: Lichtmikroskopische Darstellung von uvealen Melanozyten (A) Humane choroidale Melanozyten nach Isolierung (P1-Kultur). In konfluierenden Arealen haben die Zellen zwei oder drei Ausläufer mit engem Zell-Zell-Kontakt (Vergrößerung x 100)⁶² (B) Uveale Melanozyten in Primärzellkultur nach konfluierendem Wachstum mit einem Aussehen wie dendritische oder tripolare Zellen (Vergrößerung x 270)⁸⁰

Morphologisch weisen sowohl die uvealen Melanozyten als auch die Tumorzellen der Zelllinie 92.1 viele Gemeinsamkeiten auf (siehe Abb. 22 und Abb. 23). Charakteristisch sind bei beiden Zelltypen die langen Ausläufer, die in der Anzahl stark variieren. Jedoch scheint insbesondere der Zellkern der Tumorzellen prominenter zu sein. Im Gegensatz zu den in der Literatur beschriebenen lichtmikroskopischen Bildern scheinen die in dieser Studie isolierten Melanozyten stärker im Verbund mit mehr Zell-Zell-Kontakten zu agieren (siehe Abb. 13 A). Dies kann mehrere Ursachen haben. Zum einen erscheint die Zelldichte höher und zum anderen kann es zur Entstehung einer Mischkultur aus retinalen

Pigmentepithelzellen und uvealen Melanozyten gekommen sein, trotz Befolgung des Protokolls von Valtink et al.⁶²

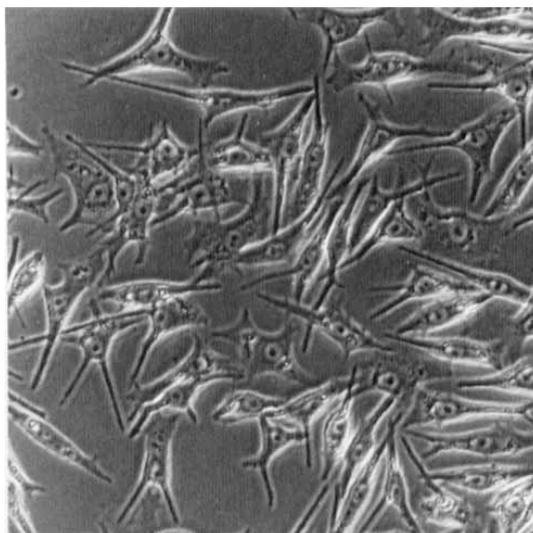


Abb. 23: Lichtmikroskopisches Bild von kultivierten 92.1-Aderhautmelanomzellen
(Vergrößerung x 200)⁵⁹

Morphologisch entsprechen die Tumorzellen der Linie 92.1 aus dem Jahr 1995, die sich zu dem Zeitpunkt 2,5 Jahre in Zellkultur befanden, den Zellen aus späteren Passagen, die für derzeitige Experimente herangezogen wurden (siehe Abb. 23 und Abb. 13 B).

4.2 TRP-Kanäle in Aderhautmelanozyten

Um neue Möglichkeiten und Angriffspunkte in der Tumorthherapie zu finden, ist der Vergleich mit dem gesunden physiologischen Gewebe essenziell. Insbesondere kann eine Therapie an spezifischen Angriffspunkten des Tumorgewebes helfen, die Nebenwirkungsrate für gesunde Zellen so gering wie möglich zu halten. Deswegen wurden in dieser Untersuchung Tumorzellen mit gesunden Zellen aus Schweineaugen verglichen.

4.2.1 TRPV1 in Aderhautmelanozyten

In dieser Studie konnte eine funktionale Aktivität von TRPV1 in gesunden Aderhautmelanozyten nachgewiesen werden. Dies wurde durch die deutliche Ca^{2+} -Antwort auf den TRPV1-Agonisten CAP (Abb. 24), das durch die Zellmembran diffundiert und an der Innenseite des Rezeptors agiert, gezeigt (Abb. 25). Das korreliert mit den RT-PCR-Daten, indem TRPV1 auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte. Somit lassen die PCR- und die Calciumdaten vermuten, dass TRPV1 auf mRNA- und funktioneller Ebene eine Rolle spielt.

Bisher konnten keine Daten bezüglich des TRPV1 in Aderhautmelanozyten gefunden werden. Somit ist nach jetzigem Wissenstand die Arbeitsgruppe um Mergler et al. die erste, die diesen Kanal in Aderhautmelanozyten untersucht hat. Bisher konnte jedoch eine Expression auch in den verwandten Melanozyten der Haut nachgewiesen werden,⁸¹ was das Ergebnis dieser Studie stützt. Ähnliche Reaktionen konnten auch in einem anderen benignen Gewebe, dem Pterygium, nachgewiesen werden. Dort zeigte sich ein deutlicher TRPV1-vermittelter Anstieg nach CAP-Applikation.⁷⁹

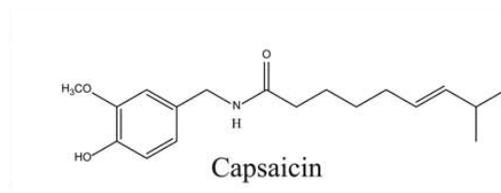


Abb. 24: Die chemische Struktur des TRPV1-Agonisten Capsaicin⁵¹

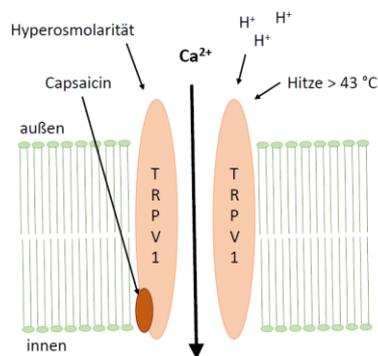


Abb. 25: Schematische Darstellung von TRPV1 TRPV1 moduliert den Ca^{2+} -Einstrom. Es ist ein Ionenkanal und ein polymodaler Rezeptor für verschiedene inflammatorische Stimuli wie Hyperosmolarität,

Protonen, Hitze und lösliche Metabolite (vereinfachte Darstellung). Der Capsaicinrezeptor befindet sich intrazellulär.⁸²

4.2.2 TRPM8 in Aderhautmelanozyten

Um die funktionale Expression des Kälterezeptors TRPM8 nachzuweisen, wurde der spezifische TRPM8-Agonisten Icilin (Abb. 26) verwendet.^{54,83,84} Icilin stellt wie u. a. Menthol eine künstliche Kühlungsagens dar, ist aber im Gegensatz zu Menthol etwa 2,5-mal effektiver.⁵⁴

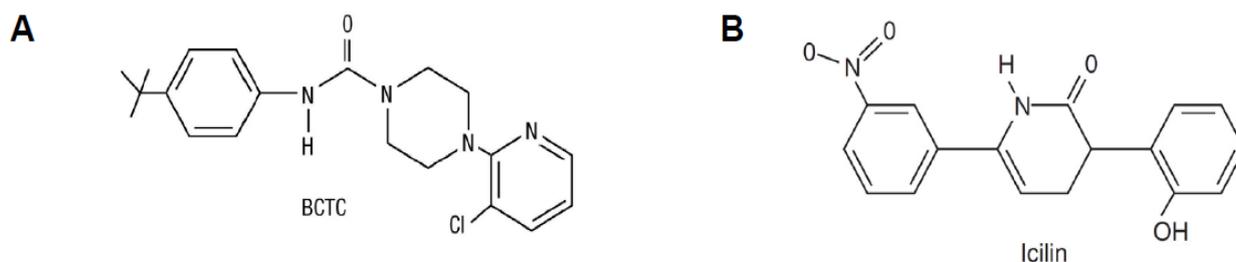


Abb. 26: Die chemische Struktur des TRPM8-Antagonisten BCTC (A) und des Agonisten Icilin (B)³⁷

Es konnte in der RT-PCR kein eindeutiger Nachweis von mRNA des TRPM8 in Aderhautmelanozyten erbracht werden.⁶¹ Dieses Ergebnis wird durch die funktionale Untersuchung bestätigt. Es erfolgte keine signifikante Reaktion auf die Stimulation mit Icilin (siehe Abb. 15). Wie bei den TRPV1 existieren bisher keine publizierte Daten über die TRPM8-Expression in Aderhautmelanozyten. Dasselbe gilt auch für die Melanozyten der Haut. Jedoch wurden Untersuchungen des zur Melastatinfamilie gehörenden TRPM1 vorgenommen. Dieser TRPM1 konnte in Melanozyten nachgewiesen werden.⁸⁵ Interessanterweise korreliert eine Herunterregulierung des Kanals mit einem gesteigerten Potenzial zur Metastasierung eines Melanoms und bestimmt somit die Aggressivität der Erkrankung.⁸⁶ Eine ähnliche Bedeutung könnte dem TRPM8-Kanal in Aderhautmelanomen zukommen, weshalb eine intensivere Erforschung der Kanalexpression im Verlauf der Tumorprogression angestrebt wird.

4.3 Veränderte TRP-Kanal-Aktivität in den Aderhautmelanomzellen 92.1

4.3.1 TRPV1 in 92.1-Zellen

In dieser Arbeit ist eine CAP-sensitive funktionale Expression von TRPV1 im Aderhautmelanom mittels Calcium Imaging und planaren Patch-Clamp-Messungen gezeigt (Abb. 16 und Abb. 17). Um das Ergebnis weiter zu validieren, wurde das dasselbe Experiment in Gegenwart des spezifischen TRPV1-Blockers CPZ durchgeführt. Wie zu erwarten war, konnte der CAP-induzierte Calciumeinstrom mit dem Blocker unterdrückt werden (Abb. 16), was die TRPV1-Aktivität eindrücklich veranschaulicht. Ähnliche Effekte konnten auch bei der CPZ-Applikation nach CAP-Stimulation in den Patch-Clamp-Messungen beobachtet werden.⁶¹ Bei der Applikation von CAP in den Calcium-Imaging-Messungen auf gesunden Aderhautmelanozyten ließ sich wie bei den Tumorzellen ein Ca^{2+} -Einstrom registrieren, der am Ende der Messung ein ähnliches Niveau erreicht. Jedoch ist der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in den Aderhautmelanomzellen steiler und schneller (Abb. 20), was möglicherweise mit einer erhöhten Expression zu erklären ist. Die Unterschiede im Calciumanstieg sind mit $p < 0,01$ signifikant. Ein schneller Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ konnte auch in Retinoblastomzellen gezeigt werden.⁴⁴ Ebenso weisen CAP-induzierte Ganzzellströme in den planaren Patch-Clamp-Messungen typische auswärtsrektifizierende Ströme mit einem Umkehrpotenzial bei nahe 0 mV auf. Ähnliche Stromantworten konnten in neuronalen Zellen nachgewiesen werden, die für die Sensorik von Wärme und Kälte verantwortlich sind.⁴⁰ Ein Umkehrpotenzial von nahe 0 mV ist typisch für nicht selektive Kationenkanalströme. Dennoch ist davon auszugehen, dass auch Anionenströme (Chloridströme) existieren, die sich durch CAP aber nicht veränderten (Abb. 17). Außerdem zeigen Daten in Hornhautepithelzellen, bei denen NaCl durch Natriumgluconat ersetzt wurde, dass ähnliche Stromantworten entstanden, was auf einen eher geringen Einfluss von Anionen auf die Stromantwort hindeutet.⁴¹

Andere Tumoren, in denen eine erhöhte TRPV1-Aktivität mit sehr ähnlichen Stromantwortmustern nachgewiesen wurde, sind u. a. neuroendokrine Tumorzellen und Pterygiumzellen.^{44,79} Somit deuten die Untersuchungen dieser Studie auf eine Überexpression von TRPV1 in uvealen Melanomen im Gegensatz zu gesunden Aderhautmelanozyten hin.

4.3.2 TRPM8 in 92.1-Zellen

Nach der Applikation von Icilin stellte sich ein irreversibler Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration in den Aderhautmelanomzellen dar (Abb. 19). Dieser icilininduzierte Ca^{2+} -Einstrom entspricht der Ca^{2+} -Antwort, die in anderen Studien mit anderen Tumorzellen, wie dem Retinoblastom, und mit gesunden Zellen des Auges, wie den humanen Hornhautepithelzellen (HCEC-12), erzielt wurden.^{44,87} Zur Verdeutlichung, dass die vermehrten Ganzzellströme und der erhöhte Ca^{2+} -Einstrom mit der TRPM8-Aktivität korrelieren, wurde die Calcium-Imaging-Methode in Anwesenheit des spezifischen Blockers BCTC durchgeführt. Die effektive Reduzierung der Ca^{2+} -Antwort auf das Basislinienniveau deutet auf das Vorhandensein von TRPM8 hin. Ähnliche Beobachtungen konnten auch in Prostatakarzinomen dokumentiert werden, in denen TRPM8 durch seine starke Überexpression zuerst entdeckt wurde.⁷⁵ Solche Prozesse waren ebenfalls in etoposidesensitiven Retinoblastomzellen nachzuweisen.⁴⁴

Zusätzlich konnten in kürzlich von der Arbeitsgruppe Mergler et al. veröffentlichten Daten icilininduzierte Ganzzellströme durch die Patch-Clamp-Technik festgestellt werden (Abb. 27).⁶¹

Bei der funktionalen Expression von TRPM8 zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen gesunden und Tumorzellen. Äquivalent zu der schwachen Genexpression in der RT-PCR bei den gesunden Melanozyten konnte keine signifikante Erhöhung der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ durch eine TRPM8-Aktivierung ausgelöst werden. Dies steht im kompletten Gegensatz zu den Aderhautmelanomzellen 92.1, bei denen ein deutliches Ansteigen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ nach Icilingabe gemessen werden konnte ($p < 0.01$). Damit sind die Unterschiede zwischen den beiden Zelllinien mit $p < 0.005$ hoch signifikant.

In kutanen Melanomen konnte ebenfalls eine TRPM8-Expression mittels RT-PCR nachgewiesen werden.⁵⁸ Die erstaunliche Erkenntnis ist, dass die Lebensfähigkeit der Melanomzellen durch die Gabe von Menthol, einer natürlich in Pflanzen vorkommenden Substanz, dosisabhängig gesenkt werden konnte.⁵⁸ Dieses überraschende Ergebnis verdeutlicht die Wichtigkeit von TRPM8 in der Tumorprogression über die Ca^{2+} -Regulation der Zelle, wodurch dieser Kanal ein attraktives Ziel für die Therapieentwicklung ist.

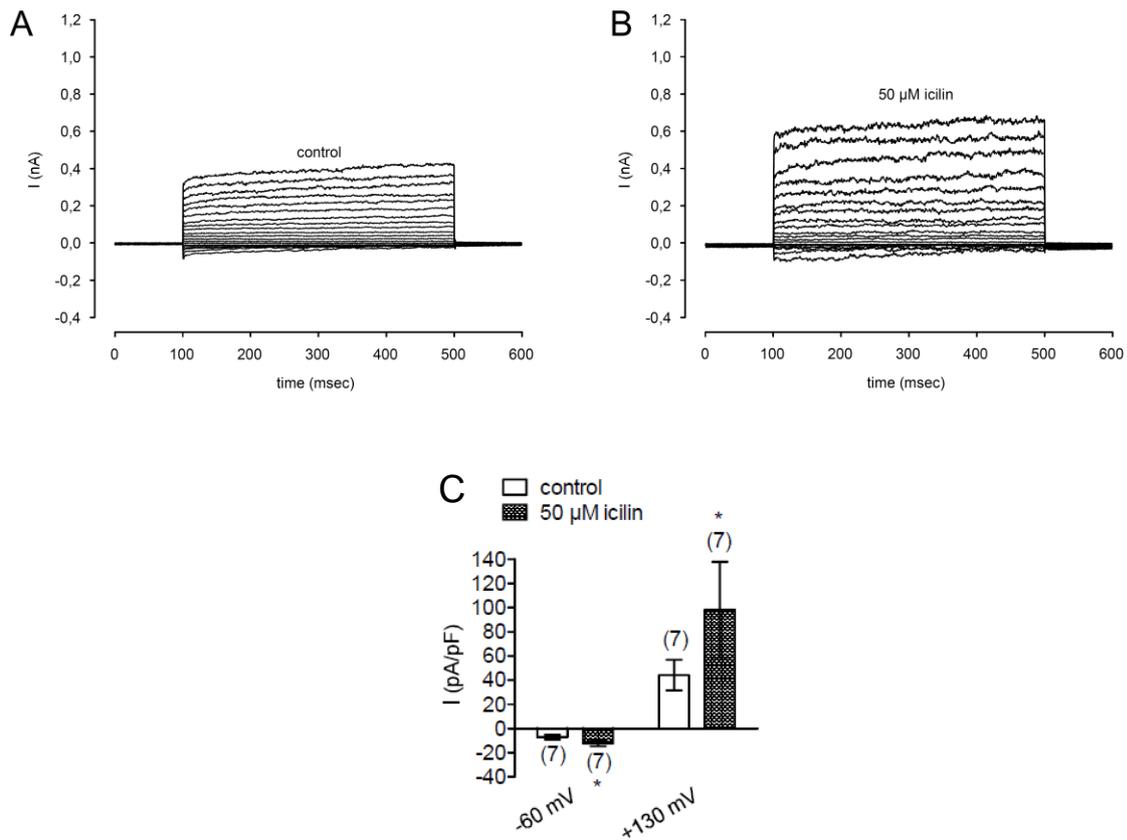


Abb. 27: Icilinaktivierte Ganzzellströme in Aderhautmelanomzellen 92.1. (A) Ganzzellströme ohne Stimulation mit Ausgleich der Leckströme dargestellt (B) Vermehrte Ganzzellströme in Gegenwart von 50 µM Icilin (C) Zusammenfassung aller Experimente mit Icilin (n = 7)⁶¹

Bisher gibt es keine publizierten Daten zum Verlauf der TRPM8-Expression in der Tumorentwicklung von Melanozyten bis zum metastasierten Tumor. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zu den Aderhautmelanozyten lassen jedoch vermuten, dass eine Änderung der Expression für die Tumorprogression auch in den Hautmelanozyten von Bedeutung ist.

4.4 Medizinische Relevanz

Das genaue Verständnis der Physiologie einer Tumorzelle im Vergleich zum gesunden Gewebe kann wichtige neue Erkenntnisse liefern, die helfen können, therapeutisch effektiver gegen den Tumor vorzugehen. Besondere Bedeutung erlangt dieser Umstand beim Aderhautmelanom in Anbetracht der immer noch sehr hohen Mortalitätsrate.⁶

Darüber hinaus kann die Effektivität bereits vorhandener Therapieoptionen neu evaluiert werden. So erscheint die TTT in neuem Licht. Einerseits führt die Applikation von Wärme zu einer Aktivierung der TRPV-Kanäle. Dies hat einen Calciumeinstrom in die Zelle zur Folge, was ab einer gewissen Konzentration den programmierten Zelltod der Tumorzelle einleitet. Dieser Fakt kann die Regression des Tumors in 76% der Fälle nach Thermotherapie begründen.¹⁸ Andererseits wird diese Methode heutzutage auch bei kleinen Tumoren nicht mehr als alleinige Therapie angewendet. Dies liegt an den in Studien nach anfänglicher Regression gezeigten höheren Rezidivraten als bei einer Radiotherapie.^{18,88} Dieser Umstand könnte ebenfalls durch eine TRPV-Aktivierung während der Thermotherapie erklärt werden. So konnten in Zellen des der Aderhaut eng benachbarten retinalen Pigmentepithels hitzesensitive TRPV-Kanäle nachgewiesen werden, die anscheinend eine wichtige Rolle in der Freisetzung von Vaskular Endothelial Growth Factor A (VEGF-A) spielen.⁸⁹ Daten haben gezeigt, dass VEGF einen Einfluss auf die Angiogenese, die Progression und die Metastasierung des Aderhautmelanoms hat.⁹⁰ Eine Messung der VEGF-Konzentration im Kammerwasser der Patienten mit Aderhautmelanom nach Enukleation bei nicht therapiertem, therapiertem und gesundem Auge zeigte eine Erhöhung der VEGF-A-Konzentration bei Aderhautmelanomen. Das Niveau bei therapierten Aderhautmelanomen lag dabei deutlich höher.⁹¹ Somit wird VEGF-A sowohl aus den Tumorzellen als auch vom umliegenden retinalen Pigmentepithel freigesetzt. Dies begünstigt die Bildung von Mikrometastasen, die die Mortalität stark beeinflussen. Der In-vitro-Einsatz eines VEGF-Antagonisten namens Ranibizumab zeigte eine erfolgreiche Hemmung der Proliferation des malignen Aderhautmelanoms durch die Reduzierung der VEGF-Expression.⁹²

Mitglieder der TRP-Familie haben homöostatische und regulierende Funktionen in Zellen, die durch die Änderung ihrer Expression auch ein Grund für malignes Wachstum sein können.²⁴ Die in dieser Arbeit ermittelten Daten belegen, dass in gesunden Melanozyten keine signifikante TRPM8-Aktivität nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu hat sich die funktionale Expression im tumorösen Gewebe stark verändert. Hier zeigt sich ein starker Calciumeinstrom infolge von TRPM8-Aktivierung. Ähnliche Phänomene ergaben sich auch in Melanomen der Haut. Dort fand sich ebenfalls eine starke Expression von TRPM8, die durch die spezifische Aktivierung mittels Menthol zu einem Ca^{2+} -Einstrom führte. Dies konnte die Lebensfähigkeit der Zellen stark herabsetzen.⁵⁸

Eine Änderung der TRP-Kanal-Expression kann auch als prognostischer Faktor dienen. Spezifisch TRPM8, der besonders in androgenabhängigen Prostatakarzinomen

hochreguliert ist, wird als prognostischer Marker diskutiert.³⁷ Man ist sich über die genaue Funktion dieses Kanals noch nicht im Klaren. Es scheint eine ganz andere zu sein als im sensorischen Nervensystem, in dem der Kanal der Kältewahrnehmung dient⁵⁴, wobei es evident ist, dass der durch TRPM8 getriggerte Ca^{2+} -Einstrom für die Tumorprogression notwendig ist.³⁷ Eine neue Studie zur Wirksamkeit des TRPM8-Blockers BCTC bei Prostatatumorzellen DRU 145 zeigte eine antitumoröse Wirkung dieses TRPM8-Antagonisten. BCTC konnte keinen programmierten Zelltod bewirken, jedoch die Proliferation stark eindämmen.⁹³

Nicht nur TRPM8 wird als prognostischer Marker diskutiert, sondern ebenso ein Mitglied der TRPV-Familie. So zeigte sich im Prostatakarzinom eine erhöhte Expression von TRPV6, die in normalem Prostatagewebe und bei einer benignen Prostatahyperplasie nicht nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise korreliert die TRPV6-Expression signifikant mit dem Gleasonscore ($p = 0,032$), dem pathologischen Stadium ($p < 0,001$) und der extraprostatatischen Ausbreitung ($p = 0,025$). Bei Lymphknotenmetastasierung und androgen-insensitiven Tumoren konnte in 63 und 67% der Fälle TRPV6 nachgewiesen werden.²⁷ Erhöhte TRP-Kanalexpressionen zeigen eine schlechte Prognose, da das Niveau der Expression scheinbar mit einer erhöhten Angiogenese und einer erhöhten Tumoraggressivität einhergeht.^{27,94} Es wäre möglicherweise denkbar, dass ein Monitoring der TRPM8-Expression in Zukunft bei Patienten mit einem Aderhautmelanom genutzt werden kann, um als prognostischer Marker zu dienen.

4.5 Schlussfolgerung

Diese Studie hat die These bestätigt, dass es entscheidende Unterschiede in der funktionellen Expression von temperatursensitiven TRP-Kanälen wie dem TRPV1 und TRPM8 in der Aderhautmelanomzelllinie 92.1 und in gesunden Melanozyten gibt.

Wie die Expression von TRPV1 vermuten ließ, konnte auch eine Funktionalität dieses Kanals in beiden Geweben nachgewiesen werden, wobei ein signifikant schnellerer Anstieg in den Tumorzellen festgestellt werden konnte.

Im Gegensatz dazu zeigten Analysen der TRPM8-Genexpression deutliche Unterschiede zwischen diversen Tumorzelllinien und der gesunden humanen Uvea. Die klaren PCR-Signale, insbesondere der Metastasenzelllinie Mel202 deuten auf eine Überexpression

des TRPM8 im Tumorgewebe hin (Abb. 8B). So scheint der TRPM8 in der Tumorprogression eine Rolle zu spielen, da dessen Genexpression nur schwach und seine funktionelle Expression im gesunden Gewebe nicht signifikant nachgewiesen werden konnte.

Dennoch braucht es nähere funktionelle Untersuchungen in dieser Richtung insbesondere mit gesunden humanen Uveazellen, um weitere Erkenntnisse über diesen Tumor zu gewinnen.

4.6 Limitationen der Studie

4.6.1 Zellkultur und UM-Zellmodell

In dieser Studie wurden die Eigenschaften der etablierten UM-Zelllinie 92.1^{95,96} mit denen einer Melanozyten-Primärzellkultur vom Schwein verglichen. Hierbei ergeben sich drei zu diskutierende Fakten.

Kann man Daten von einer Primärzellkultur mit einer etablierten Zelllinie vergleichen? Es gibt verschiedene Paper der Arbeitsgruppe um Mergler et. al., die gezeigt haben, dass die Eigenschaften von Primärzellkulturen mit denen einer immortalisierten Zelllinie vergleichbar sind. Ein Beispiel hierfür ist der Vergleich zwischen BON-Zellen und einer Primärzellkultur eines neuroendokrinen Tumors.¹⁰² Hier zeigten sich sehr ähnliche Antwortmuster in den Patch-Clamp- und den Calcium-Imaging-Messungen, was für gleiche elektrophysiologische und fluoreszenzoptische Eigenschaften spricht.¹⁰² Ein weiteres Beispiel, in dem ein direkter Vergleich zwischen einer Zellkultur und einer Primärzellkultur gezogen wurde, bietet eine andere Studie der Arbeitsgruppe Mergler, in der frisch isolierte humane Hornhautepithelien mit einer immortalisierten Zelllinie dieser Zellen (HCEC-12) verglichen wurden.¹⁰³ Hierbei wurden ebenfalls ähnliche Ergebnisse erzielt, was dafür spricht, dass Primärzellkulturen mit Zelllinien verglichen werden können. Die uveale Melanomzelllinie 92.1 ist eine gut charakterisierte Zelllinie⁵⁹, jedoch wird in dieser Arbeit sicherlich noch einen Schritt weiter gegangen, indem eine Tumorzelllinie mit einer gesunden Primärzellkultur verglichen wird. Bei der Gewinnung der Primärzellkultur kann trotz genauer Einhaltung des Protokolls nicht ausgeschlossen werden, dass neben den Aderhautmelanozyten auch retinale Pigmentepithelzellen mitkultiviert worden sind. Durch die 7-tägige Zugabe von Geneticin wurden RPE-Zellen

jedoch daran gehindert, nach erfolgter Passage anzuhafte und zu proliferieren. Somit konnten die RPE-Zellen durch Auswechseln des Mediums entfernt werden.⁶²

Zudem wurden menschliche mit tierischen Zellen verglichen. Interessanterweise wurden die Experimente im Methodenpaper von Mergler zur Analyse von BON-Zellen auch mit intestinalen Zellen aus der Maus verglichen (STC-1). Hierbei zeigten sich grundsätzlich ähnliche Stromantwortmuster zwischen den menschlichen Zellen und denen der Maus, was für große genetische Gemeinsamkeiten spricht.¹⁰² Es gibt zahlreiche Tierversuche, in denen auch Schweine als menschliche Modelle für die Forschung genutzt wurden.^{104,105} Nichtsdestotrotz bleibt diese Herangehensweise ein Modell und kann nicht unmittelbar auf den Menschen übertragen werden.

Zu guter Letzt ist allgemein anerkannt, dass man In-vitro-Daten nicht eins zu eins auf einen lebenden Organismus übertragen kann. Die Übertragung auf einen menschlichen Organismus ist dementsprechend nur eingeschränkt möglich. Die Umgebungsverhältnisse und die Physiologie in vivo können anhand von Zellmodellen nur unzureichend simuliert werden. In dieser Arbeit wurden Messungen auf zellbiologischer Ebene durchgeführt, was nur ein erster Schritt zur Erforschung der Physiologie des Tumors sein kann.

4.6.2 TRP-Kanal-Pharmakologie

Bei der Verwendung von Chemikalien zur Kanalaktivierung bestimmter Subgruppen von TRP-Kanälen lässt sich nicht sicherstellen, dass nur ein bestimmter TRP-Kanal aktiviert wird. So ist Icilin dafür bekannt, ein effizienter Aktivator von TRPM8 zu sein. Es gibt jedoch Studien, die belegen, dass Icilin zusätzlich TRPA1 aktiviert.⁸⁴ Somit besteht keine 100-prozentige Selektivität für einen dieser beiden TRP-Kanäle. Ein spezifischer TRPM8-Agonist ist Menthol, das eine größere Selektivität aufweist, jedoch nicht so potent und effektiv wie Icilin ist.⁵⁴ BCTC ist ein etablierter TRPM8-Blocker⁹⁷, seitdem die inhibierenden Effekte auf die intrazellulären Ca²⁺-Ströme denen ähneln, die in anderen Studien nach Abschaltung des TRPM8-Gens registriert wurden.^{98,99} Auf der anderen Seite konnte eine TRPV1-Blockierung durch BCTC registriert werden, die durch 5 µM CAP durch BCTC gehemmt wurde. Dies war jedoch nur bei geringen CAP-Konzentrationen möglich. Die Hemmung konnte bei 20 µM nicht bestätigt werden.¹⁰⁰ TRPM8 und TRPV1 haben somit neben den funktionellen auch pharmakologische

Gemeinsamkeiten aufzuweisen. So gibt es signifikante Überschneidungen zwischen den antagonistisch wirkenden Substanzen beider Kanäle. Dies gilt nicht nur für BCTC, sondern auch für CPZ.⁷³ Insgesamt kann man sagen, dass noch immer eine gewisse Unsicherheit bezüglich der pharmakologischen Eigenschaften der TRP-Modulatoren besteht, obwohl viele gut etabliert sind. Um bestimmte Kanäle zu erforschen, ist die Abschaltung einzelner kanalspezifischer Gene (RNA-Silencing) eine Alternative zur pharmakologischen Blockierung.¹⁰¹

4.6.3 Technische Limitationen

Im Zusammenhang mit hochsensitiven funktionalen Untersuchungen wie dem Calcium-Imaging und der planaren Patch-Clamp-Technik gibt es immer eine relativ hohe Datenstreuung aufgrund des mehr oder weniger großen Signal-Rausch-Verhältnisses. So können Fluoreszenzanstiege meistens nur ab unphysiologisch hohen Konzentrationen von Chemikalien gemessen werden, da bei niedrigen Konzentrationen die Fluoreszenzänderungen nicht oder kaum detektierbar sind. Somit haben diese Techniken nur eine limitierte Aussagekraft. Auf der anderen Seite können durch neue Protokolle und Verbesserungen der Messtechnik bessere Verhältnisse geschaffen werden, die zu reproduzierbareren und zuverlässigeren Daten führen. Deshalb war die Entwicklung der planaren Patch-Clamp-Technik im Gegensatz zur klassischen Methode, die u. a. einen großen Zeitaufwand und hohes Geschick des Experimentators erfordert, ein Meilenstein in der Entwicklung.⁶⁷

In den Untersuchungen für diese Doktorarbeit konnten bei den Patch-Clamp-Messungen geringe Ströme ohne Stimulation durch CAP registriert werden. Dies kann u. a. darauf beruhen, dass sich Anionenströme einstellen, da einige Komponenten der intra- und der extrazellulären Lösung Chlorid enthalten. Durch die Stimulation mit CAP kommt es zum Anstieg der einwärts gerichteten Ströme, wobei es sich aufgrund des starken Konzentrationsgradienten überwiegend um Ca^{2+} handelt.

Trotz des Versuches, für alle Calcium-Imaging-Messungen gleiche Bedingungen zu schaffen, konnte es bei den Wachstumsbedingungen leichte Unterschiede z. B. durch unterschiedliche Raumtemperaturen oder Änderungen der Luftfeuchtigkeit geben. Dies führt zu Messunterschieden und Schwankungen in der Basislinie. So könnten Unterschiede in der Basislinie in den ersten 3 Min. mit der Adaption der Zellen an die

Raumtemperatur zusammenhängen. Ebenso können zum Zeitpunkt des Pipettierens durch zu starke Umwälzungen in der Badkammer bei ca. 180 Sek. Artefakte auftreten. Kleine Unregelmäßigkeiten im Verlauf des Graphen entstehen u. a. auch durch spontane Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Organellen u. a. aus dem endoplasmatischen Retikulum. Die Irreversibilität der Ca^{2+} -Antwort kann durch den großen Ca^{2+} -Einstrom in Gegenwart von unphysiologisch hohen Pharmakakonzentrationen begründet werden. Diese großen Schwankungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kann die Zelle nicht mehr vollständig kompensieren.

5 Quellenverzeichnis

1. Papastefanou VP, Cohen VM. Uveal melanoma. *J Skin Cancer* 2011;2011:573974.
2. Shields CL, Furuta M, Mashayekhi A, Berman EL, Zahler JD, Hoberman DM, Dinh DH, Shields JA. Clinical spectrum of choroidal nevi based on age at presentation in 3422 consecutive eyes. *Ophthalmology* 2008;115:546-52.e2.
3. Singh AD, Kalyani P, Topham A. Estimating the risk of malignant transformation of a choroidal nevus. *Ophthalmology* 2005;112:1784-9.
4. Kivelä T, Eskelin S. Transformation of nevus to melanoma. *Ophthalmology* 2006;113:887-8.e1.
5. Weis E, Shah CP, Lajous M, Shields JA, Shields CL. The association between host susceptibility factors and uveal melanoma: a meta-analysis. *Arch Ophthalmol* 2006;124:54-60.
6. Singh AD, Turell ME, Topham AK. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology* 2011;118:1881-5.
7. Chang AE, Karnell LH, Menck HR. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer* 1998;83:1664-78.
8. Shields CL, Kaliki S, Furuta M, Mashayekhi A, Shields JA. Clinical spectrum and prognosis of uveal melanoma based on age at presentation in 8,033 cases. *Retina* 2012;32:1363-72.
9. Grossniklaus HE. Progression of ocular melanoma metastasis to the liver: the 2012 Zimmerman lecture. *JAMA Ophthalmol* 2013;131:462-9.
10. Woodman SE. Metastatic uveal melanoma: biology and emerging treatments. *Cancer J* 2012;18:148-52.
11. Group. COMS. Assessment of metastatic disease status at death in 435 patients with large choroidal melanoma in the Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS): COMS report no. 15. *Arch Ophthalmol* 2001;119:670-6.
12. Blanco PL, Lim LA, Miyamoto C, Burnier MN. Uveal melanoma dormancy: an acceptable clinical endpoint? *Melanoma Res* 2012;22:334-40.
13. Shields CL, Manalac J, Das C, Ferguson K, Shields JA. Choroidal melanoma: clinical features, classification, and top 10 pseudomelanomas. *Curr Opin Ophthalmol* 2014;25:177-85.
14. Prescher G, Bornfeld N, Hirche H, Horsthemke B, Jöckel KH, Becher R. Prognostic implications of monosomy 3 in uveal melanoma. *Lancet* 1996;347:1222-5.
15. Foss AJ, Whelehan I, Hungerford JL, Anderson DF, Errington RD, Kacperek A, Restori M, Kongerud J, Sheen M. Predictive factors for the development of rubeosis following proton beam radiotherapy for uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* 1997;81:748-54.

16. Gragoudas ES, Li W, Lane AM, Munzenrider J, Egan KM. Risk factors for radiation maculopathy and papillopathy after intraocular irradiation. *Ophthalmology* 1999;106:1571-7; discussion 7-8.
17. Pereira PR, Odashiro AN, Lim LA, Miyamoto C, Blanco PL, Odashiro M, Maloney S, De Souza DF, Burnier MN Jr. Current and emerging treatment options for uveal melanoma. *Clin Ophthalmol* 2013;7:1669-82.
18. Aaberg TM, Bergstrom CS, Hickner ZJ, Lynn MJ. Long-term results of primary transpupillary thermal therapy for the treatment of choroidal malignant melanoma. *Br J Ophthalmol* 2008;92:741-6.
19. Shields CL, Cater J, Shields JA, Chao A, Krema H, Materin M, Brady LW. Combined plaque radiotherapy and transpupillary thermotherapy for choroidal melanoma: tumor control and treatment complications in 270 consecutive patients. *Arch Ophthalmol* 2002;120:933-40.
20. Puusaari I, Heikkonen J, Summanen P, Tarkkanen A, Kivelä T. Iodine brachytherapy as an alternative to enucleation for large uveal melanomas. *Ophthalmology* 2003;110:2223-34.
21. Carafoli E. The unusual history and unique properties of calcium signal. In: Krebs J, Michalak M, eds. *Calcium: A Matter of Life and Death*. Oxford, England: Elsevier, 2007: 3-20.
22. Korbmacher C, Greger R, Brenner B, Silbernagel S. Die Zelle als Grundbaustein. In: Klinke R, Pape H-C, Silbernagl S, eds. *Physiologie*. 5. Auflage ed. Thieme; Deutschland: Georg Thieme Verlag, 2005: 22-23.
23. Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003;426:517-24.
24. Bödding M. TRP proteins and cancer. *Cell Signal* 2007;19:617-24.
25. Nilius B. TRP channels in disease. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:805-12.
26. Wu LJ, Sweet TB, Clapham DE. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVI. Current progress in the mammalian TRP ion channel family. *Pharmacol Rev* 2010;62:381-404.
27. Fixemer T, Wissenbach U, Flockerzi V, Bonkhoff H. Expression of the Ca²⁺-selective cation channel TRPV6 in human prostate cancer: a novel prognostic marker for tumor progression. *Oncogene* 2003;22:7858-61.
28. Zhuang L, Peng JB, Tou L, Takanaga H, Adam RM, Hediger MA, Freeman MR. Calcium-selective ion channel, CaT1, is apically localized in gastrointestinal tract epithelia and is aberrantly expressed in human malignancies. *Lab Invest* 2002;82:1755-64.
29. Minke B. Drosophila mutant with a transducer defect. *Biophys Struct Mech* 1977;3:59-64.
30. Montell C, Rubin GM. Molecular characterization of the Drosophila trp locus: a putative integral membrane protein required for phototransduction. *Neuron* 1989;2:1313-23.
31. Montell C. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 2005;2005:re3.

32. Nilius B, Owsianik G. The transient receptor potential family of ion channels. *Genome Biol* 2011;12:218.
33. Prevarskaya N, Zhang L, Barritt G. TRP channels in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2007;1772:937-46.
34. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med* 2010;16:107-21.
35. Monet M, Lehen'kyi V, Gackiere F, Firllej V, Vandenberghe M, Roudbaraki M, Gkika D, Pourtier A, Bidaux G, Slomianny C, Delcourt P, Rassendren F, Bergerat JP, Ceraline J, Cabon F, Humez S, Prevarskaya N. Role of cationic channel TRPV2 in promoting prostate cancer migration and progression to androgen resistance. *Cancer Res* 2010;70:1225-35.
36. Morelli MB, Nabissi M, Amantini C, Farfariello V, Ricci-Vitiani L, di Martino S, Pallini R, Larocca LM, Caprodossi S, Santoni M, De Maria R, Santoni G. The transient receptor potential vanilloid-2 cation channel impairs glioblastoma stem-like cell proliferation and promotes differentiation. *Int J Cancer* 2012;131:E1067-77.
37. Zhang L, Barritt GJ. TRPM8 in prostate cancer cells: a potential diagnostic and prognostic marker with a secretory function? *Endocr Relat Cancer* 2006;13:27-38.
38. Pan Z, Wang Z, Yang H, Zhang F, Reinach PS. TRPV1 activation is required for hypertonicity-stimulated inflammatory cytokine release in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:485-93.
39. Nilius B, Szallasi A. Transient receptor potential channels as drug targets: from the science of basic research to the art of medicine. *Pharmacol Rev* 2014;66:676-814.
40. Voets T, Droogmans G, Wissenbach U, Janssens A, Flockerzi V, Nilius B. The principle of temperature-dependent gating in cold- and heat-sensitive TRP channels. *Nature* 2004;430:748-54.
41. Mergler S, Garreis F, Sahlmüller M, Reinach PS, Paulsen F, Pleyer U. Thermosensitive transient receptor potential channels in human corneal epithelial cells. *J Cell Physiol* 2011;226:1828-42.
42. Zhang F, Yang H, Wang Z, Mergler S, Liu H, Kawakita T, Tachado SD, Pan Z, Capó-Aponte JE, Pleyer U, Koziel H, Kao WW, Reinach PS. Transient receptor potential vanilloid 1 activation induces inflammatory cytokine release in corneal epithelium through MAPK signaling. *J Cell Physiol* 2007;213:730-9.
43. Mergler S, Garreis F, Sahlmüller M, Lyras EM, Reinach PS, Dwarakanath A, Paulsen F, Pleyer U. Calcium regulation by thermo- and osmosensing transient receptor potential vanilloid channels (TRPVs) in human conjunctival epithelial cells. *Histochem Cell Biol* 2012;137:743-61.
44. Mergler S, Cheng Y, Skosyrski S, Garreis F, Pietrzak P, Kociok N, Dwarakanath A, Reinach PS, Kakkassery V. Altered calcium regulation by thermosensitive transient receptor potential channels in etoposide-resistant WERI-Rb1 retinoblastoma cells. *Exp Eye Res* 2012;94:157-73.
45. Sanchez MG, Sanchez AM, Collado B, Malagarie-Cazenave S, Olea N, Carmena MJ, Prieto JC, Diaz-Laviada I. Expression of the transient receptor potential vanilloid 1

- (TRPV1) in LNCaP and PC-3 prostate cancer cells and in human prostate tissue. *Eur J Pharmacol* 2005;515:20-7.
46. Mergler S, Skrzypski M, Sassek M, Pietrzak P, Pucci C, Wiedenmann B, Strowski MZ. Thermo-sensitive transient receptor potential vanilloid channel-1 regulates intracellular calcium and triggers chromogranin A secretion in pancreatic neuroendocrine BON-1 tumor cells. *Cell Signal* 2012;24:233-46.
 47. Caprodossi S, Amantini C, Nabissi M, Morelli MB, Farfariello V, Santoni M, Gismondi A, Santoni G. Capsaicin promotes a more aggressive gene expression phenotype and invasiveness in null-TRPV1 urothelial cancer cells. *Carcinogenesis* 2011;32:686-94.
 48. Lazzeri M, Vannucchi MG, Zardo C, Spinelli M, Beneforti P, Turini D, Faussone-Pellegrini MS. Immunohistochemical evidence of vanilloid receptor 1 in normal human urinary bladder. *Eur Urol* 2004;46:792-8.
 49. Lazzeri M, Vannucchi MG, Spinelli M, Bizzoco E, Beneforti P, Turini D, Faussone-Pellegrini MS. Transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) expression changes from normal urothelium to transitional cell carcinoma of human bladder. *Eur Urol* 2005;48:691-8.
 50. Stock K, Kumar J, Synowitz M, Petrosino S, Imperatore R, Smith ES, Wend P, Purfürst B, Nuber UA, Gurok U, Matyash V, Wälzlein JH, Chirasani SR, Dittmar G, Cravatt BF, Momma S, Lewin GR, Ligresti A, De Petrocellis L, Cristino L, Di Marzo V, Kettenmann H, Glass R. Neural precursor cells induce cell death of high-grade astrocytomas through stimulation of TRPV1. *Nat Med* 2012;18:1232-8.
 51. Bley K, Boorman G, Mohammad B, McKenzie D, Babbar S. A comprehensive review of the carcinogenic and anticarcinogenic potential of capsaicin. *Toxicol Pathol* 2012;40:847-73.
 52. Skrzypski M, Sassek M, Abdelmessih S, Mergler S, Grötzinger C, Metzke D, Wojciechowicz T, Nowak KW, Strowski MZ. Capsaicin induces cytotoxicity in pancreatic neuroendocrine tumor cells via mitochondrial action. *Cell Signal* 2014;26:41-8.
 53. Zhang R, Humphreys I, Sahu RP, Shi Y, Srivastava SK. In vitro and in vivo induction of apoptosis by capsaicin in pancreatic cancer cells is mediated through ROS generation and mitochondrial death pathway. *Apoptosis* 2008;13:1465-78.
 54. McKemy DD, Neuhauser WM, Julius D. Identification of a cold receptor reveals a general role for TRP channels in thermosensation. *Nature* 2002;416:52-8.
 55. Tsavaler L, Shapero MH, Morkowski S, Laus R. Trp-p8, a novel prostate-specific gene, is up-regulated in prostate cancer and other malignancies and shares high homology with transient receptor potential calcium channel proteins. *Cancer Res* 2001;61:3760-9.
 56. Prevarskaya N, Flourakis M, Bidaux G, Thebault S, Skryma R. Differential role of TRP channels in prostate cancer. *Biochem Soc Trans* 2007;35:133-5.
 57. Henshall SM, Afar DE, Hiller J, Horvath LG, Quinn DI, Rasiah KK, Gish K, Willhite D, Kench JG, Gardiner-Garden M, Stricker PD, Scher HI, Grygiel JJ, Agus DB, Mack DH, Sutherland RL. Survival analysis of genome-wide gene expression profiles of prostate cancers identifies new prognostic targets of disease relapse. *Cancer Res* 2003;63:4196-203.

58. Yamamura H, Ugawa S, Ueda T, Morita A, Shimada S. TRPM8 activation suppresses cellular viability in human melanoma. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008;295:C296-301.
59. De Waard-Siebinga I, Blom DJ, Griffioen M, Schrier PI, Hoogendoorn E, Beverstock G, Danen EH, Jager MJ. Establishment and characterization of an uveal-melanoma cell line. *Int J Cancer* 1995;62:155-61.
60. Hurks HM, Metzelaar-Blok JA, Mulder A, Claas FH, Jager MJ. High frequency of allele-specific down-regulation of HLA class I expression in uveal melanoma cell lines. *Int J Cancer* 2000;85:697-702.
61. Mergler S, Derckx R, Reinach PS, Garreis F, Böhm A, Schmelzer L, Skosyrski S, Ramesh N, Abdelmessih S, Polat OK, Khajavi N, Riechardt AI. Calcium regulation by temperature-sensitive transient receptor potential channels in human uveal melanoma cells. *Cell Signal* 2014;26:56-69.
62. Valtink M, Engelmann K. Serum-free cultivation of adult normal human choroidal melanocytes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007;245:1487-94.
63. Barreto-Chang OL, Dolmetsch RE. Calcium imaging of cortical neurons using Fura-2 AM. *J Vis Exp* 2009;(23). pii: 1067. doi: 10.3791/1067
64. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260(6):3440-50.
65. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 1981;391:85-100.
66. Neher E, Sakmann B. The patch clamp technique. *Sci Am* 1992;266:44-51.
67. Milligan CJ, Li J, Sukumar P, Majeed Y, Dallas ML, English A, Emery P, Porter KE, Smith AM, McFadzean I, Beccano-Kelly D, Bahnasi Y, Cheong A, Naylor J, Zeng F, Liu X, Gamper N, Jiang LH, Pearson HA, Peers C, Robertson B, Beech DJ. Robotic multiwell planar patch-clamp for native and primary mammalian cells. *Nat Protoc* 2009;4:244-55.
68. Neher E, Sakmann B. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature* 1976;260:799-802.
69. Brüggemann A, Stoelzle S, George M, Behrends JC, Fertig N. Microchip technology for automated and parallel patch-clamp recording. *Small* 2006;2:840-6.
70. Mergler S, Valtink M, Coulson-Thomas VJ, Lindemann D, Reinach PS, Engelmann K, Pleyer U. TRPV channels mediate temperature-sensing in human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2010;90:758-70.
71. Nagy I, Friston D, Valente JS, Torres Perez JV, Andreou AP. Pharmacology of the capsaicin receptor, transient receptor potential vanilloid type-1 ion channel. *Prog Drug Res* 2014;68:39-76.
72. Vriens J, Appendino G, Nilius B. Pharmacology of vanilloid transient receptor potential cation channels. *Mol Pharmacol* 2009;75:1262-79.

73. Weil A, Moore SE, Waite NJ, Randall A, Gunthorpe MJ. Conservation of functional and pharmacological properties in the distantly related temperature sensors TRPV1 and TRPM8. *Mol Pharmacol* 2005;68:518-27.
74. Andreoli MT, Mieler WF, Leiderman YI. Epidemiological trends in uveal melanoma. *Br J Ophthalmol* 2015;99:1550-3.
75. Valero M, Morenilla-Palao C, Belmonte C, Viana F. Pharmacological and functional properties of TRPM8 channels in prostate tumor cells. *Pflugers Arch* 2011;461:99-114.
76. Mergler S, Strowski MZ, Kaiser S, Plath T, Giesecke Y, Neumann M, Hosokawa H, Kobayashi S, Langrehr J, Neuhaus P, Plöckinger U, Wiedenmann B, Grötzinger C. Transient receptor potential channel TRPM8 agonists stimulate calcium influx and neurotensin secretion in neuroendocrine tumor cells. *Neuroendocrinology* 2007;85:81-92.
77. Gkika D, Prevarskaya N. Molecular mechanisms of TRP regulation in tumor growth and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:953-8.
78. Crawford DC, Moulder KL, Gereau RW, Story GM, Mennerick S. Comparative effects of heterologous TRPV1 and TRPM8 expression in rat hippocampal neurons. *PLoS One* 2009;4:e8166.
79. Garreis F, Schröder A, Reinach PS, Zoll S, Khajavi N, Dhandapani P, Lucius A, Pleyer U, Paulsen F, Mergler S. Upregulation of Transient Receptor Potential Vanilloid Type-1 Channel Activity and Ca²⁺ Influx Dysfunction in Human Pterygial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2016;57:2564-77.
80. Hu DN, McCormick SA, Ritch R, Pelton-Henrion K. Studies of human uveal melanocytes in vitro: isolation, purification and cultivation of human uveal melanocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:2210-9.
81. Choi TY, Park SY, Jo JY, Kang G, Park JB, Kim JG, Hong SG, Kim CD, Lee JH, Yoon TJ. Endogenous expression of TRPV1 channel in cultured human melanocytes. *J Dermatol Sci* 2009;56:128-30.
82. Mergler S, Valtink M, Takayoshi S, Okada Y, Miyajima M, Saika S, Reinach PS. Temperature-sensitive transient receptor potential channels in corneal tissue layers and cells. *Ophthalmic Res* 2014;52:151-9.
83. McKemy DD. How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation. *Mol Pain* 2005;1:16.
84. Rawls SM, Gomez T, Ding Z, Raffa RB. Differential behavioral effect of the TRPM8/TRPA1 channel agonist icilin (AG-3-5). *Eur J Pharmacol* 2007;575:103-4.
85. Guo H, Carlson JA, Slominski A. Role of TRPM in melanocytes and melanoma. *Exp Dermatol* 2012;21:650-4.
86. Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, Woolf EA, Tepper RI, Shyjan AW. Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer Res* 1998;58:1515-20.
87. Mergler S, Mertens C, Valtink M, Reinach PS, Székely VC, Slavi N, Garreis F, Abdelmessih S, Türker E, Fels G, Pleyer U. Functional significance of thermosensitive

- transient receptor potential melastatin channel 8 (TRPM8) expression in immortalized human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2013;116:337-49.
88. Mashayekhi A, Shields CL, Rishi P, Atalay HT, Pellegrini M, McLaughlin JP, Patrick KA, Morton SJ, Remmer MH, Parendo A, Schlitt MA, Shields JA. Primary transpupillary thermotherapy for choroidal melanoma in 391 cases: importance of risk factors in tumor control. *Ophthalmology* 2015;122:600-9.
 89. Cordeiro S, Seyler S, Stindl J, Milenkovic VM, Strauss O. Heat-sensitive TRPV channels in retinal pigment epithelial cells: regulation of VEGF-A secretion. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51:6001-8.
 90. Notting IC, Missotten GS, Sijmons B, Boonman ZF, Keunen JE, van der Pluijm G. Angiogenic profile of uveal melanoma. *Curr Eye Res* 2006;31:775-85.
 91. Missotten GS, Notting IC, Schlingemann RO, Zijlmans HJ, Lau C, Eilers PH, Keunen JE, Jager MJ. Vascular endothelial growth factor a in eyes with uveal melanoma. *Arch Ophthalmol* 2006;124:1428-34.
 92. Li J, Cui Y, Wang Q, Guo D, Pan X, Wang X, Bi H, Chen W, Liu Z, Zhao S. The proliferation of malignant melanoma cells could be inhibited by ranibizumab via antagonizing VEGF through VEGFR1. *Mol Vis* 2014;20:649-60.
 93. Liu T, Fang Z, Wang G, Shi M, Wang X, Jiang K, Yang Z, Cao R, Tao H, Wang X, Zhou J. Anti-tumor activity of the TRPM8 inhibitor BCTC in prostate cancer DU145 cells. *Oncol Lett* 2016;11:182-8.
 94. Wissenbach U, Niemeyer B, Himmerkus N, Fixemer T, Bonkhoff H, Flockerzi V. TRPV6 and prostate cancer: cancer growth beyond the prostate correlates with increased TRPV6 Ca²⁺ channel expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;322:1359-63.
 95. Griewank KG, Yu X, Khalili J, Sozen MM, Stempke-Hale K, Bernatchez C, Wardell S, Bastian BC, Woodman SE. Genetic and molecular characterization of uveal melanoma cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res* 2012;25:182-7.
 96. Khalili JS, Yu X, Wang J, Hayes BC, Davies MA, Lizee G, Esmaeli B, Woodman SE. Combination small molecule MEK and PI3K inhibition enhances uveal melanoma cell death in a mutant GNAQ- and GNA11-dependent manner. *Clin Cancer Res* 2012;18:4345-55.
 97. Behrendt HJ, Germann T, Gillen C, Hatt H, Jostock R. Characterization of the mouse cold-menthol receptor TRPM8 and vanilloid receptor type-1 VR1 using a fluorometric imaging plate reader (FLIPR) assay. *Br J Pharmacol* 2004;141:737-45.
 98. Thebault S, Lemonnier L, Bidaux G, Flourakis M, Bavencoffe A, Gordienko D, Roudbaraki M, Delcourt P, Panchin Y, Shuba Y, Skryma R, Prevarskaya N. Novel role of cold/menthol-sensitive transient receptor potential melastatine family member 8 (TRPM8) in the activation of store-operated channels in LNCaP human prostate cancer epithelial cells. *J Biol Chem* 2005;280:39423-35.
 99. Cho Y, Jang Y, Yang YD, Lee CH, Lee Y, Oh U. TRPM8 mediates cold and menthol allergies associated with mast cell activation. *Cell Calcium* 2010;48:202-8.

100. Lucius A, Khajavi N, Reinach PS, Köhrle J, Dhandapani P, Huimann P, Ljubojevic N, Grötzinger C, Mergler S. 3-Iodothyronamine increases transient receptor potential melastatin channel 8 (TRPM8) activity in immortalized human corneal epithelial cells. *Cell Signal* 2016;28:136-47.
101. Skrzypski M, Khajavi N, Mergler S, Szczepankiewicz D, Kołodziejcki PA, Metzke D, Wojciechowicz T, Billert M, Nowak KW, Strowski MZ. TRPV6 channel modulates proliferation of insulin secreting INS-1E beta cell line. *Biochim Biophys Acta* 2015;1853:3202-10.
102. Mergler S. Ca²⁺ channel characteristics in neuroendocrine tumor cell cultures analyzed by color contour plots. *J Neurosci Methods*. 2003 Oct 30;129(2):169-81.
103. Mergler S, Mertens C, Valtink M, Reinach PS, Székely VC, Slavi N, Garreis F, Abdelmessih S, Türker E, Fels G, Pleyer U. Functional significance of thermosensitive transient receptor potential melastatin channel 8 (TRPM8) expression in immortalized human corneal endothelial cells. *Exp Eye Res*. 2013 Nov;116:337-49.
104. Yang K, Ju T, Ho T, McKay CA, Gao Y, Forget SK, Gartner SR, Field CJ, Chan CB1, Willing BP. Early life antibiotic exposure affects pancreatic islet development and metabolic regulation. *Sci Rep*. 2017 Feb 2;7:41778. doi: 10.1038/srep41778.
105. Yang J, Menges S, Gu P, Tongbai R, Samuel M, S Prather R, Klassen H. Porcine neural progenitor cells derived from tissue at different gestational ages can be distinguished by global transcriptome. *Cell Transplant*. 2017 Jan 24. doi: 10.3727/096368916X694355.

Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Stefan Mergler. Er hat mich mit viel Zeit und Geduld in die aufwändigen Methoden des Calcium Imaging und der Patch-Clamp-Technik eingearbeitet. Keine Frage blieb unbeantwortet und auch während des Verfassens der Arbeit hatte ich immer einen Ansprechpartner, der mir bei der Lösung von Problemen sehr geholfen hat. Durch ihn habe ich ein gutes Verständnis darüber bekommen, was wissenschaftliches Arbeiten bedeutet. Danke!

Des Weiteren danke ich dem Team rund um Mergler et. al., welches mich freundlicherweise bei der Zellkultur und der Präparation der Schweineaugenmelanozyten unterstützt hat und für angeregte Diskussionen bereitstand. Besonderen Dank gilt dabei Gabriele Fels und Noushafarin Khajavi.

Zusätzlich danke ich Martine Jager und ihren Kollegen (Leiden Universität, Niederlande) für die Bereitstellung der humanen Aderhautmelanomzelllinie (92.1).

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die mich in allem was ich tue unterstützt.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Arina Böhm, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Charakterisierung von temperatur-sensitiven Transient Rezeptor Potential Kanälen in kultivierten Aderhautmelanomzellen (92.1)“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Arina Böhm hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation:

Mergler S, Derckx R, Reinach PS, Garreis F, Böhm A, Schmelzer L, Skosyrki S, Ramesh N, Abdelmessih S, Kerem Polat O, Khajavi N, Riechardt A, Calcium regulation by temperature-sensitive transient receptor potential channels in human uveal melanoma cells. Cell Signal 2014, 26:56-69.

Beitrag im Einzelnen: Durchführung von Calcium Imaging und Patch-Clamp Experimenten mit Aderhautmelanomzellen 92.1 (physikalische Kühlung und Anwendung der Pharmaka Capsaicin, Capsazepine, Icilin und BCTC) sowie die Erstellung von Diagrammen und Statistiken.

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Mergler S, Derckx R, Reinach PS, Garreis F, Böhm A, Schmelzer L, Skosyrki S, Ramesh N, Abdelmessih S, Kerem Polat O, Khajavi N, Riechardt A, Calcium regulation by temperature-sensitive transient receptor potential channels in human uveal melanoma cells. *Cell Signal* 2014, 26:56-69.