

Aus dem Fachbereich Biophysik  
Theoretische Medizin und Biowissenschaften der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar

# **Die Rolle des mitochondrialen Kalzium Uniporters im Melanom**

The role of the mitochondrial calcium uniporter for melanoma

## **Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors  
der Naturwissenschaften

**der Medizinischen Fakultät  
der Universität des Saarlandes**

**2018**

vorgelegt von

Katharina Marie Zimmermann  
geb. am 18.05.1988 in Würzburg



# ***Inhaltsverzeichnis***

<b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....	<b>7</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>9</b>
<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>11</b>
1.1 <i>Das maligne Melanom</i> .....	11
1.1.1 Definition und Risikofaktoren.....	11
1.1.2 Behandlungsmöglichkeiten des Melanoms .....	12
1.2 <i>Kalziumsignale und Krebs</i> .....	13
1.2.1 Veränderungen der Kalziumhomöostase in Tumorzellen .....	13
1.2.2 Kalziumregulation im Melanom.....	14
1.3 <i>Die Bedeutung der Mitochondrien</i> .....	16
1.3.1 Aufbau und Funktion von Mitochondrien.....	16
1.3.2 Mitochondrien und ihre vielfältige Rolle im Melanom .....	18
1.4 <i>Kalzium in Mitochondrien</i> .....	20
1.4.1 Mitochondriales Kalzium als Regulator zellulärer Prozesse.....	20
1.4.2 Die mitochondriale Kalziumhomöostase .....	21
1.4.3 Der mitochondriale Kalzium Uniporter und seine Regulatoren.....	22
1.5 <i>Zielsetzung</i> .....	26
<b>2. MATERIALIEN</b> .....	<b>27</b>
2.1 <i>Antikörper</i> .....	27
2.1.1 Primärantikörper .....	27
2.1.2 Sekundärantikörper.....	27
2.2 <i>Chemikalien</i> .....	27
2.3 <i>Größenstandards</i> .....	29
2.4 <i>Laborgeräte</i> .....	29
2.5 <i>Lösungen</i> .....	30
2.5.1 Kalzium-Lösungen .....	30
2.5.2 SDS-PAGE und Western Blot-Lösungen.....	30
2.6 <i>Mikroskope und Messplatz-Komponenten</i> .....	32
2.7 <i>Oligonukleotide</i> .....	33
2.7.1 qRT-PCR Primer.....	33
2.7.2 siRNA.....	33
2.8 <i>Kits /Reagenzien-Systeme</i> .....	33
2.9 <i>Vektoren und Konstrukte</i> .....	34

2.10 Verbrauchsmaterialien .....	34
2.11 Zellkulturmaterialien.....	35
2.11.1 Kulturmedien und Zusätze .....	35
2.11.2 Transfektionsreagenzien.....	35
2.11.3 Zelllinien und Primärzellen.....	35
<b>3. METHODEN .....</b>	<b>37</b>
3.1 Zellkultur.....	37
3.2 Stabile shRNA-Knockdown Melanomlinien.....	37
3.2.1 Herstellung stabiler Zelllinien mit Hilfe eines lentiviralen Systems.....	37
3.2.2 RNA Interferenz.....	38
3.3 Proliferations- und Viabilitätsassays.....	38
3.3.1 Zellzählung.....	38
3.3.2 Umsetzung von Resazurin oder MTT.....	39
3.4 Sphäroidbildung.....	39
3.5 Bestimmung der Expressionslevel auf RNA-Ebene.....	40
3.5.1 RNA-Isolation.....	40
3.5.2 Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA.....	40
3.5.3 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) .....	40
3.6 Transfektion.....	41
3.6.1 Elektroporation mittels Amaxa Kit.....	41
3.6.2 Fugene HD-Transfektion.....	42
3.7 Transwell-Migration.....	42
3.8 Imaging .....	43
3.8.1 Fura-2AM basiertes Kalzium-Imaging.....	43
3.8.2 Sensor-basiertes Imaging mit genetisch kodierten Fluoreszenzindikatoren .....	43
3.8.3 Genetisch kodierte Kalziumsensoren .....	45
3.8.4 Messungen mit genetisch kodierten Sensoren .....	46
3.8.4.1 Einzelzellmessungen .....	46
3.8.4.2 Well-Messungen im Plate Reader .....	46
3.9 FACS.....	47
3.10 Proteinbiochemie.....	47
3.10.1 Probenherstellung.....	47
3.10.2 Proteinbestimmung.....	48
3.10.3 Western Blot.....	48
3.11 Reverse Phase Protein Array (RPPA).....	49
3.12 In vivo Tumorwachstum und Migration .....	50
3.12.1 Induktion von Primärtumoren.....	50
3.12.2 Gewebeschnitte und -färbung zur Untersuchung der Metastasierung <i>in vivo</i> .....	50

<b>4. ERGEBNISSE</b> .....	<b>53</b>
4.1 Nachweis des mitochondrialen Kalzium Uniporters in Melanomzelllinien .....	53
4.2 Herunterregulation von MCU in Melanozyten und Melanomzelllinien.....	54
4.2.1 Transiente Herunterregulation .....	54
4.2.2 Stabile Herunterregulation .....	56
4.3 Zytosolische Kalziumströme in Melanomzellen .....	58
4.4 Der Einfluss von MCU auf das mitochondriale Kalzium in Melanomzellen.....	61
4.5 Auswirkungen von MCU auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies.....	62
4.6 Regulation von Zellzyklus und Proliferation durch mitochondriales Kalzium.....	63
4.6.1 Zellzyklus.....	63
4.6.2 Proliferation .....	65
4.7 Tumorpotential von Melanomzellen mit reduziertem MCU.....	66
4.8 Tumorstadium.....	68
4.9 Auswirkungen von pro- und antioxidativen Substanzen auf MCU-Knockdown Melanomzellen ...	70
4.10 Potentielle Regulationsmechanismen durch MCU.....	72
4.10.1 RPPA Screen.....	72
4.10.2 Überprüfung des RPPA Hits VDAC1 und anderer potentieller Regulatoren im Western Blot .....	73
4.10.2.1 MITF und JARID1B – Marker für verschiedene Phänotypen .....	73
4.10.2.2 PGC1 $\alpha$ .....	74
4.10.2.3 VDAC1 .....	75
4.11 Sensitivität auf die Inhibition verschiedener Signalwege.....	76
4.11.1 Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges.....	77
4.11.2 Inhibition des MAPK-Signalweges.....	79
4.11.3 Inhibition des Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -Austauschers NCX.....	81
<b>5. DISKUSSION</b> .....	<b>83</b>
5.1 Expressionsmuster von MCU und seinen regulierenden Komponenten in Melanozyten und Melanomzellen .....	83
5.2 Etablierung eines Knockdowns von MCU und MICU1.....	85
5.3 Kalziumströme in Melanomzellen unter dem Einfluss von MCU.....	87
5.3.1 Stimulation von Kalziumströmen in Melanozyten und Melanomzellen.....	87
5.3.2 Der Einfluss von Mitochondrien und MCU auf SOCE.....	88
5.3.3 MCU ist verantwortlich für mitochondriale Kalziumströme.....	90
5.4 Produktion von ROS.....	92
5.5 MCU zeigt in vitro keinen Einfluss auf Zellzyklus und Proliferation.....	93

<i>5.6 Die Herunterregulation von MCU führt zu einem verstärkten Potential zur Metastasierung und verringertem Tumorwachstum .....</i>	<i>94</i>
<i>5.7 Auswirkungen des Redox-Milieus auf die Migration.....</i>	<i>96</i>
<i>5.8 Durch MCU beeinflusste Regulationsmechanismen.....</i>	<i>98</i>
<i>5.9 Einfluss von MCU auf die Sensitivität von Melanomzellen gegenüber Inhibitoren.....</i>	<i>101</i>
<i>5.10 Die Rolle von MCU in Krebs .....</i>	<i>105</i>
<i>5.11 Abschließende Bemerkungen .....</i>	<i>106</i>
<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>107</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>133</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS .....</b>	<b>134</b>
<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>135</b>
<b>ANHANG.....</b>	<b>139</b>

## Zusammenfassung

Das maligne Melanom gehört zu den am häufigsten vorkommenden Krebsarten und ist die tödlichste Form von Hautkrebs. Melanomzellen können bereits in sehr frühen Stadien in Lymphknoten und weiter entfernte Organe metastasieren, was die Lebenserwartung der betroffenen Patienten stark verringert. Trotz intensiver Forschung konnte die Mortalitätsrate bisher kaum verringert werden. Zudem entwickeln Melanomzellen nach anfänglicher Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika und Signalweginhibitoren schnell diverse Resistenzmechanismen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Mitochondrien dabei eine essentielle Rolle einnehmen und einen Einfluss auf die Pathologie des Melanoms haben. Mitochondrien sind in der Lage große Mengen an Kalzium aufzunehmen und somit auch zytosolische Kalziumsignale zu beeinflussen. Während die äußere mitochondriale Membran durchlässig für Ionen und Moleküle ist, wird der Transport von Kalzium über die innere mitochondriale Membran durch Kanäle und Transporter kontrolliert. Der Hauptmechanismus der Kalziumaufnahme ist dabei der Komplex des mitochondrialen Kalzium Uniporters. Dieser besteht aus dem porenbildenden Protein MCU und seinen Regulatoren MICU1, MICU2, MICU3, EMRE und MCUb, welche die Kanalaktivität in Abhängigkeit von Kalzium kontrollieren. Es ist bereits bekannt, dass sowohl die zelluläre Signalgebung durch Kalzium als auch durch Redox-Prozesse wichtig für die Biologie des Melanoms ist. Beispielsweise können Wachstum und Invasion von Melanomzellen hierdurch reguliert werden. Allerdings lagen bisher noch keine Daten dazu vor, welchen Einfluss das durch MCU kontrollierte mitochondriale Kalzium auf die Biologie des Melanoms hat. Diese Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht.

Dabei konnte anhand von Daten aus qRT-PCRs und Western Blots zunächst gezeigt werden, dass die einzelnen Komponenten des Komplexes in verschiedenen Melanomzelllinien und in gesunden primären Melanozyten in unterschiedlichen Ausprägungen exprimiert werden. Mit Hilfe von siRNA oder shRNA-Konstrukten konnte in den beiden Melanomlinien WM3734 und 1205Lu eine effiziente Herunterregulation von MCU erreicht werden, die zu verringerten basalen Kalziumkonzentrationen sowie einem reduzierten Einstrom von Kalzium in die Mitochondrien führte. Messungen mit genetisch kodierten Fluoreszenz-basierten Sensoren zeigten weiterhin, dass zusätzlich zu verringerten mitochondrialen Kalziumströmen auch geringere Mengen an reaktivem Wasserstoffperoxid in Melanomzellen mit herunterreguliertem MCU vorliegen. In standardmäßig eingesetzten MTT-Assays und Zellzählungen konnte zunächst kein signifikanter Einfluss von MCU auf die Zellproliferation festgestellt werden. Bei der Untersuchung des Wachstums von dreidimensionalen Sphäroiden zeigte sich jedoch ein verringertes Wachstum von Zellen bei stabiler Herunterregulation des Kanals. Auch in darauf folgenden *in vivo* Versuchen konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Hier wiesen Mäuse mit Primärtumoren aus Melanomzellen ohne MCU ein signifikant geringeres Wachstum des Tumors auf. Eine inverse Korrelation zeigte sich dagegen zwischen MCU und der Migration und Invasion. Anhand von Transwell-Migrations-Assays und Kollagen-Invasions-Assays konnte beobachtet werden, dass die Herunterregulation von MCU mit einer Verstärkung des migratorischen und invasiven Potentials von Melanomzellen einhergeht. Auch die Daten der *in vivo* Experimente weisen auf eine erhöhte Metastasierung nach Herunterregulation von MCU hin. In dieser Arbeit sollten weiterhin mit Hilfe eines RPPA-Screens mögliche Mechanismen einer Regulation Tumor-relevanter Signalwege durch MCU identifiziert werden. Dabei konnte VDAC1, ein Ionenkanal in der äußeren mitochondrialen Membran, als interessanter Kandidat detektiert werden, der in Folge einer MCU

Herunterregulation in verringerten Mengen vorlag. Die Überprüfung und Validierung dieses Ergebnisses erfolgte mittels Western Blot, wobei eine verringerte Proteinexpression nach transienter MCU Herunterregulation mittels siRNA in 1205Lu Zellen beobachtet werden konnte. Weiterhin wurden Viabilitätsassays durchgeführt, um einen Einfluss von MCU auf die Sensitivität von Melanomzellen gegenüber Signalweginhibitoren zu untersuchen. Dabei zeigten die untersuchten Zelllinien WM3734 und 1205Lu eine stärkere Reduktion ihres Wachstums durch Inhibitoren des MAPK-Signalweges im Vergleich zu Inhibitoren des PI3K/Akt-Signalweges. Unabhängig davon wiesen Zellen mit einer stabilen Herunterregulation von MCU eine höhere Sensitivität gegenüber den eingesetzten Inhibitoren auf als Melanomzellen mit normalen MCU-Leveln.

Zusammenfassend kontrolliert MCU den mitochondrialen Kalziumeinstrom in Melanomzellen und damit auch relevante Prozesse für die Pathogenese des Melanoms, wie Invasion, Migration und Proliferation der Tumorzellen. Weiterhin konnte ein Einfluss von MCU auf die Sensitivität von Melanomzellen gegenüber Signalweginhibitoren festgestellt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Regulation der mitochondrialen Kalziumhomöostase als auch die Regulation des zellulären Redox-Milieus Ansatzpunkte für weitere Therapieformen darstellen könnten. Somit wäre es möglich, die für das Melanom sehr wichtigen Prozesse der Metastasierung und Resistenzentwicklung zu beeinflussen.

## Summary

One of the most often occurring types of cancer and the deadliest form of skin cancer is the malignant melanoma. Already initial melanoma cells show a very high tendency to metastasize to lymph nodes or distant organs which causes an enormous decrease in life expectancy of patients. Despite intensive research on melanoma no therapy was able to reduce the mortality rate so far. Moreover, after initial sensitivity towards classical chemotherapeutic drugs and pathway inhibitors, melanoma cells are capable of developing various resistance mechanisms. Previous studies showed that mitochondria play an essential role in the development of resistance mechanisms and can influence melanoma pathology. Mitochondria are able to take up large amounts of calcium, hence influencing cytosolic calcium signaling. While the outer mitochondrial membrane is permeable for ions and molecules, the inner mitochondrial membrane can only be passed with the help of transporters and channels. The main mechanism of calcium uptake into the mitochondria is the mitochondrial calcium uniporter complex. The complex consists of the pore forming MCU protein in association with its modulators MICU1, MICU2, MICU3, EMRE and MCUb, which control the channel activity in a calcium dependent manner. Besides calcium and redox signaling have been shown to be important factors in melanoma biology. For example melanoma growth and invasion can be regulated by calcium and redox signaling. However, the impact of mitochondrial calcium signaling controlled by the MCU complex on melanoma biology is currently unknown. This question was addressed in this work.

First, we were able to show with the help of qRT-PCR and Western Blot data that all the single components of the uniporter complex are expressed in varying degrees in melanoma derived cell lines and healthy primary melanocytes. Using siRNA or shRNA constructs an efficient downregulation of MCU could be achieved in the melanoma cell lines WM3734 and 1205Lu. Decreased mitochondrial basal calcium concentrations and a reduction of calcium uptake into the mitochondria could be observed as a result of the knockdown of MCU. Furthermore, measurements based on genetically encoded fluorescence indicators revealed decreased amounts of reactive hydrogen peroxide in addition to reduced mitochondrial calcium influx in MCU knockdown cells. Initially, standard MTT-assays and cell counts didn't show a significant impact of MCU on melanoma cell proliferation. However, cell growth in three dimensional spheroid cultures was diminished after knockdown of the channel. This result could be verified in *in vivo* experiments. Mice with primary tumors formed by MCU depleted melanoma cells exhibited a reduction in tumor growth. Conversely, an inverse correlation between MCU and migration and invasion could be observed. Downregulation of MCU promoted the migratory and invasive potential of melanoma cells in transwell migration assays and invasion assays of collagen. Also the data obtained in *in vivo* mouse xenograft models indicates an increase in metastasis following MCU downregulation. Furthermore, it was an objective of this work to identify possible MCU controlled regulation mechanisms of pathways that are relevant for tumor pathology by an RPPA screen. One interesting identified hit was VDAC1, an ion channel of the outer mitochondrial membrane, which showed reduced protein levels after MCU knockdown. To verify and validate this hit Western Blots were performed, which revealed a decrease in protein expression of VDAC1 after transient MCU knockdown by siRNA in 1205Lu melanoma cells. Viability assays were carried out to analyze the impact of MCU on melanoma sensitivity towards pathway inhibitors. The results showed that inhibitors of the MAPK pathway were able to suppress the growth of the melanoma lines WM3734 and 1205Lu more than inhibitors of the PI3K/Akt-pathway. Independent

of these results MCU knockdown cells possessed a higher sensitivity towards the applied pathway inhibitors compared to melanoma control cells with wildtype levels of MCU.

In summary, the results demonstrate that MCU controls the mitochondrial calcium uptake in melanoma cells, thereby controlling processes relevant for melanoma pathogenesis, like invasion, migration and proliferation of cancer cells. In addition an impact of MCU on melanoma sensitivity towards pathway inhibitors could be observed. These results indicate that both the regulation of mitochondrial calcium and redox signaling might be interesting targets for the development of melanoma therapies. With these targets it would be possible to influence metastasis and drug resistance, two very important factors of melanoma pathology.

# 1. Einleitung

## 1.1 Das maligne Melanom

### 1.1.1 Definition und Risikofaktoren

Das Melanom ist ein bösartiger Tumor der Haut, der aus entarteten Melanozyten hervorgeht. Die Inzidenz maligner Melanome ist über das letzte Jahrzehnt stetig angestiegen. Schätzungen des Zentrums für Krebsregisterdaten zufolge wird es im Jahr 2018 zu knapp 22000 Neuerkrankungen in Deutschland kommen, womit das Melanom mit 4,4 % bei Männern bzw. 4,5 % bei Frauen die fünfthäufigste Krebserkrankung ist (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2017).

Die Entstehung von Melanomen ist ein multifaktorieller Prozess, bei dem es zu einem Zusammenspiel verschiedener umweltbedingter Risikofaktoren, sowie genetischer Prädispositionen kommt. Einer der Hauptrisikofaktoren dabei ist die Anzahl an Nävi, welche auf der Haut auftreten, sowie ihre Größe und die Art des Nävus (Bauer & Garbe, 2003; Gandini et al, 2005a; Grob et al, 1990; Holly et al, 1987). Ein erhöhtes Risiko ein Melanom zu entwickeln haben zudem Menschen mit weiteren speziellen phänotypischen Charakteristika, wie heller Haut, roten oder blonden Haaren, heller Augenfarbe und erhöhter Sensitivität gegenüber Sonnenstrahlung. Auch kann in ungefähr 10 % aller Fälle ein familiär erhöhtes Auftreten von Melanomen beobachtet werden, wobei sich häufig ein autosomal-dominantes Vererbungsmuster abzeichnet und vermehrte Mutationen im zyklin-abhängigen Kinaseinhibitor 2A-Gen („*cyclin dependent kinase inhibitor 2A*“, CDKN2A) auftreten, einem Gen das für p14 und p16 kodiert (Kulichova et al, 2014; Rastrelli et al, 2014). Aus der Gruppe der umweltbedingten Risikofaktoren ist UV-Strahlung der wohl wichtigste. So ist eine intermittierende Sonnenexposition sowie häufige Sonnenbrände in Kindheit und Jugend eng mit der Entstehung von Melanomen verknüpft (Gandini et al, 2005b; Kanavy & Gerstenblith, 2011; Kulichova et al, 2014; Whiteman et al, 2001). Auch künstliche UV-Strahlung, wie sie in Solarien eingesetzt wird, kann zur Entwicklung eines Melanoms beitragen (Dore & Chignol, 2012; Veierod et al, 2010).

Zwei Drittel aller Melanome werden noch in ihrem Anfangsstadium entdeckt, was sich positiv auf die Überlebensrate des Betroffenen auswirkt (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2017). Allerdings besitzen Melanome bereits früh ein sehr hohes Potential zur Metastasierung über Lymph- und Blutbahn, was sie zum aggressivsten Typ von Hautkrebs macht. Kommt es zur Bildung von Metastasen in entfernten Organen, sinkt die Überlebensdauer der Patienten stark auf durchschnittlich nur 6-9 Monate (Balch et al, 2009). Trotz vieler Fortschritte in der Krebstherapie konnte die Mortalitätsrate noch immer nicht verringert werden, wobei ein Grund hierfür die häufige Ausbildung verschiedener Resistenzmechanismen gegenüber den eingesetzten Therapieformen in Melanomen ist (Chen et al, 2009; Johannessen et al, 2010; Montagut et al, 2008; Nazarian et al, 2010; Villanueva et al, 2010). So kommt es sehr häufig nach der anfänglichen Wirkung einer Therapie bereits nach kurzen Zeiträumen zur Entwicklung von Rezidiven.

### 1.1.2 Behandlungsmöglichkeiten des Melanoms

Die standardmäßige Behandlung eines sich in den früheren Stadien befindenden primären Melanoms besteht aus der chirurgischen Entfernung des betroffenen Hautbereiches. Hierbei werden die entarteten Zellen mit ausreichendem Abstand zum gesunden Gewebe herausgeschnitten und anschließend histologisch untersucht. Da Melanome in sehr frühen Stadien (Stadium I), in denen es noch nicht zur Metastasierung gekommen ist, sehr gut durch Entfernung des Tumors heilbar sind, ist somit keine weitere Therapieform nötig.

Die in anderen Tumorarten meist zur Therapie eingesetzte Chemotherapie spielt im Fall des malignen Melanoms nur eine untergeordnete Rolle, da sie nicht zum Langzeitüberleben beiträgt (PDQ\_Cancer\_Information\_Summaries, 2018). Sie wird hauptsächlich in fortgeschrittenen, metastasierten Melanomen genutzt, um tumorbedingte Beschwerden zu lindern, indem Metastasen zurückgebildet werden. Fortgeschrittene, bereits metastasierte Melanome (nicht chirurgisch entfernbare Melanome des Stadiums III, Melanome Stadium IV) sind bisher nur sehr selten heilbar. Doch die Entwicklung neuer Therapieansätze und Kombinationen von Medikamenten ist vielversprechend und es können bereits Erfolge in der Verlängerung der Überlebensdauer verzeichnet werden. Dabei sind die beiden Ansätze sehr gegensätzlich: einer der Ansätze basiert auf Modulationen des Immunsystems, während der andere auf Mutationen in Tumorzellen abzielt.

Melanome weisen in den meisten Fällen mindestens eine Mutation in einem charakteristischen Gen des „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK) oder des Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) Signalwegs auf: BRAF („*B-Rapidly accelerated fibrosarcoma*“) (52%), RAS („*Rat sarcoma*“) (N-, K- oder H-RAS) (28 %) und Neurofibromin 1 (NF1) (14 %). Während manche Melanome sogar mehrere dieser Hauptmutationen besitzen, liegt nur in 14 % der Melanome keine dieser Mutationen vor (Cancer Genome Atlas, 2015). Da in der größten Gruppe mit 52 % aller Melanome eine Mutation im BRAF-Gen zu finden ist, macht es dieses zu einem sehr attraktiven Angriffspunkt. Meist liegt eine V600E oder V600K Punktmutation vor, die zu einer konstitutiven Aktivierung der MAP-Kinasen führt. Zur Behandlung von Melanomen mit dieser Mutation werden BRAF-Inhibitoren wie Vemurafenib oder Dabrafenib eingesetzt, die im Vergleich mit einer Chemotherapie eine deutliche Verlängerung der progressionsfreien Überlebensdauer zeigen (Chapman et al, 2011; Hauschild et al, 2012). Um an einer anderen Stelle des Signalweges einzugreifen, wird auch der MEK-Inhibitor Trametinib eingesetzt, der zu einer ähnlichen Verbesserung der Überlebensdauer führt (Flaherty et al, 2012). Ein großes Problem dieser Behandlungen ist, dass es bei nahezu allen Patienten durch Entwicklung von Resistenzmechanismen zur Ausbildung von Rezidiven kommt. Durch Kombination von BRAF-Inhibitoren mit MEK-Inhibitoren konnte eine verlängerte Ansprechdauer erreicht werden, allerdings kann auch diese Kombinationstherapie Rezidive nicht verringern, sondern nur verzögern (Dimitriou et al, 2018; Pasquali et al, 2018; PDQ\_Cancer\_Information\_Summaries, 2018).

Im Gegensatz zu den spezifischen Proteinkinaseinhibitoren zielt die Therapie mit monoklonalen Antikörpern auf die Modulation des Immunsystems ab. Der erste zur Therapie zugelassene Antikörper war Ipilimumab, der an den inhibitorischen T-Zell-Rezeptor CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*) bindet, wodurch dessen inhibitorische Wirkung auf die T-Zell Aktivierung und Proliferation aufgehoben und die autologe Immunantwort verstärkt wird. Zwei weitere später entwickelte Antikörper, Nivolumab und Pembrolizumab, setzen an einer ähnlichen Stelle an: sie sind

Inhibitoren des PD-1-Rezeptors (*programmed cell death 1* Rezeptor) der T-Zellen. Durch Bindung und damit Blockierung dieses Rezeptors werden T-Zellen aktiviert und ihre Proliferation und Effektorfunktion angetrieben.

## 1.2 Kalziumsignale und Krebs

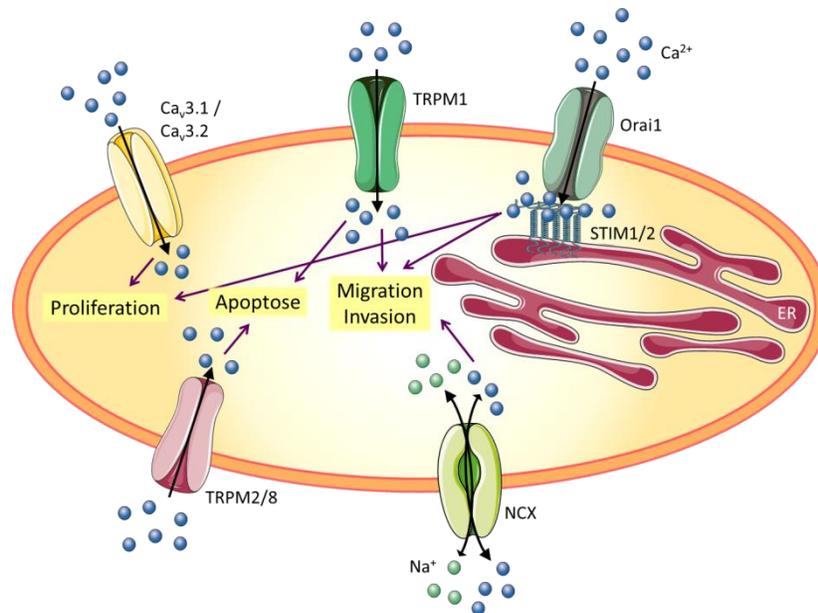
### 1.2.1 Veränderungen der Kalziumhomöostase in Tumorzellen

Kalziumionen spielen als Botenstoffe, sogenannte „*second messenger*“ eine wichtige Rolle in der Regulation von Proliferation, Zellwachstum, Migration und Apoptose, weshalb Änderungen der Kalziumhomöostase für verschiedene Krebsarten von Bedeutung ist. Verschiedene Analysen zeigten, dass in Tumorzellen häufig eine veränderte Expression von Proteinen vorliegt, die an Kalzium-Signalwegen beteiligt sind. So sind häufig Plasmamembrankanäle, wie Orai1 und STIM1 als Komponenten des Store Operated Calcium Entry (SOCE), oder auch Ca<sup>2+</sup>-spezifische TRP-Kanäle in verschiedenen Krebsarten verändert exprimiert (Deliot & Constantin, 2015; Hoth, 2016; Marchi & Pinton, 2016). Zudem kann eine Korrelation zwischen einem erhöhten zytoplasmatischen Kalziumspiegel und einer verstärkten Proliferation und Migration in Krebszellen beobachtet werden. Ebenso wurden Auswirkungen einer veränderten Kalziumhomöostase auf eine Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli festgestellt (Marchi & Pinton, 2016; Prevarskaya et al, 2011). Trotz ihrer pro-onkogenen Wirkung zählen Kalziumkanäle nicht als Onkogene oder treibende Kraft der Tumorentstehung (Tamborero et al, 2013; Vogelstein et al, 2013). Vielmehr sind Veränderungen ihrer Expression oder Aktivität und damit die gesamte Kalziumsignalgebung der Zelle durch Onkogene oder Tumorsuppressoren beeinflusst. Beispiele hierfür sind die Onkogene Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) und Mcl-1 (*myeloid cell leukemia 1*), die durch Beeinflussung der Kalziumhomöostase zu einer Apoptoresistenz führen (Huang et al, 2014; Palmer et al, 2004; Pinton et al, 2000). Auch verschiedene Tumorsuppressoren wirken sich auf die Kalziumregulation aus: FHIT (*fragile histidine triad*) moduliert die mitochondriale Kalziumaufnahme und damit die Sensitivität gegenüber apoptotischen Signalen (Rimessi et al, 2009), BRCA1 (*breast cancer 1*) kann einen IP<sub>3</sub>R-vermittelten Kalziumausstrom induzieren, welcher proapoptotisch wirkt (Hedgepeth et al, 2015), und p53 interagiert mit der SERCA-Pumpe (*sarco/endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase*) des endoplasmatischen Retikulums (ER), wodurch der Strom von Ca<sup>2+</sup> aus dem ER in die Mitochondrien und die Induktion von Apoptose moduliert wird (Giorgi et al, 2015a; Giorgi et al, 2015b).

Insgesamt betrachtet kommt es in Tumorzellen vor oder während der Ansammlung von Mutationen, die zur Onkogenese führen, zu einer mehrphasigen Reorganisation der Kalziumhomöostase durch Mutationen in Kalzium-relevanten Proteinen oder deren Beeinflussung durch Onkogene bzw. Tumorsuppressoren. Dabei kann die Veränderung der Kalziumregulation einen Einfluss auf die Kinetik von Zellwachstum und Proliferation haben und gilt als ein wichtiger Faktor für Metastasierung und Apoptoseresistenz in Krebs (Hoth, 2016; Marchi & Pinton, 2016).

## 1.2.2 Kalziumregulation im Melanom

Auch im Melanom tragen Kalziumsignale zur Regulation wichtiger Funktionen bei. Parsons *et al.* haben bereits vor über 30 Jahren beschrieben, dass die Inhibition von Kalziumkanälen eine Wirkung auf das Wachstum und die Migration von Melanomzellen hat (Parsons et al, 1983). Seitdem konnten viele weitere Kalziumkanäle identifiziert werden, die im Melanom eine wichtige Rolle für Proliferation, Migration und Invasion der Tumorzellen spielen (siehe Abbildung 1).



**Abbildung 1: Einstromwege für Kalzium in Melanomzellen und ihre physiologische Wirkung;** In Melanomzellen spielen verschiedene Kalziumkanäle eine Rolle für Proliferation, Migration, Invasion und Apoptoseinduktion. Orai-Kanäle werden durch Oligomerisierung von ER-ständigen STIM-Molekülen aktiviert und beeinflussen sowohl Proliferation als auch Migration und Invasion der Zelle. Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über TRPM-Kanäle zeigt eine Regulation der Apoptoseinduktion, während sich TRPM1 zusätzlich inhibitorisch auf Migration und Invasion auswirkt. Spannungsgesteuerte T-Typ Ca<sub>v</sub>-Kanäle wirken sich förderlich auf die Proliferation von Melanomzellen aus. Der Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher NCX, der Ca<sup>2+</sup> aus der Zelle exportiert, kann auch in einem gegenläufigen Modus arbeiten, was Auswirkungen auf Migration und Invasion in Melanomzellen hat. Abbildung erstellt nach Macia und Stanisz (Macia et al, 2015; Stanisz et al, 2016).

Der Hauptmechanismus für den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom über die Plasmamembran in die Zelle, der im Melanom bereits näher untersucht wurde, ist der speichergesteuerte Kalziumeinstrom, auch „Store Operated Calcium Entry“ oder „SOCE“. Die zugrunde liegenden molekularen Komponenten Orai1, Orai2, Orai3, sowie STIM1 und STIM2 (*stromal interaction molecule 1/2*), die für SOCE essentiell sind, konnten sowohl in Melanomlinien als auch in humanem Gewebe nachgewiesen werden (Feldman et al, 2010; Hooper et al, 2015; Stanisz et al, 2014; Sun et al, 2014). Auch SOCE konnte in verschiedenen Melanomzelllinien induziert werden, wobei hier Unterschiede in den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen bemerkbar sind. Stanisz *et al.* beobachteten keinen Unterschied zwischen Melanomzellen und primären Melanozyten (Stanisz et al, 2014), während Feldman *et al.* einen erhöhten SOCE in malignen Zellen detektierten (Feldman et al, 2010). Auch Umemura *et al.* berichteten über einen höheren Kalziumeinstrom in invasiven Melanomlinien im Vergleich zu Melanozyten oder auch Linien von Primärtumoren (Umemura et al, 2014), was mit einer erhöhten Expression von Orai1 und STIM2 in der invasiven Front von humanem Melanomgewebe korreliert (Stanisz et al, 2014).

Allerdings konnten Hooper *et al.* zeigen, dass in dem speziellen Fall von hochinvasiven Melanomzellen mit gleichzeitig hoch exprimiertem Wnt5, SOCE verringert ist (Hooper et al, 2015).

Dass SOCE wichtig für die Proliferation und Migration in Melanomzellen ist, konnte durch Knock-out-Studien verdeutlicht werden. So führte die Herunterregulation von Orai1 und den beiden STIM-Isoformen zu einem verringerten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, woraufhin eine geringere Migration und Metastasierung zu beobachten war (Stanisz et al, 2014; Sun et al, 2014; Umemura et al, 2014). Gleichzeitig kam es zu einer verstärkten Proliferation der Zellen, einhergehend mit einer erhöhten Expression von MITF (*microphthalmia-associated transcription factor*) und der Herunterregulation der Marker langsam proliferierender Melanomzellen JARID1B (*jumonji AT rich interactive domain 1B*) und Brn2 (Stanisz et al, 2014). Unabhängig von der Expression von Orai und STIM können Modulationen des Kanals oder der Kalziumaufnahme verschiedene Effekte zur Folge haben. So kann in Melanomzellen eine enge Kopplung mit Mitochondrien und deren Kalziumaufnahme zu einer verlängerten Öffnung von Orai und dadurch verstärktem SOCE führen. Durch den erhöhten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom wird der PKB/Akt-Signalweg aktiviert, wodurch es zu einer verstärkten Proliferation und einer verbesserten Viabilität kommt (Feldman et al, 2010). Weiterhin kann die Kalziumaufnahme in hoch invasiven Melanomzellen durch die Phosphorylierung von Orai moduliert werden. In invasiven Melanomlinien, in denen eine Heraufregulation von Wnt5 vorliegt, kommt es durch Wnt5 zu einer erhöhten Aktivität der Proteinkinase C (PKC). Diese phosphoryliert Orai1 und zieht somit eine Inhibition des Ca<sup>2+</sup>-Einstroms nach sich. Zusammen mit einem verringerten SOCE weisen diese Zellen einen invasiven Phänotyp auf (Hooper et al, 2015). Einen näheren Einblick in die Regulation der Invasion durch Orai1 und STIM1 gaben Sun *et al.*. Sie zeigten, dass Kalzium wichtig für die Bildung von Invadopodien ist, welche durch die Ca<sup>2+</sup>-abhängige Kinase SRC (*sarcoma kinase*) reguliert werden. Weiterhin spielt Kalzium eine essentielle Rolle für den Transport der MT1-Matrix-Metalloprotease (MT1-MMP) an die Plasmamembran, wo diese im Lauf der Invasion in Gewebe zur Degradation der extrazellulären Matrix benötigt wird (Sun et al, 2014).

Neben SOCE kann es auch noch durch andere Kanäle zur Kalziumaufnahme in die Zelle kommen. So wurde die Expression der spannungsgesteuerten Kalziumkanäle Ca<sub>v</sub>1, Ca<sub>v</sub>2 und Ca<sub>v</sub>3 in Melanozyten und Melanomzellen nachgewiesen. Eine besondere Bedeutung kommt dabei den Ca<sub>v</sub>3 T-Typ Kanälen zu, da diese vermehrt im Melanom, aber nicht in Melanozyten exprimiert werden (Das et al, 2012). Dabei unterscheidet sich die Expression der Isoformen Ca<sub>v</sub>3.1 und Ca<sub>v</sub>3.2: in Melanomen mit hoher Proliferationsrate wird vermehrt Ca<sub>v</sub>3.2 exprimiert, während langsam proliferierende Melanome eine höhere Ca<sub>v</sub>3.1 Expression aufweisen. Wie auch die Expression des Markers für langsam proliferierende Melanomzellen JARID1B, wird die Expression von Ca<sub>v</sub>3.1 durch Hypoxie induziert. Dementsprechend sind sowohl die hohe Expression von JARID1B als auch von Ca<sub>v</sub>3.1 mit einem langsam proliferierenden Phänotyp assoziiert (Das et al, 2012). Beide Ca<sub>v</sub>3-Isoformen scheinen für einen konstitutiven Ca<sup>2+</sup>-Einstrom verantwortlich zu sein und dadurch die Tumorprogression zu fördern, da die Inhibition der Ca<sub>v</sub>3-Kanäle durch T-Typ Blocker oder die Herunterregulation der beiden Isoformen einen Zellzyklusarrest induzieren. Dies führt zu einer verringerten Proliferation der Melanomzellen sowie durch Aktivierung mitochondrialer Caspasen zur Apoptose (Das et al, 2013).

Die dritte Art der in Melanomen vorkommenden Kalziumkanäle sind die sogenannten „*Transient Receptor Potential Melastatin*“ (TRPM) Kanäle. Vor allem TRPM1 Kanäle spielen schon in der Regu-

lation der Physiologie von Melanozyten eine Rolle und ihr Verlust geht mit der malignen Veränderung zum Melanom einher (Guo et al, 2012). So kann eine hohe Expression von TRPM1 in gutartigen Nävi noch nachgewiesen werden, während die Expression in primären Melanomen bereits reduziert ist und in Metastasen kein Vollängentranskript, sondern nur verschiedene kurze Transkripte detektiert werden können (Duncan et al, 1998; Fang & Setaluri, 2000). Dieser Expressionsverlust korreliert mit der Tumorprogression, dem metastatischen Potential, der Tumordicke und der Aggressivität des Tumors, weshalb TRPM1 mRNA Level als Parameter zur Prognose der metastatischen Entwicklung genutzt werden können (Deeds et al, 2000; Duncan et al, 2001). Die Expression von TRPM1 wird direkt durch Bindung des Transkriptionsfaktors MITF, der eine wichtige Rolle in verschiedenen physiologischen Aspekten des Melanoms einnimmt (Wellbrock & Arozarena, 2015), an seine Promotorregion reguliert. Demnach scheint der Einfluss von TRPM1 auf die Tumorprogression komplexer zu sein und bedarf weiterer Untersuchungen (Miller et al, 2004; Zhiqi et al, 2004). Weiterhin sind im Melanom auch TRPM2 und TRPM8 Kanäle zu finden, die normalerweise eine Funktion in der Temperaturempfindung haben. TRPM2 wird durch Hitze oder auch Wasserstoffperoxid aktiviert und kann den Zelltod induzieren (Naziroglu, 2011; Wehage et al, 2002). Im Melanom sind sowohl ein Antisense-Transkript als auch eine dominant-negative Form von TRPM2 exprimiert, was zu einem Schutz der Zelle vor Apoptose und Nekrose führt (Orfanelli et al, 2008). Im Gegensatz zu TRPM2 wird TRPM8 durch Kälte oder Menthol aktiviert, was zu einem Kalziumeinstrom in die Zelle führt. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von TRPM8 dosisabhängig die Viabilität von Melanomzellen verringert, ein Effekt, der einen interessanten Angriffspunkt für weiterführende Melanomtherapien darstellt (Yamamura et al, 2008).

Ein weiterer Mechanismus zur Aufnahme von Kalzium in Melanomzellen konnte von Sennoune *et al.* beschrieben werden. Der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) transportiert  $\text{Ca}^{2+}$  entgegen des Konzentrationsgradienten aus der Zelle im Austausch gegen  $\text{Na}^+$ , das mit seinem Gradienten in die Zelle gelangt. Unter bestimmten Bedingungen kann dieser Prozess jedoch auch rückwärts ablaufen, was den Transport von Kalzium in die Zelle zur Folge hat (Yu & Choi, 1997). In Melanomzellen scheint dieser Wechsel zwischen den beiden Transportmodi zu Unterschieden in der Metastasierung zu führen. So wurde in stark metastasierenden Tumorzellen eine Aktivität des NCX im Rückwärtsmodus mit einem Import von Kalziumionen beschrieben, während in gering metastasierenden Zellen ein Kalziumexport vorlag. In stark metastasierenden Melanomzellen fördert der NCX so einen erhöhten Kalziumeinstrom (Sennoune et al, 2015).

## **1.3 Die Bedeutung der Mitochondrien**

### **1.3.1 Aufbau und Funktion von Mitochondrien**

Mitochondrien werden oft als „Kraftwerke der Zelle“ beschrieben, da eine ihrer Hauptaufgaben die Herstellung von Adenosintriphosphat (ATP) durch die oxidative Phosphorylierung ist. Allerdings haben Mitochondrien darüber hinaus noch eine Vielzahl anderer Funktionen. So sind sie auch an der Regulation der Kalziumhomöostase und Kalziumsignale der Zelle beteiligt, übernehmen eine wichtige Rolle in der Apoptoseinduktion und produzieren reaktive Sauerstoffspezies, Redoxmoleküle und andere wichtige Metabolite. Dabei ist die mitochondriale Funktion stark an die zelluläre

Nachfrage gekoppelt und kann durch Veränderungen des Metabolismus, Differenzierung und Zellteilung reguliert werden. Ebenso spielt der Gewebetyp eine entscheidende Rolle für die mitochondriale Funktion. So können der Anteil an Mitochondrien in der Zelle, ihre Morphologie und ihre Aufgaben in verschiedenen Geweben sehr unterschiedlich sein. Während die Mitochondrien von Skelettmuskeln vor allem Fettsäuren oxidieren, kann dies in Mitochondrien von Hirnzellen auch mit Ketonen geschehen, während Mitochondrien der Nebennieren mit der Biosynthese von Steroidhormonen beauftragt sind (Vafai & Mootha, 2012).

Mitochondrien besitzen sowohl eine äußere als auch eine innere Membran. Die äußere Membran dient als Verbindung zwischen Mitochondrien und dem Zytosol und anderen Organellen, wie dem endoplasmatischen Retikulum. In ihr enthaltene Porenen sorgen dafür, dass die äußere Membran für viele Ionen durchlässig ist. Im Gegensatz dazu ist der Transport von Ionen durch die innere Membran stark reguliert. Die proteinreiche innere Membran trennt den Intermembranraum von der mitochondrialen Matrix ab und ist für den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten verantwortlich. In ihr sind die Proteine der oxidativen Phosphorylierung lokalisiert, durch die Elektronen auf Sauerstoff übertragen und Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum transferiert werden. Der hieraus resultierende elektrochemische Gradient dient als Triebkraft für die Protonenpumpe ATP-Synthase und spielt zudem eine wichtige Rolle für den Einstrom von Kalzium in die mitochondriale Matrix. Die innere mitochondriale Membran kann in zwei unterschiedliche Bereiche eingeteilt werden: Regionen, die an die äußere Membran angrenzen und über direkte Kontakte mit dieser verbunden sind (Frey & Mannella, 2000; Reichert & Neupert, 2002) und Cristae Strukturen, die durch den MICOS-Komplex (mitochondrial contact site complex) organisiert sind (Harner et al, 2011; Hoppins et al, 2011). Während in den Cristae der größte Teil der Proteine der Atmungskette und der ATP-Synthase-Komplex lokalisiert sind, befinden sich in Bereichen der Grenzmembran hauptsächlich Transporter und Kanäle für verschiedenste Moleküle (van der Laan et al, 2012).

Durch andauernde Fusion und Spaltung einzelner Mitochondrien mit- bzw. voneinander befindet sich das mitochondriale Netzwerk ständig in einem dynamischen Zustand. Diese konstanten Veränderungen werden durch spezifische GTPasen kontrolliert. Für die Fusion einzelner Organellen sind die GTPasen Mitofusin1 (MFN1), Mitofusin2 (MFN2) und OPA1 (*Optic Atrophy 1*) verantwortlich (Chen et al, 2003; Meeusen et al, 2004). MFN1 und MFN2 sind in der äußeren mitochondrialen Membran verankert (Chen & Chan, 2005), während OPA1 im Intermembranraum vorliegt und dort mit der inneren Membran assoziiert ist. Auch die mitochondriale Spaltung beruht auf der Funktion einer GTPase, DRP1 (*dynamin-related protein 1*), und seiner Interaktion mit seinem Rezeptor FIS1 (*mitochondrial fission 1*) (Labrousse et al, 1999; Lackner & Nunnari, 2009). Weiterhin wird das mitochondriale Netzwerk durch direkte Interaktion mit dem ER reguliert und ist somit eng an dort ablaufende Prozesse gekoppelt. So kann durch das ER der Ort der mitochondrialen Teilung festgelegt werden, indem sich Tubuli um Mitochondrien legen und dadurch diese Region markieren, was als ER-assoziierte mitochondriale Teilung beschrieben wird (Friedman et al, 2011). Sowohl die Verschmelzung als auch die Teilung mitochondrialer Organellen erfüllen unterschiedliche Zwecke. So dient die Fusion der Mitochondrien miteinander der Kommunikation zwischen den einzelnen Organellen und verhindert die Anhäufung von Defekten durch Mutationen in der mitochondrialen DNA (mtDNA) durch eine regelmäßige Durchmischung (Chen et al, 2007). Eine Extremform der Fusion

von Mitochondrien, die Hyperfusion, kann zudem dem Überleben der Zelle dienen. So können mögliche schädliche Effekte, die durch Zellstress, wie z.B. Nährstoffentzug oder UV-Strahlung, hervorgerufen werden, vorübergehend abgefangen werden (Rambold et al, 2011). Weiterhin kann Hyperfusion dazu führen, dass die Zelle ihre ATP-Produktion aufrechterhalten kann, wenn die Atmungskette gestört ist (Rolland et al, 2013). Die Teilung der Mitochondrien in kleinere Teilstücke unterstützt dagegen die mitochondriale Verteilung in der Zelle. Kleine Mitochondrien können leichter anhand von Motorproteinen entlang des Zytoskeletts transportiert werden, was zu einer Beeinflussung der subzellulären Lokalisation und einer vereinfachten Verteilung der Mitochondrien führt.

Obwohl Mitochondrien ein eigenes Genom besitzen, ist der größte Teil der mitochondrialen Proteine nukleär kodiert und wird an zytosolischen Ribosomen translatiert. Die mitochondriale Biogenese wird im Menschen auch auf transkriptioneller Ebene reguliert. So reagieren Proteine der „*peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1*“ (PGC1) Familie als Co-Aktivatoren auf Veränderungen des Nährstoffhaushaltes, NAD<sup>+</sup>/NADH- und AMP/ATP-Verhältnisse und auf andere Umweltsignale (Jager et al, 2007; Puigserver et al, 1998; Wu et al, 1999). Auch besitzen Mitochondrien verschiedene Stress- und Qualitätskontroll-Signalwege, um auf mitochondriale und zelluläre Fehlfunktionen reagieren zu können. Beispielsweise löst ein Ungleichgewicht zwischen nukleären und mitochondrialen Proteinen in den Mitochondrien oder eine Anhäufung ungefalteter mitochondrialer Proteine die sogenannte UPRmt (*mitochondrial unfolded protein response*) aus (Martinus et al, 1996; Zhao et al, 2002).

### **1.3.2 Mitochondrien und ihre vielfältige Rolle im Melanom**

Viele verschiedene Krebsarten teilen eine Gemeinsamkeit: Tumorzellen müssen ihre metabolischen und bioenergetischen Signalwege anpassen, um ihren durch verstärktes Wachstum veränderten anabolischen und energetischen Bedarf zu decken. Eine oft beobachtete Anpassung, bekannt als der Warburg-Effekt, ist eine Erhöhung der Aufnahme von Glucose zusammen mit einer gesteigerten Glykolyse (Warburg, 1956). Dieser Effekt ist auch in Melanomzellen zu beobachten, obwohl diese neben der Glykolyse gleichzeitig einen aktiven Citratzyklus als Teil der aeroben Zellatmung erhalten (Scott et al, 2011). Mitochondrien, die die metabolischen Charakteristika von Zellen regulieren, spielen dementsprechend eine wichtige Rolle für Melanome. Melanomzellen haben die Fähigkeit leicht zwischen aerober und anaerober Atmung zu wechseln, was ihnen eine bessere Anpassungsfähigkeit an limitierende Umweltbedingungen, wie niedrige extrazelluläre Glucosespiegel oder Hypoxie, ermöglicht (Filipp et al, 2012).

Meist sind in Melanomen Variationen der mitochondrialen Funktion zu beobachten, die Subpopulationen definieren können. Ein wichtiger Faktor, der in ungefähr 30 % aller Melanome amplifiziert vorliegt, ist der Transkriptionsfaktor MITF (Garraway et al, 2005). MITF kontrolliert direkt die Expression von PGC1 $\alpha$ , einem Hauptregulator der mitochondrialen Biogenese und des oxidativen Metabolismus (Puigserver & Spiegelman, 2003; Scarpulla, 2011) und führt in einer Subpopulation an Melanomzellen zu dessen Überexpression (Vazquez et al, 2013). PGC1 $\alpha$  wird unter physiologischen Bedingungen niedrig exprimiert und seine Expression nur induziert, um einen zeitweilig erhöhten Energiebedarf zu decken, wie z.B. bei Kälte, Sport oder Fasten (Handschin et al, 2007; Puigserver et

al, 1998; Rhee et al, 2003). Auch Kalzium kann einen Einfluss auf die Expression von PGC1 $\alpha$  haben, da diese durch den Kalzium-Calcineurin-Calmodulin-Kinase Signalweg reguliert wird (Lin et al, 2002). Wird nun PGC1 $\alpha$  in Tumorzellen verstärkt exprimiert, führt dies zu einem höheren Mitochondriengehalt in der Zelle und einer erhöhten aeroben Zellatmung, resultierend aus der höheren Expression der Gene des oxidativen Metabolismus (Haq et al, 2013a; Salem et al, 2012; Vazquez et al, 2013). Zudem besitzen PGC1 $\alpha$  hoch exprimierende Melanomzellen eine hohe Kapazität zum Abbau von reaktiven Sauerstoffspezies, auch „*reactive oxygen species*“ (ROS). Demzufolge zeigt diese Subpopulation eine höhere Toleranz gegenüber hohen Konzentrationen an ROS und dementsprechend eine Resistenz gegenüber ROS-induzierte Apoptose (Vazquez et al, 2013). Im Gegensatz dazu ist in BRAF-mutierten Melanomen die Expression von PGC1 $\alpha$  inhibiert: der konstitutiv aktive MAPK-Signalweg verhindert die Bindung von MITF an den PGC1 $\alpha$  Promotor und unterdrückt so dessen Expression. In diesen Zellen sind zudem viele Enzyme, die mit der oxidativen Phosphorylierung assoziiert sind, herunterreguliert, was eine Verschiebung des metabolischen Phänotyps zur Glykolyse nach sich zieht (Haq et al, 2013a; Vazquez et al, 2013). Bei Behandlung dieser BRAF-mutierten, PGC1 $\alpha$  negativen Melanomzellen mit BRAF-Inhibitoren kann es allerdings in einer Subpopulation von Zellen dazu kommen, dass PGC1 $\alpha$  verstärkt exprimiert wird. Zusätzlich steigt die aerobe Atmung an und die Zellen verlieren ihre Sensitivität gegenüber ROS-induzierenden Substanzen und BRAF-Inhibitoren (Haq et al, 2013a; Vazquez et al, 2013). Die Tatsache, dass sich diese Sensitivität gegenüber BRAF-Inhibitoren durch eine Inhibition der oxidativen Phosphorylierung wiederherstellen lässt, zeigt deutlich, dass Mitochondrien eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung von Resistenzen im Melanom haben (Corazao-Rozas et al, 2013; Haq et al, 2013a; Roesch et al, 2013; Vazquez et al, 2013).

Auch die Produktion von ROS durch die Mitochondrien hat Auswirkungen auf Melanomzellen. So kann ROS das Wachstum fördern und eine inhibierende Wirkung auf die Apoptoseinduktion haben (Meierjohann, 2014). Allerdings können sehr hohe Mengen an ROS aber auch pro-apoptotische Faktoren aktivieren und somit Apoptose stimulieren (Quast et al, 2013). Diese Mechanismen machen sich Tumorzellen zunutze. Beispielsweise ist in vielen Melanomen die Expression der NADPH-Oxidase 4 (NOX4) heraufreguliert, was zu einer erhöhten ROS-Produktion führt. Durch die Behandlung mit Antioxidantien oder durch einen Knockdown von NOX4 kann die Menge an ROS wieder gesenkt werden, wodurch es zum Zellzyklusarrest und einer Inhibition der Proliferation kommt (Yamaura et al, 2009). Ein weiteres Beispiel ist die Expression des „*hypoxia-inducible factor 1*“ (HIF-1 $\alpha$ ), der durch ROS stabilisiert wird (Giatromanolaki et al, 2003; Li et al, 2014). Seine Expression korreliert mit einer schlechten Prognose, da das Protoonkogen Met durch HIF-1 $\alpha$  aktiviert wird (Comito et al, 2011; Giatromanolaki et al, 2003). Zudem reguliert HIF-1 $\alpha$  die Aktivität der Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 3, wodurch es in metastatischen Melanomen zu einer Inaktivierung der Pyruvat-Dehydrogenase und somit einer verlangsamten mitochondrialen Atmung und oxidativen Phosphorylierung kommt (Kluza et al, 2012).

Neben ihren metabolischen Aufgaben sind Mitochondrien auch an der Regulation der Apoptose durch die Freisetzung von Cytochrom C und anderer pro-apoptotischer Faktoren beteiligt. Dabei wird die Freisetzung durch eine Permeabilisierung der äußeren mitochondrialen Membran durch Proteine der Bcl-2-Familie vermittelt. In Melanomen hat dabei vor allem das gleichnamige Protein Bcl-2 eine besondere Rolle. Bcl-2 blockiert die Effekte pro-apoptotischer Faktoren, wie Bax (*bcl-2*-

*like*) oder Bak (*bcl-2 antagonist/killer*), und besitzt somit selber eine anti-apoptotische Wirkung. In Melanomen konnte eine Amplifikation im kodierenden BCL2A1 Gen in 30-40 % aller Fälle entdeckt werden, die den Zellen eine verringerte Sensitivität gegenüber BRAF-Inhibitoren verleiht. Dabei kann ein Ansprechen auf BRAF-Inhibitoren durch Inhibition von BCL2A1 wieder vermittelt werden (Haq et al, 2013b).

## 1.4 Kalzium in Mitochondrien

### 1.4.1 Mitochondriales Kalzium als Regulator zellulärer Prozesse

Mitochondriales Kalzium ist für die gesamte Zelle von großer Bedeutung. So spielen die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Mitochondrien, die durch das große negative Potential der inneren mitochondrialen Membran angetrieben wird (Bernardi, 1999), sowie der Export aus der Matrix eine wichtige Rolle für die Kalziumhomöostase der gesamten Zelle. Um räumliche und zeitliche Kalziumsignale weitergeben zu können, müssen die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen streng reguliert sein, wobei die hohe Kapazität der Mitochondrien Kalziumionen aufzunehmen eine wichtige Funktion einnimmt. Beispielsweise trägt die mitochondriale Kalziumaufnahme zur Regulation des speichergesteuerten Kalziumeinstroms unter anderem durch Abpuffern des zytosolischen Kalziumeinstroms und durch Steuerung der STIM1 Oligomerisierung bei (Deak et al, 2014; Gilibert & Parekh, 2000; Glitsch et al, 2002; Hoth et al, 1997). Zudem können die Mitochondrien durch die schnelle Aufnahme von Kalzium extreme Anstiege zytosolischen Kalziums abfangen (Herrington et al, 1996; Mohr & Fewtrell, 1990; Park et al, 1996; Werth & Thayer, 1994) oder gespeichertes Kalzium langsam wieder in das Zytosol abgeben um damit ein Kalziumsignal zu verlängern (Babcock et al, 1997; Friel & Tsien, 1994).

Auch für die Regulation des Energiemetabolismus spielt mitochondriales Kalzium eine wichtige Rolle, indem es die oxidative Phosphorylierung aktivieren und somit die Produktion von ATP erhöhen kann (Griffiths & Rutter, 2009). Dies geschieht durch Aktivierung verschiedener Dehydrogenasen - der Pyruvat-Dehydrogenase, der NAD-Isocitrat-Dehydrogenase und der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase (Denton, 2009; Denton & McCormack, 1980) - oder der Komplex V ATPase (Territo et al, 2000). Zudem konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Dehydrogenasen durch Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Mitochondrien zu einem Anstieg an NADH oder NADHP führt (Glancy & Balaban, 2012; Hajnoczky et al, 1995; Rizzuto et al, 1994).

Mit der Aktivierung der ATP-Produktion ist auch die durch mitochondriales Kalzium regulierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies, wie Hyperoxid ( $\text{O}_2\bullet^-$ ), Hydroxylradikale ( $\text{HO}\bullet$ ) oder Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) eng verknüpft. Wie bereits beschrieben, kann der Kalziumeinstrom in die Mitochondrien die oxidative Phosphorylierung aktivieren. Hierbei entsteht an Komplex I und Komplex III der Atmungskette Hyperoxid (Kudin et al, 2004; Kudin et al, 2005). Aufgrund der Instabilität von Hyperoxid, reagiert dieses sehr schnell mit anderen Molekülen weiter, was zur Entstehung von Wasserstoffperoxid führt, das Membran-permeabel ist. Wasserstoffperoxid kann wiederum mit Metallionen reagieren und so reaktive Hydroxylradikale bilden (Feissner et al, 2009). Ein anderer wichtiger Weg der Kalzium-induzierten ROS-Produktion ist der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase-

Komplex, der Teil des durch  $\text{Ca}^{2+}$  aktivierbaren Citratzyklus ist (Starkov et al, 2004; Tretter & Adam-Vizi, 2004; Wan et al, 1989). Allerdings kann Kalzium auch zur Aktivierung der zellulären Abbaumechanismen von ROS führen. Glutathion (GSH) dient als direkter Reaktionspartner zum Abbau von ROS oder kann als Cofaktor der Glutathionperoxidase fungieren, die Glutathion oxidiert um Wasserstoffperoxid zu reduzieren. Bei diesen Reaktionen wird GSH oxidiert und bildet Dimere (GSSG). Um dieses System aufrecht zu erhalten, muss GSSG wieder zu GSH reduziert werden, was kalziumabhängig durch die GSH-Reduktase geschieht (Feissner et al, 2009).

Mitochondriales Kalzium kann als Regulator für den Zelltod dienen, indem es die Öffnung der „Permeability-Transition-Pore“ (PTP) steuert. Sammeln sich sehr hohe Konzentrationen an  $\text{Ca}^{2+}$  in der mitochondrialen Matrix an, interagiert dieses mit Cyclophilin D, wodurch die Öffnung der PTP induziert wird (Basso et al, 2005). Auch weitere Faktoren wie ROS oder freie Fettsäuren, deren Produktion durch den Kalziumanstieg angeregt wird, tragen zur PTP Öffnung bei (Feissner et al, 2009; Scorrano et al, 2001). Durch die Öffnung der PTP wird das mitochondriale Membranpotential zerstört und Kalzium in das Zytosol entlassen. Bleibt die Pore über längere Zeit geöffnet, kommt es zur Akkumulation verschiedener Stoffe in der mitochondrialen Matrix, was ihre Ausdehnung, die Zerstörung der äußeren Membran und die Freisetzung der Moleküle des Intermembranraums zur Folge hat. Dabei werden auch Caspase-aktivierende Moleküle freigesetzt, was unweigerlich zum Zelltod führt (Green & Kroemer, 2004).

#### **1.4.2 Die mitochondriale Kalziumhomöostase**

Es ist bereits seit mehreren Jahrzehnten bekannt, dass Mitochondrien in der Lage sind, Kalzium aufzunehmen und in ihrer Matrix anzureichern (Deluca & Engstrom, 1961; Greenawalt et al, 1964; Slater & Cleland, 1953). Allerdings war über lange Zeit der Mechanismus nicht bekannt und erst vor wenigen Jahren konnte der mitochondriale Kalzium Uniporter („*mitochondrial calcium uniporter*“, MCU) als die Hauptkomponente für die Aufnahme von Kalzium in die Matrix der Mitochondrien identifiziert werden (Baughman et al, 2011; De Stefani et al, 2011). Die Aufnahme über den Uniporter ist sensitiv auf Rutheniumrot (Moore, 1971; Reed & Bygrave, 1974) und kann durch dieses bzw. noch spezifischer durch die Form Ru360 inhibiert werden (Matlib et al, 1998).

Zusätzlich zu diesem Hauptweg der Kalziumaufnahme wurden bereits vorher weitere Mechanismen beschrieben. Auch die Tatsache, dass ein Knockout von MCU in Mäusen nur einen milden Phänotyp hervorruft, lässt darauf schließen, dass noch andere Aufnahmemechanismen für Kalzium existieren (Harrington & Murphy, 2015; Holmstrom et al, 2015; Pan et al, 2013). In erregbaren Zellen, wie Herzmuskelzellen und Neuronen, wurde ein weiterer Weg für die mitochondriale Kalziumaufnahme über Ryanodinrezeptoren identifiziert, der allerdings noch umstritten ist. Diese Zellen besitzen scheinbar Typ 1 Ryanodinrezeptoren (RyR1) nicht nur in der ER-Membran, wo sie dem Export von Kalzium aus dem ER dienen, sondern auch in der inneren mitochondrialen Membran (mRyR1) und können über diese  $\text{Ca}^{2+}$  in die mitochondriale Matrix aufnehmen (Beutner et al, 2001; Jakob et al, 2014). Der mRyR1 hat eine wesentlich höhere Diffusionskonstante für  $\text{Ca}^{2+}$  sowie eine größere Leitfähigkeit als MCU, wird allerdings von Kalziumkonzentrationen über  $50 \mu\text{M}$  oder die Bindung von Ryanodin inhibiert. Verschiedene Faktoren, wie die Bindung von Ryanodin an den offenen Kanal

oder die Kalziumabhängigkeit der Bindung, lassen darauf schließen, dass mitochondriale Ryanodinrezeptoren in Herzmuskelzellen auf den physiologischen Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  in Mikrodomänen, wie zwischen Sarkoplasmatischem Retikulum (SR) bzw. Endoplasmatischem Retikulum, und Mitochondrien spezialisiert sind (Gunter & Sheu, 2009; Ryu et al, 2010). Ein weiterer Weg der Kalziumaufnahme in die Mitochondrien ist der „*rapid mode of  $\text{Ca}^{2+}$  uptake*“ (RaM). Dieser wurde bisher nur in isolierten Mitochondrien aus Leber und Herz beobachtet und zeichnet sich durch seine extrem schnelle Kinetik aus (Buntinas et al, 2001; Sparagna et al, 1995). Auch ist der RaM nur bei sehr niedrigen extramitochondrialen Kalziumkonzentrationen zu beobachten und dient möglicherweise der Kalziumaufnahme zu Beginn eines Kalzimpulses, da Konzentrationen über 100 nM diesen Modus der Kalziumaufnahme inhibieren (Sparagna et al, 1995). Bisher ist nicht bekannt, welches Protein für diese Art der Aufnahme verantwortlich ist. Allerdings könnte MCU darin involviert sein, da der RaM in Mitochondrien ohne MCU nicht mehr vorhanden zu sein scheint und auch durch Rutheniumrot inhibiert werden kann (Baughman et al, 2011; De Stefani et al, 2011).

Die Kalziumkonzentration in den Mitochondrien wird nicht nur durch die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert, die durch das steile mitochondriale Membranpotential angetrieben wird, sondern auch durch den kontrollierten Export von Kalzium ins Zytosol. Der Hauptmechanismus für den Kalziumexport aus den Mitochondrien ist der mitochondriale  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher NCLX (De Marchi et al, 2014; Palty et al, 2010). Die Besonderheit dieses Austauschers ist, dass er im Gegensatz zu den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern der Plasmamembran in der Lage ist,  $\text{Ca}^{2+}$  nicht nur im Austausch gegen  $\text{Na}^+$ , sondern auch gegen  $\text{Li}^+$  über die innere mitochondriale Membran aus der Matrix zu transportieren (Carafoli et al, 1974). Dabei nutzt der NCLX das negative Membranpotential, da er im Austausch gegen ein Kalziumion drei bis vier Natriumionen und damit eine höhere positive Ladung in die Matrix transportiert (De Stefani et al, 2016). Ein weiterer Exportweg für Kalzium aus den Mitochondrien ist ein  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Austauscher, dessen molekulare Identität allerdings noch diskutiert wird. Als möglicher Kandidat für diesen  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Austauscher identifizierte die Gruppe um Clapham LETM1 („*leucine zipper-EF-hand-containing transmembrane protein 1*“), was auch von Shao *et al.* bestätigt wurde (Jiang et al, 2009; Shao et al, 2016; Tsai et al, 2014). Andere Gruppen widersprechen dieser Hypothese allerdings (De Marchi et al, 2014) bzw. beobachten für LETM1 eine Funktion als Austauscher von  $\text{K}^+/\text{H}^+$  und nicht von  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  (Nowikovsky et al, 2004).

### 1.4.3 Der mitochondriale Kalzium Uniporter und seine Regulatoren

Der mitochondriale Kalzium Uniporter ist der wichtigste Mechanismus zur Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in die mitochondriale Matrix. Obwohl bereits lange bekannt war, dass ein Uniporter Mechanismus zur Aufnahme von Kalziumionen existieren muss, konnte die molekulare Identität dieses Uniporters erst vor wenigen Jahren geklärt werden. 2011 beschrieben die beiden Gruppen um Mootha und Rizzuto unabhängig voneinander CCDC109A (*coiled-coil domain-containing protein 109A*), das zu MCU umbenannt wurde, als ein 40 kDa großes Protein, das in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert ist und die Pore des Uniporter Komplexes bildet (Baughman et al, 2011; De Stefani et al, 2011). MCU ist selektiv für  $\text{Ca}^{2+}$  und besitzt die elektrophysiologischen Eigenschaften eines Ionenkanals (Baughman et al, 2011; Chaudhuri et al, 2013). Die Proteinstruktur von MCU weist zwei Transmembranhelices auf, zwischen denen sich ein stark konservierter hydrophiler Loop befindet.

Dieser Loop enthält einen hohen Anteil an sauren Aminosäuren und ein DIME-Motiv, das für die Selektivität von MCU für  $\text{Ca}^{2+}$  verantwortlich ist (Baughman et al, 2011; De Stefani et al, 2011). Während N- und C-Terminus des Proteins in der mitochondrialen Matrix lokalisiert sind, befindet sich der Loop zwischen den Transmembranhelices im Intermembranraum (Martell et al, 2012). Um einen funktionalen Kanal zu bilden, oligomerisiert MCU in der inneren mitochondrialen Membran vermutlich zu einem Homopentamer, wobei durch die zweite Transmembranhelix der einzelnen MCU-Moleküle eine hydrophile Pore durch die Membran entsteht (Oxenoid et al, 2016; Raffaello et al, 2013).

Über längere Zeit gab die sehr niedrige Kalziumaffinität von MCU Rätsel auf (Kirichok et al, 2004). Bei dieser niedrigen Affinität müssten Konzentrationen von mindestens 5-10  $\mu\text{M}$  an zytosolischem Kalzium erreicht werden, damit es zu einer Aktivierung des Kanals kommt, allerdings reichen Kalziumpeaks im Zytosol durchschnittlich maximal bis zu einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  (Marchi & Pinton, 2014). Eine Erklärung, wie es trotzdem zu einer Aktivierung des Kanals kommen kann, sind zytosolische Mikrodomänen mit hohen Kalziumkonzentrationen von mehr als 10  $\mu\text{M}$ , die sich zwischen Mitochondrien und Kalziumkanälen des ER bilden können (Csordas et al, 2010; Giacomello et al, 2010; Rizzuto et al, 1998; Rizzuto & Pozzan, 2006; Szalai et al, 2000). Durch diese Bereiche mit hohen Konzentrationen an Kalzium, sogenannten MAMs (*mitochondrial associated membranes*) kann MCU aktiviert werden, wodurch  $\text{Ca}^{2+}$  vom Zytosol in die Matrix aufgenommen und die Mikrodomäne abgebaut wird. Die Funktion von MCU als Einstromkanal für Kalzium konnte bereits durch diverse Knockdown-Experimente in verschiedenen Zelltypen, wie z.B. Herzmuskelzellen, pankreatischen  $\beta$ -Zellen oder Neuronen (Baughman et al, 2011; De Stefani et al, 2011; Drago et al, 2012; Qiu et al, 2013; Tarasov et al, 2012), sowie in Knockout Mäusen (Pan et al, 2013) validiert werden. Hierbei ließ sich eine deutliche Reduktion des Kalziumeinstroms in die Mitochondrien beobachten.

In artifizialen Lipidmembranen ist MCU zwar alleine in der Lage einen Kanal zu bilden, durch den  $\text{Ca}^{2+}$  strömen kann (De Stefani et al, 2011), liegt *in vivo* allerdings funktional immer in einem größeren Komplex mehrerer Proteine, dem mitochondrialen Kalzium Uniporter Komplex, vor (siehe Abbildung 2). In diesem Komplex stellt MCU die porenbildende Einheit dar, während alle anderen assoziierten Proteine der Regulation dieses Komplexes dienen. MCU besitzt ein hoch konserviertes Homolog, MCUB, mit dem es 50 % Sequenzhomologie sowie eine ähnliche Struktur teilt und nur leichte Unterschiede in der Loop-Region aufweist (Raffaello et al, 2013). Allerdings ist MCUB in Lipidmembranen nicht in der Lage einen  $\text{Ca}^{2+}$ -leitenden Kanal zu bilden, sondern zeichnet sich durch einen inhibitorischen Effekt auf MCU aus. MCUB besitzt ein sehr gewebeabhängiges, differenziertes Expressionsmuster, das sich von dem MCU-Expressionsmuster unterscheidet. Man geht daher davon aus, dass MCUB als dominant-negativer Regulator eine unterschiedlich starke modulatorische Funktion in verschiedenen Geweben einnimmt (Raffaello et al, 2013).

Weitere wichtige Regulatoren für den mitochondrialen Kalziumimport sind die Proteine der MICU (*mitochondrial calcium uptake*)-Familie, MICU1 und MICU2. Es existiert auch ein weiteres Paralog, MICU3, das bisher jedoch hauptsächlich im ZNS nachgewiesen werden konnte und dementsprechend wahrscheinlich eine gewebespezifische Rolle einnimmt (Plovanich et al, 2013b). Die Regulatoren MICU1 und MICU2 besitzen zwei EF-Hände zur Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  (Perocchi et al, 2010) und sind im Intermembranraum lokalisiert (Lam et al, 2015). Beide Varianten werden in den meisten Geweben exprimiert, wobei allerdings ihr Verhältnis zueinander variieren kann und somit eine ge-

webespezifische Regulation des mitochondrialen Kalziumstroms ermöglicht wird (Paillard et al, 2017). Mehrere Gruppen konnten zeigen, dass MICU1 zusammen mit MICU2 stabile Heterodimere bildet, wobei MICU1 maßgeblich zur Stabilität von MICU2 beiträgt (Kamer et al, 2017; Kamer & Mootha, 2014; Patron et al, 2014; Petrunaro et al, 2015; Plovanich et al, 2013b).

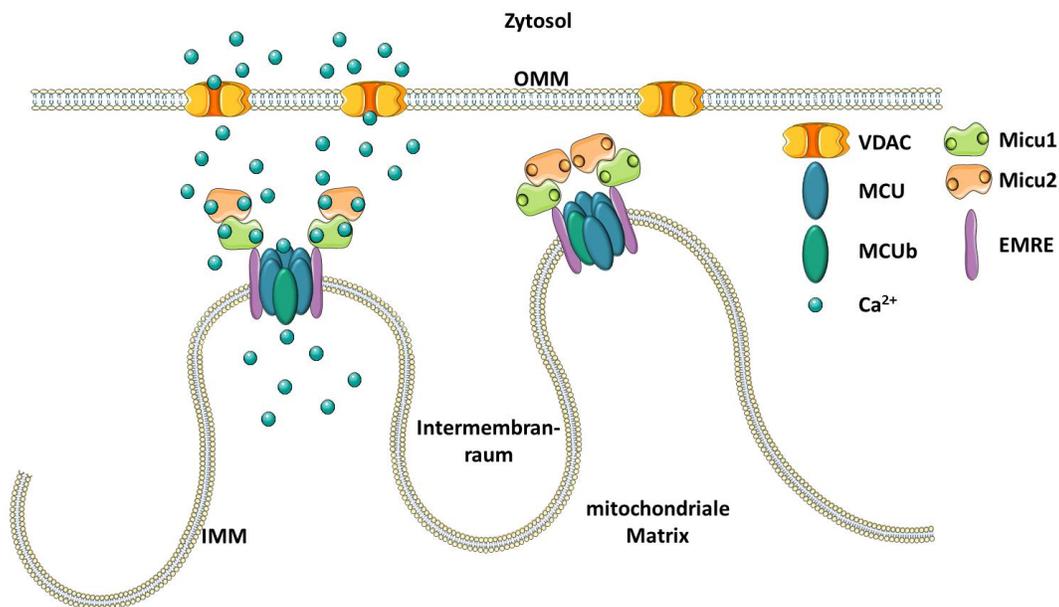
Der genaue Regulationsmechanismus des MCU-Kanals durch MICU1 und MICU2 wurde über die letzten Jahre stark diskutiert und ist noch immer nicht vollständig geklärt. Vor allem die Funktion von MICU1 war zu Beginn stark umstritten. Bei seiner Entdeckung wurde es zunächst als Aktivator des MCU beschrieben (Perocchi et al, 2010) und kurz danach eine Rolle von MICU1 als Gatekeeper vorgeschlagen, der für den geschlossenen Zustand des Kanals bei niedrigen zytosolischen Kalziumkonzentrationen verantwortlich ist (Mallilankaraman et al, 2012b). Nachdem MICU2 eine Funktion als Gatekeeper des MCU nachgewiesen werden konnte, der allerdings MICU1 zur Vermittlung seiner inhibitorischen Funktion benötigt (Patron et al, 2014; Plovanich et al, 2013b), führte dies zur weiteren Untersuchung der gemeinsamen Funktion der beiden Regulatoren MICU1 und MICU2. Während die Rolle von MICU2 als Inhibitor des Kalziumstroms bei niedrigen zytosolischen Kalziumkonzentrationen unumstritten war, kristallisierte sich für MICU1 immer stärker eine Doppelrolle sowohl als Aktivator auch als Inhibitor heraus (Csordas et al, 2013; de la Fuente et al, 2014; Kamer & Mootha, 2014; Matesanz-Isabel et al, 2016; Payne et al, 2017).

Der momentane Stand der Forschung geht davon aus, dass MICU1 bei niedrigen zytosolischen Kalziumkonzentrationen gemeinsam mit MICU2 als Gatekeeper des Kanals fungiert. Dabei sind ihre Wirkungsweisen allerdings nicht redundant, sondern additiv und besitzen eine unterschiedliche Kinetik und  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität, die den Schwellenwert der zytosolischen Kalziumkonzentration zur Aufhebung der Inhibition definiert (Kamer et al, 2017; Matesanz-Isabel et al, 2016; Payne et al, 2017). So ist MICU1 ein dominanter Gatekeeper, da es bereits ohne MICU2 in der Lage ist als MICU1-Homodimere MCU bei niedrigen Kalziumkonzentrationen zu inhibieren, was für MICU2 alleine nicht der Fall ist (Kamer & Mootha, 2014; Patron et al, 2014). Wird MCU allerdings nur durch MICU1-Homodimere statt durch MICU1-MICU2-Heterodimere inhibiert, ist ein niedrigerer Schwellenwert bereits ausreichend, um die Inhibition des Kanals aufzuheben. Dies lässt sich durch die unterschiedliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität von MICU1 und MICU2 erklären: beide binden  $\text{Ca}^{2+}$  mit hoher Affinität, wobei MICU1 eine höhere Affinität als MICU2 besitzt (Kamer et al, 2017; Payne et al, 2017). Der minimale Schwellenwert, der benötigt wird, um die Inhibition des Kanals durch MICU1-MICU2 aufzuheben und der durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität der beiden Regulatoren gemeinsam bestimmt wird, wurde auf einen Wert von 620 nM (Kamer et al, 2017) bzw. 1,5  $\mu\text{M}$  bestimmt (Payne et al, 2017). Unter basalen Bedingungen, bei denen die Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$  im Zytosol ungefähr 100 nM beträgt, wird dieser Schwellenwert nicht erreicht und MCU in geschlossenem Zustand gehalten. Die dominante Rolle von MICU1 als Gatekeeper und die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten für  $\text{Ca}^{2+}$  deuten darauf hin, dass die Funktion von MICU2 nicht die Inhibition von MCU ist, sondern hauptsächlich die Modulation der durch MICU1 vermittelten Inhibition. Hierbei reguliert MICU2 den Schwellenwert für die Aktivierung des Kanals durch Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität von MICU1, was dazu führt, dass es erst bei höheren Kalziumimpulsen zu einem Kalziumstrom kommt (Payne et al, 2017).

Neben seiner Funktion als Gatekeeper ist MICU1 auch für die kooperative Aktivierung des Kalziumstroms verantwortlich (Csordas et al, 2013; de la Fuente et al, 2014; Kamer & Mootha, 2014; Matesanz-Isabel et al, 2016; Payne et al, 2017). Nachdem bei Erreichen des Schwellenwertes die

Inhibition von MCU durch Bindung von Kalzium an MICU1-MICU2 Heterodimere aufgehoben wurde, kommt es bei noch höheren Kalziumkonzentrationen zur kooperativen Aktivierung des Kanals durch MICU1 (Csordas et al, 2013; de la Fuente et al, 2014; Kamer & Mootha, 2014). Sein Paralog MICU2 hat auf die Kanalaktivierung keinen Einfluss (Matesanz-Isabel et al, 2016).

Ein weiterer wichtiger Regulator des Uniporter Komplexes ist EMRE (*essential MCU regulator*), ein 10 kDa großes Protein, das die innere mitochondriale Membran durchspannt. EMRE besitzt unterschiedliche Funktionen. Zum einen bildet und stabilisiert es die Verbindung zwischen MCU und MICU1, indem es mit MCU interagiert, während es gleichzeitig an den C-Terminus von MICU1 bindet (Tsai et al, 2016). Zum anderen besitzt es auch selber eine regulatorische Funktion (Sancak et al, 2013), wobei der exakte Mechanismus noch umstritten ist. Eine Möglichkeit der MCU-Regulation wären spezifische Reste in N- und C-terminalen Bereichen von EMRE, die mit MCU interagieren, den Kanal dadurch in einer offenen Konformation halten und einen Einstrom von Kalzium ermöglichen (Yamamoto et al, 2016). Eine andere Hypothese ist eine Interaktion spezifischer Aminosäuren der Transmembranhelix von EMRE mit MCU, die eine Aktivierung des Kanals fördert (Tsai et al, 2016).



**Abbildung 2: Aufbau und Regulation des mitochondrialen Kalzium Uniporter Komplexes;** Die porenbildende Einheit des Komplexes stellt MCU dar, das die innere mitochondriale Membran durchspannt und dort zu einem Multimer oligomerisiert. Die Öffnung des Kanals wird durch verschiedene Regulatoren kontrolliert. MCUb, ein Homolog von MCU, ist alleine nicht in der Lage einen funktionalen Kanal bilden, übt allerdings eine inhibitorische Wirkung auf MCU aus. Die Hautregulatoren MICU1 und MICU2 sind über EMRE als Heterodimere an MCU gebunden und halten den Kanal bei niedrigen Kalziumkonzentrationen geschlossen. Steigt die Kalziumkonzentration im Intermembranraum an, kommt es zu einer Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an die EF-Hände der MICU-Proteine und somit zu einer Aktivierung des Kanals. VDAC: voltage dependent anion channel, IMM:innere mitochondriale Membran , OMM: outer mitochondrial membrane (äußere mitochondriale Membran)

Weiterhin spielt MCUR1 (*MCU regulator*) eine Rolle bei der Regulation des mitochondrialen Kalziumeinstroms, da seine Herunterregulation zu einer verringerten Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  führt

(Mallilankaraman et al, 2012a; Vais et al, 2015). Allerdings scheint dieser nicht Bestandteil des Uniporter Komplexes zu sein, da zwar eine Interaktion zwischen MCU und MCUR1 gezeigt werden konnte, jedoch keine Interaktion mit MICU1 (Lee et al, 2015; Mallilankaraman et al, 2012a). MCUR1 konnte zudem eine Funktion als Assoziationsfaktor der Cytochrom C Oxidase zugeordnet werden (Paupé et al, 2015). Vor kurzem konnten Tomar *et al.* zeigen, dass MCUR1 sowohl mit MCU als auch mit EMRE interagiert und als „*scaffold factor*“ für die Komplexbildung wichtig ist, wodurch es eine regulierende Funktion auf die Dynamik des Kalziumeinstroms ausübt (Tomar et al, 2016).

## 1.5 Zielsetzung

Kalziumsignale nehmen eine wichtige regulatorische Funktion in gesunden Melanozyten, aber auch in entarteten Melanomzellen ein und können zur Tumorentstehung und -progression beitragen. Ein wichtiges Organell zur Abpufferung hoher zytosolischer Kalziumkonzentrationen sind die Mitochondrien, deren Bedeutung für das Überleben von Melanomzellen immer deutlicher wird. Bisher ist allerdings kaum etwas über die Zusammenhänge der mitochondrialen Kalziumaufnahme mit Tumor- und Metastasen-fördernden Prozessen bekannt. Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss des mitochondrialen Kalzium Uniporters, als Hauptmechanismus der mitochondrialen Kalziumaufnahme, auf tumor-charakteristische Eigenschaften von Melanomzellen zu charakterisieren. Hierfür wurden zunächst die Expression des Kanals und die Aufnahme von Kalzium in die Mitochondrien untersucht. Anschließend wurden die Auswirkung eines Fehlens von MCU auf charakteristische Eigenschaften tumoriger Melanomzellen, wie Proliferation und Migration, analysiert. Um mögliche Mechanismen einer Regulation von Signalwegen durch MCU zu identifizieren, wurde die Expression tumor-relevanter Proteine untersucht. Da bereits bekannt ist, dass Mitochondrien eine wichtige Rolle bei der Resistenz von Melanomzellen gegenüber in der Therapie eingesetzten Signalweginhibitoren einnehmen, sollte weiterhin die Bedeutung eines Verlustes von MCU auf die Sensitivität der Zellen überprüft werden.

## 2. Materialien

### 2.1 Antikörper

#### 2.1.1 Primärantikörper

**Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper**, Angabe von Spezifität, Klonalität, produzierendem Organismus, Hersteller, Bestellnummer und eingesetzter Verdünnung

Antikörper	Klonalität	Organismus	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung
α-MCU	polyklonal	Hase	Sigma	HPA016480	1:500
	monoklonal	Hase	NEB	14997	1:1000
α-MICU1	polyklonal	Hase	Abcam	ab102830	1:500
	polyklonal	Hase	Sigma	HPA037479	1:500
	monoklonal	Hase	Cell Signaling	12524	1:500
α-Calnexin	polyklonal	Hase	Assay Design	SPA865	1:2000
α-GAPDH	polyklonal	Hase	Cell Signaling	2118	1:2000
α-Hsp90	polyklonal	Hase	Cell Signaling	4874	1:1000
α-VDAC	polyklonal	Hase	Cell Signaling	4866	1:1000
α-JARID1B	polyklonal	Hase	Novus	NB100-97821	1:1000
α-MITF	polyklonal	Hase	Sigma	HPA003259	1:250
α-PGC1α	polyklonal	Hase	Santa Cruz	Sc-13067	1:750
α-PMCA	monoklonal	Maus	Thermo Fisher	MA1-914	1:1000

#### 2.1.2 Sekundärantikörper

**Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper**, Angabe von Spezifität, Hersteller, Bestellnummer und eingesetzter Verdünnung

Antikörper	Hersteller	Bestellnummer	Verdünnung
α-Hase	GE Healthcare	NA9340	1:25000
α-Maus	Amersham Bioscience	NA931	1:5000
α-Ratte	Sigma	A5795	1:40000
α-Ziege	Promega	V8051	1:10000

## 2.2 Chemikalien

**Tabelle 3: Verwendete Chemikalien**, Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Chemikalie	Hersteller	Bestellnummer
2-Mercaptoethanol	Acros Organics	125472500
2-Propanol	Sigma	19516
Accutase	PAA	L11-007
Acrylamid-Bisacrylamid	Sigma	A7168
Agar Noble	Difco	21422
Agar Select	Sigma	A5054
Agarose broad range	Roth	T846.3
Agarose GTQ	Roth	6352.4

---

Albumin, Bovine Serum (BSA)	Sigma	A6003
Ampicillin	Sigma	A9393
APS	Sigma	248614-56
Benzonase	Sigma	E1014-5KU
Borsäure	Sigma	B6768
Bromphenolblau	Eurobio	18069
Buthioninsulfoximin (BSO)	Biomol	Cay14484-500
Calcein-AM	Fisher Scientific	C3100MP
Chloroform	Fisher Scientific	15677730
Complete Proteinase-Inhibitor	Roche	05892791001
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma	C5758
DMSO	Sigma	D8418
DTT	Sigma	D9779
EDTA	Sigma	ED2SS
EGTA	Sigma	E4378.2506
Ethanol (absolut)	Sigma Aldrich	32205
Fura-2-AM	Invitrogen	F1221
GelRed	Biotium	41003
Glucose	Merck	102382
Glutaminsäure	Sigma	G1626
Glycin	Applichem	R030
Glycogen	Fisher Scientific	10814010
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Fisher Scientific	H325-500
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)	Sigma	H6648
HCl 30 %	Applichem	A3190
Hefeextrakt	Difco	212750
HEPES	Sigma	H7523
Ionomycin	Calbiochem	407950
Kaliumchlorid	AnalaR	46764298
Kalziumchlorid	Merck	102382
Magermilchpulver	Sucofin	-
Magnesiumchlorid	Merck	105833025
Methanol	Fisher Chemicals	M3950
N-Acetylcystein (NAC)	Sigma	A7250
Natriumascorbat	Sigma	-
Natriumazid	Sigma	S8032
Natriumchlorid	Sigma	S9888
Natriumhydroxid	Sigma	S8045
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Sigma	S6508
NP-40	Sigma	74385
OptiMEM	Thermo Fisher	31985088
Penicillin (10000 U/ml)	Invitrogen	15140-122
PeqGold dNTPMix	Peqlab	20-3011
PeqGreen DNA/RNA Dye	Peqlab	37-500
Propidiumiodid	Life Technologies	P3566
SDS	Acrosorganics	327315000
Streptomycin (10000 µg/ml)	Invitrogen	15140-122
TEMED	Sigma	T9281
Tempol (4-Hydroxy-Tempo)	Sigma	R8875

---

Thapsigargin	Invitrogen	T7458
Tris-HCl	Roth	9090.3
Triton X-100	Eurobio	18774
Trizma (Tris base)	Sigma	T1503
Trizol	Life Technologies	15596018
Trolox	Sigma Aldrich	238813
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Fisher Scientific	25300-062
Trypton	Sigma	T9410
Tween20	Sigma	P1379
Urea	Sigma	U5378

## 2.3 Größenstandards

**Tabelle 4: Verwendete Größenstandards für Gelelektrophorese oder SDS-PAGE, Angabe von Hersteller und Bestellnummer**

Größenstandard	Hersteller	Bestellnummer
1 Kb Plus Ladder	Invitrogen	10787-018
Broad Range	Fisher Scientific	26634X4
Precision Plus Protein Dualcolor Standard	Bio-Rad	161-0325

## 2.4 Laborgeräte

**Tabelle 5: Verwendete Laborgeräte mit Angabe des Herstellers**

Laborgerät	Hersteller
Amaya Nucleofactor II	Lonza
Bio-Photometer	Eppendorf
CFX96 Real-Time System	Biorad
ChemiDoc XRS	Biorad
CO <sub>2</sub> Inkubator HeraCell 150i	Thermo Scientific
CO <sub>2</sub> Inkubator Heraeus	Thermo Scientific
Gelelektrophorese Mini-Protean Tetra Cell	Biorad
Heizblock	Bioer
Magnetrührer C-MAG HS4	IKA
Magnetrührer RCT basic	IKA
Mastercycler Personal 5332	Eppendorf
pH Elektrode accumet Basic	Fisher Scientific
Pipetboy acy	Integra Biosciences
Plate Reader Tecan infinite M200 Pro	Tecan
Plattformschüttler Unimax 1030	Heidolph
Primo Vert Durchlichtmikroskop	Zeiss
Semi Dry Blotter	StarLab
Sterilwerkbank	HERAsafe
Stromquelle Power Pac HC	Biorad
Sub-cell Ararose Gel Elektrophorese Systems	Biorad
Thermomixer Univortemp	Universal Labortechnik

---

Vortex Thriller	Peqlab
Zellzähler Moxi Z	Orflo
Zellzähler Z2	Beckman Coulter
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf
Zentrifuge 5418	Eppendorf
Zentrifuge Mikro 220R	Hettich
Zentrifuge Mini Spin 5452	Eppendorf
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich

---

## 2.5 Lösungen

### 2.5.1 Kalzium-Lösungen

Physiologische Kalziumlösungen mit variablen  $\text{CaCl}_2$ -Konzentrationen

145	mM	NaCl
4	mM	KCl
10	mM	HEPES pH 7,4
10	mM	Glucose
2	mM	$\text{MgCl}_2$
0,25 / 0,5 / 1 / 1,5 / 2	mM	$\text{CaCl}_2$

~310 mosmol/L; pH 7,4 (Titration mit NaOH)

Physiologische Kalziumlösungen mit 0 mM  $\text{Ca}^{2+}$  und EGTA

145	mM	NaCl
4	mM	KCl
10	mM	HEPES pH 7,4
10	mM	Glucose
2	mM	$\text{MgCl}_2$
1	mM	EGTA

~310 mosmol/L; pH 7,4 (Titration mit NaOH)

### 2.5.2 SDS-PAGE und Western Blot-Lösungen

Blottingpuffer

20	%	Methanol
1	%	SDS
250	mM	Tris-HCl
1,92	M	Glycin

pH 8,3

#### Lämmli-puffer 5x

125	mM	Tris pH 6,8
2,5	%	SDS
0,1	%	Bromphenolblau
60	%	Glycerin
25	%	$\beta$ -Mercaptoethanol

#### Primärantikörperlösung

Antikörper in angegebener Verdünnung (siehe 2.1)

1	%	BSA
0,02	%	Natriumazid

in PBS

#### RIPA-Lysepuffer

10	mM	Tris pH 7,4
1	%	Triton X-100
0,5	%	NP40
150	mM	NaCl

in PBS; pH 7,4

#### Sammelgelpuffer

0,5	M	Tris-HCl
0,4	%	SDS

in Aqua dest; pH 6,8

#### SDS-Elektrophoresepuffer, 10x

250	mM	Tris base (Trizma)
1,92	M	Glycin
1	%	SDS

pH 8,3

#### Sekundärantikörperlösung

Antikörper in angegebener Verdünnung

5	%	Magermilch
---	---	------------

in TBST

#### TBS, 10x

500	mM	Tris base (Trizma)
1,5	M	NaCl

pH 7,5

TBST  
 0,1 % Tween  
 10 % TBS, 10x

Trenngelpuffer  
 1,6 M Tris-HCl  
 0,4 % SDS

inAqua dest; pH 8,8

## 2.6 Mikroskope und Messplatz-Komponenten

Für Imaging-Experimente wurden die in den folgenden Tabellen aufgeführten Mikroskope mit den zugehörigen aufgelisteten Komponenten verwendet.

**Tabelle 6: Komponenten des Imaging Setups für Sensor-basiertes Imaging**

<b>Mikroskop</b>	Zeiss Axio Observer Z1
<b>Software</b>	Axio Vision
<b>Lichtquelle</b>	Colibri LED
<b>Kamera</b>	Evolve512x512 EM-CCD
<b>Objektive</b>	40x Ölobjektiv
<b>Filtersets</b>	38HE GFP (Zeiss) 46HE YFP (Zeiss) 54HE CFP/YFP/HcRed (Zeiss) 55HE CFP/YFP (Zeiss) 63HE RFP (Zeiss) F36-544 CFP (AHF)
<b>Extras</b>	Pecon XL S1 Inkubator Pumpe und Perfusionssystem

**Tabelle 7: Komponenten des Kalzium-Imaging-Setups für Fura-2 Messungen**

<b>Mikroskop</b>	Olympus IX70
<b>Software</b>	TILL Vision
<b>Lichtquelle</b>	Polychrome V Monochromator
<b>Kamera</b>	CCD-Kamera T.I.L.L. Imago
<b>Objektive</b>	20x Luftobjektiv
<b>Filtersets</b>	Fura-2 Filter

## 2.7 Oligonukleotide

### 2.7.1 qRT-PCR Primer

**Tabelle 8: Verwendete qRT-PCR Primer**, Angabe der Ziel-mRNA und der Sequenz der Forward- und Reverse-Primers

Ziel-mRNA	Forward-Primer 5'-3'	Reverse-Primer 5'-3'
MCU / CCDC109A	CACACAGTTTGGCATTTTGG	TGTCTGTCTCTGGCTTCTGG
MCUb / CCDC109B	CAAAACTGCAGCCATCTTCA	CTCTTTGGACACTGCACATCA
MICU1 / CBARA1	GTGTTTCAGCCCTCACAACT	CCACCAAAGCTGCCTCTCAGT
MICU2 / EFHA1	AGCGCTTCATGCAGTTTTCT	CAGCTGTTTGGATCCCTGAC
MICU3 / EFHA2	CCAGTTTGGAAAGGCTCATC	ATTCTGAACCCTGCATGTGG
MCUR1 / CCDC90A	GCCTGCACTCGTTTCCTG	CTGCTCCCAGAAGAGGTGAA
EMRE / SMDT1	CTTGAGGAAAGATGGCGATG	CGACATAGAGAAAGGGGATCA
RNA-Polymerase	GGAGATTGAGTCCAAGTTCA	GCAGACACACCAGCATAGT
TBP	CGGAGAGTTCTGGGATTGT	GGTTCGTGGCTCTCTTATC

### 2.7.2 siRNA

**Tabelle 9: Verwendete siRNAs**, Angabe der siRNA mit Zielgen, Stockkonzentration, Zielsequenz und Hersteller

siRNA	Zielgen	Konzentration	Zielsequenz 5'-3'	Hersteller
MCU_1	MCU	20 µM	CAGGTGCCTTGCAAAGGTTGA	Qiagen
MCU_2	MCU	20 µM	CTGGTCATTAATGACTTAACA	Qiagen
MICU1_1	MICU1	20 µM	TTCCTCGAATTTTCAGCGTAAA	Qiagen
MICU1_2	MICU1	20 µM	AAGCTTGAGTTTGAACGCCAT	Qiagen
non silencing (siCTRL)	-(Kontrolle)	40 µM	nicht bekannt	Microsynth
non silencing (siCTRL)	-(Kontrolle)	20 µM	AATTCTCCGAACGTGTCACGT	Qiagen

## 2.8 Kits /Reagenzien-Systeme

**Tabelle 10: Verwendete Kits**, Angabe von Hersteller und Bestellnummer

Kit	Hersteller	Bestellnummer
Amaya NHEM-Neo Nucleofector Kit	Lonza	C-002-5C
BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific	23225
Cell Titer Blue Cell Viability Assay	Promega	G8081
Clarity Western ECL	Biorad	1705060
Dako REAL™ Detection System, Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse Kit	Dako	K5005
HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen	12662
QuantiTect SYBR Green kit	Qiagen	204145
Quick Start Bradford Protein Assay Kit	Biorad	5000201
Superscript II Reverse Transkriptase Kit	Invitrogen	18064-014

## 2.9 Vektoren und Konstrukte

Tabelle 11: Verwendete Konstrukte und ihre Bezugsquelle

Konstrukt	Bezugsquelle
4mtD3cpv	Zur Verfügung gestellt von N. Demaurex
HyPer3	Evrogen
MCU-Flag	Zur Verfügung gestellt von R. Rizzuto
MICU1-HA	Zur Verfügung gestellt von J. Riemer
MCU-eGFP	Zur Verfügung gestellt von R. Rizzuto
psPAX2	Am Wistar Institut erhalten
pMD2.G	Am Wistar Institut erhalten
pLKO.1 Leervektor	Am Wistar Institut erhalten
pLKO.1 shMCU#1	Sigma, TRCN 133861
pLKO.1 shMCU#2	Sigma, TRCN 420533
pLKO.1 shMICU1#1	Am Wistar Institut erhalten, TRCN 53370
pLKO.1 shMICU1#2	Sigma, TRCN 299804

## 2.10 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 12: Verwendete Verbrauchsmaterialien, Angabe des Herstellers und der Bestellnummer

Arbeitsmaterial	Hersteller	Bestellnummer
24 Well-Platten für Migrationsversuche	Greiner Bio-One	662160
Baysilon-Paste hochviskos	GE Bayer Silicones	700514
Deckgläser (25mm)	ORSATec / Kindler	02R1215-D
Elektroporationsküvetten	BioBudget	75-02-SE
Immersionsöl Immersol 518F fluoreszenzfrei, 23° C	Zeiss	444960-0000-000
Immersionsöl Immersol 518F fluoreszenzfrei, 37° C	Zeiss	44970-9010-000
my-Budget Einmalpipetten	BioBudget	75-50-PP
PVDF Membran	Fisher Scientific	IPVH00010
Whatman Filterpapier	Whatman	512-3939
Zellkultureinsätze Transwell, 8 µm Porengröße	VWR	734-1574

Standardmäßig verwendete Verbrauchsmaterialien wie Zellkulturflaschen, Pipetten, Pipettenspitzen, Well-Platten und Reaktionsgefäße wurden von den Herstellerfirmen Sarstedt, VWR, Corning, Peqlab und Eppendorf bezogen.

## 2.11 Zellkulturmaterialien

### 2.11.1 Kulturmedien und Zusätze

**Tabelle 13: Verwendete Kulturmedien und Zusätze**, Angabe der Zusammensetzung, des Herstellers und der Produktnummer

Medium / Zusatz	Zusammensetzung	Hersteller	Produktnummer
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (1x) (DPBS)	-	Invitrogen / Gibco	14190-094
Fetales Kälberserum (FCS)	-	Life Technologies	10270106
L15 Leibovitz Flüssigmedium	-	Biochrom	F21315
L-Glutamin (200 mM)	-	Sigma	G7513
MCDB153 Basalmedium	-	Biochrom	F8105
MEM-Medium + L-Glutamin	MEM (500 ml) + 10 % FCS + 1 % Pen/Strep	Invitrogen	31095-029
Penicillin / Streptomycin-Lösung (10000 UN)	-	Sigma	P4333
Puromycin	-	VWR	540222-25
Tumor-Medium (2 % TU-Medium)	MCDB153 (4 Teile) L15 Leibovitz (1 Teil) 2 % FCS 1,68 mM CaCl <sub>2</sub> 2 mM L-Glutamin	-	-

### 2.11.2 Transfektionsreagenzien

**Tabelle 14: Transfektionsreagenzien**, Angabe des Herstellers und der Bestellnummer

Transfektionsreagenz	Hersteller	Bestellnummer
FuGene HD	Promega	E2311
NHEM-Neo Nucleofector Kit	Lonza	VPD-1003

### 2.11.3 Zelllinien und Primärzellen

**Tabelle 15: Verwendete Zelllinien und Primärzellen und ihre Bezugsquelle**

Zelllinie / Primärzellen	Zellbank / zur Verfügung gestellt von
HEK293T	M. Herlyn, Wistar Institut Philadelphia
Sk-Mel-5	ATTC HTB-70
WM3734	M. Herlyn, Wistar Institut Philadelphia
1205Lu	M. Herlyn, Wistar Institut Philadelphia
MelJuso	H. Stanisz, Dermatologie Universitätsklinikum Homburg
WM793	M. Herlyn, Wistar Institut Philadelphia

---

451Lu, 451Lu-BR	M. Herlyn, Wistar Institut Philadelphia
WM164	M. Herlyn, Wistar Institut Philadelphia
WM983B, WM983B-BR	M. Herlyn, Wistar Institut Philadelphia
WM4237 MP2	M. Herlyn, Wistar Institut Philadelphia
WM1366	M. Herlyn, Wistar Institut Philadelphia
WM35	M. Herlyn, Wistar Institut Philadelphia
primäre humane Melanozyten NHEM-1	H. Stanisz, Dermatologie Universitätsklinikum Homburg
primäre humane Melanozyten NHEM-2	H. Stanisz, Dermatologie Universitätsklinikum Homburg

---

## 3. Methoden

### 3.1 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden im Inkubator bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. In drei- bis vier-tägigen Intervallen wurden die Zellen mit PBS gewaschen, anschließend durch Accutase abgelöst und in ihrem Kulturmedium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde mit einem ihrem Wachstum entsprechenden Verhältnis auf neue Kulturflaschen aufgeteilt.

Zum Erhalt früher Passagen der eingesetzten Linien wurden diese kryokonserviert. Hierfür wurden Zellen bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert, abgelöst und bei 300 x g für 7 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in FCS mit 10 % DMSO aufgenommen, auf spezielle Kryoröhrchen aufgeteilt und mit Hilfe eines Gefrierbehälters um 1°C pro Minute auf -80°C heruntergekühlt. Anschließend konnten die Zellen in flüssigem Stickstoff langfristig gelagert werden.

### 3.2 Stabile shRNA-Knockdown Melanomlinien

#### 3.2.1 Herstellung stabiler Zelllinien mit Hilfe eines lentiviralen Systems

Um einen stabilen Knockdown zu erhalten, wurde ein „*short hairpin RNA*“ (shRNA)-Plasmid mit Hilfe lentiviraler Transduktion in das Genom der Melanomzelllinien integriert. Hierfür wurden zunächst Viruspartikel, die das gewünschte Plasmid enthielten, hergestellt. Bei 70-prozentiger Konfluenz wurden HEK293T Zellen durch Lipofektion mit drei Plasmiden transfiziert: psPAX2, PMD2.G und pLKO.1 als Leervektorkontrolle oder mit der entsprechenden shRNA-Sequenz. Das Plasmid psPAX2 kodiert für die HIV Gene Gag (*group-specific antigen*), Pol (*DNA polymerase*), Rev (*regulator of expression of virion proteins*) und Tat (*transactivator protein*), die für die Produktion viraler Strukturproteine und regulatorischer Elemente benötigt werden. PMD2.G ist ein VSV-G (*vesicular stomatitis virus glycoprotein*) exprimierendes Plasmid, welches für die Herstellung der Viruspartikelhülle verantwortlich ist. Als Basis für den Knockdown eines Gens mit Hilfe der RNA Interferenz, dient der pLKO.1 Vektor. Dieser wurde im Rahmen des RNAi Konsortiums (TRC) am Broad Institute entwickelt und kodiert sowohl für die gewünschte hairpin RNA als auch für eine Puromycinresistenz, die zur Selektion stabiler Zellen genutzt werden kann.

18 h nach Transfektion der HEK293T Zellen wurde das Kulturmedium durch Medium mit erhöhtem Anteil an FCS ersetzt. Nach Inkubation für 24 h konnte das Medium mit den Viruspartikeln abgenommen und durch frisches Medium ersetzt werden, welches nochmals für die selbe Dauer inkubiert und anschließend gesammelt wurde. Das Medium, welches die Viruspartikel enthielt, wurde filtriert, um übrige Zellfragmente zu entfernen. 1 ml des filtrierten Mediums mit Viruspartikeln wurden in einem 1:1 Verhältnis mit frischem Medium und zusammen mit 8 µg/ml Polybrene (Hexadimethrinbromid), welches zur Vereinfachung des Gentransfers dient (Davis et al, 2002), auf tags zuvor ausgesäte Zielzellen gegeben und über Nacht unter Standardkulturbedingungen inkubiert. Die Virus-behandelten Zellen wurden anschließend mit HBSS gewaschen und mit frischem Kultur-

medium bedeckt. Nach 24 h konnte die Selektion der stabil transduzierten Zellen erfolgen. Hierfür wurde dem Kulturmedium für 48 h 2 µg/ml Puromycin zugegeben.

### **3.2.2 RNA Interferenz**

Die RNA-Interferenz ist ein natürlich in Zellen vorkommender Mechanismus um die Expression eines bestimmten Proteins herunter zu regulieren. Hierbei wird mit Hilfe des sogenannten „*RNA-induced silencing complex*“ (RISC)- Enzymkomplexes die Ziel-mRNA gespalten und somit die Proteintranslation verhindert.

In dieser Arbeit wurde synthetisch hergestellte shRNA als doppelsträngige RNA, aus der der Leitstrang des RISC-Komplexes gebildet wird, eingesetzt. Hierfür wurde der shRNA-kodierende Vektor pLKO.1 mittels lentiviraler Transduktion in die Zellen eingebracht und stabil in das Genom integriert. Die Expression der shRNA steht unter Kontrolle des U6 Promotors, der durch die Polymerase III erkannt wird. Dies führt zur Herstellung einer pre-microRNA, die durch das Ribonuklease III Enzym Drosha prozessiert und anschließend mit Hilfe von Exportin 5 aus dem Nukleus transportiert wird. Im Zytosol übernimmt ein weiteres Ribonuklease Enzym Dicer die anschließende Prozessierung der RNA zu 19-23 Basenpaar langen Fragmenten. Die erhaltenen doppelsträngigen RNA Fragmente werden anschließend an den RISC-Komplex übergeben und dort zu Einzelsträngen aufgespalten. Einer der beiden erhaltenen Einzelstränge verbleibt als Leitstrang im RISC-Komplex, während der andere Einzelstrang abgebaut wird. Durch den Einbau des Leitstranges wird der RISC-Komplex aktiviert und ist nun in der Lage mRNA zu spalten, welche komplementär zu dem enthaltenen Leitstrang ist.

## **3.3 Proliferations- und Viabilitätsassays**

Um den Einfluss der herunterregulierten Gene auf das Wachstum der Zellen bzw. ihre Viabilität in Bezug auf die Behandlung mit verschiedenen Substanzen untersuchen zu können, wurden Assays basierend auf zwei unterschiedlichen Methoden durchgeführt.

### **3.3.1 Zellzählung**

Eine Zählung der Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten wurde zur Messung der Proliferation siRNA transfizierter und stabil herunterregulierter Melanomlinien eingesetzt. Hierfür wurden je  $5 \times 10^5$  Zellen pro Well in einer 6-Well Platte ausgesät. Nach je 24 h, 48 h, 72 h und 96 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 500 µl Accutase von der Platte gelöst. Diese wurden anschließend in ein Eppendorf-Gefäß überführt und das Well mit frischem Medium nachgespült. Durch Zentrifugation für 7 min bei 300 x g wurde ein Zellpellet erhalten, welches in 200 µl Medium aufgenommen wurde. Mit Hilfe des Zellzählers Moxi Z wurde die Anzahl an Zellen pro Milliliter bestimmt und somit die gesamte Zellzahl berechnet. Zur Normierung der Zellzahl wurde ein 0 h Wert be-

stimmt. Hierfür wurden die Zellen nach Aussäen für wenige Stunden anhaften gelassen und wieder abgelöst, um die wirkliche Zellzahl, mit der das Experiment begonnen wurde, zu bestimmen.

### 3.3.2 Umsetzung von Resazurin oder MTT

In vielen handelsüblichen Reaktionskits wird die Umsetzung von Resazurin zu Resorufin oder von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) zu Formazan durch lebende Zellen genutzt. Die zu untersuchenden Zellen wurden mit einer Dichte von 5000 Zellen/Well in 100 µl Kulturmedium in einer 96-Well Platte ausgesät. Nachdem die Zellen adhärirt waren, konnte ein 0 h Wert zur Normierung bestimmt werden. Weitere Messungen wurden nach 1-7 Tagen durchgeführt. Hierfür wurden 20 µl einer wässrigen Resazurinlösung (Alamar Blue bzw. Cell Titer Blue) bzw. einer MTT-Lösung pro Well zugegeben und nach Herstellerangaben bei 37°C inkubiert. Die erfolgte Umsetzung von Resazurin zu fluoreszierendem Resorufin konnte mittels eines Plattenlesegerätes mit einer Lichtanregung bei 560 nm und einer Messung der Emission bei 590 nm ermittelt werden. Für Assays basierend auf MTT wurde die Absorption des violetten Formazans bei 500 nm-600 nm gemessen.

Zur Bestimmung des Einflusses verschiedener Substanzen auf die Viabilität wurden diese nach Adhärenz der Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen zum Kulturmedium gegeben (siehe Tabelle 16). Die nachfolgende Inkubation und Messung erfolgte wie zuvor beschrieben.

**Tabelle 16: Eingesetzte Wirkstoffe und Konzentrationen für Viabilitäts- und Proliferationsassays**

<b>Wirkstoff</b>	<b>Konzentrationen</b>
Trametinib	300 pM, 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM
KB-R7943, AZD2014, MK2206, Pictilisib	3 nM, 10 nM, 30 nM, 300 nM, 1 µM
Vemurafenib	
NAC	200 µM
Trolox	20 µM
BSO	1 mM

### 3.4 Sphäroidbildung

Sphäroide entstehen durch die Zusammenlagerung und Proliferation von Tumorzellen zu einem kugelförmigen Aggregat. Zur Untersuchung der Proliferation in einer dreidimensionalen Umgebung wurden aus der gleichen Anfangszellzahl Sphäroide gebildet und deren Größe analysiert.

Zur Generierung der Sphäroide wurden die Wells einer 96 Well-Platte mit je 50 µl 1,5 % Difco Agar beschichtet. Nach Aushärten des Agars wurden je 5000 Zellen pro Well in 100 µl Kulturmedium ausgesät und bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach vier (WM3734) bzw. fünf Tagen (1205Lu) Inkubation hatten sich erkennbare Sphäroide aus den Einzellzellen gebildet, die mit Hilfe eines Zeiss Primo Vert Mikroskops bei einer Vergrößerung von 40 x bzw. 10 x und der Axio Vision Software aufgenommen wurden. Die Auswertung der Sphäroidgröße erfolgte unter Verwendung der ImageJ Software.

## **3.5 Bestimmung der Expressionslevel auf RNA-Ebene**

### **3.5.1 RNA-Isolation**

Zur Isolation der totalen mRNA wurde das TRIzol Reagenz verwendet, welches ein Gemisch aus Phenol und Guanidin-Isothiocyanat darstellt. Diese Chemikalien führen zu einer Lyse der Zellen und inhibieren gleichzeitig RNasen in der Probe. Zellen, aus denen RNA gewonnen werden sollte, wurden pelletiert, in 800 µl Trizol aufgenommen und konnten so bei -80° C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Im ersten Schritt der Isolation wurden Zellfragmente abzentrifugiert (12000 x g, 10 min, 4° C), der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform, das durch Schütteln mit dem TRIzol Reagenz vermischt wurde und zur Phasentrennung führt. Nach einer nachfolgenden Zentrifugation für 15 min bei 4° C und 12000 x g waren zwei deutliche Phasen der Flüssigkeit erkennbar: die organische Phase, welche denaturierte Proteine enthielt und die wässrige Phase mit der zu isolierenden RNA. Die in der Probe vorhandene DNA sammelte sich in der Phasengrenze an. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene RNA durch Zugabe von 1 µl Glykogen und 500 µl Isopropanol präzipitiert. Nach 10-minütiger Inkubation und folgender Zentrifugation (10 min, 4° C, 12000 x g) konnte der Überstand abgenommen und das RNA Pellet mit 1 ml 75 % Ethanol gewaschen werden (5 min, 7500 x g, 4° C). Das erhaltene RNA Pellet wurde getrocknet und konnte anschließend in 10 µl DEPC-behandeltem Wasser gelöst werden. Vor weiterer Verwendung der RNA wurde die Konzentration mit Hilfe eines Photometers bestimmt und ihre Qualität durch elektrophoretische Auftrennung in einem 2 % Agarosegel überprüft.

### **3.5.2 Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA**

Die Umschreibung von RNA zu cDNA erfolgte mit Hilfe der Reversen Transkription. Hierfür wurden 0,8 µg RNA zusammen mit 1 µl Oligo-dT-Primern (0,5 µg/µl) und 1 µl dNTP-Mix (10 mM) in einem Gesamtvolumen von 10 µl für 5 min auf 65° C erhitzt. In einem weiteren Schritt wurden 4 µl 5x First Strand Puffer, 2 µl DTT (0,1 M) und 1 µl RNase out zugegeben und für 2 min bei 42° C inkubiert. Anschließend wurde 1 µl Superscript II reverse Transkriptase zugegeben, die mit Hilfe der anderen Komponenten cDNA aus der vorhandenen RNA synthetisiert. Für diese Reaktion wurden die Proben 50 min bei 42° C inkubiert, anschließend für 15 min auf 70° C erhitzt und zuletzt wieder auf 4° C abgekühlt. Die erhaltene cDNA konnte bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert werden.

### **3.5.3 Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR)**

Um die Menge der in Zellen enthaltenen mRNA zu bestimmen, wurde eine quantitative Real-time PCR durchgeführt. Hierbei kann die Menge der zuvor aus mRNA hergestellten cDNA quantitativ mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen erfasst werden. Der dabei eingesetzte Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I bindet an doppelsträngige DNA, wobei der entstehende Komplex Licht im blauen Spektrum

absorbiert und grünes Licht bei einer Wellenlänge von 521 nm emittiert. Wird während der ablaufenden PCR ein neuer DNA-Doppelstrang gebildet, lagert sich an diesen SYBR Green I an und die Fluoreszenz der Probe nimmt zu. Somit kann anhand des Fluoreszenzanstiegs quantitativ auf die Menge der zu Beginn vorhandenen DNA zurückgeschlossen werden.

Für die Experimente dieser Arbeit wurde das QuantiTect SYBR Green PCR Kit der Firma Qiagen eingesetzt. Pro Ansatz wurden 12,5 µl des im Kit enthaltenen 2x Mastermix mit je 2,5 µl des Forward- bzw. Reverseprimers (3 µM) und 2,5 µl H<sub>2</sub>O gemischt. Der Mastermix ist ein Puffer, dem bereits die HotStar-Taq DNA Polymerase, ein dNTP Mix und der SYBR Green Farbstoff zugesetzt wurden. Zu dem Gesamtvolumen von 20 µl je Ansatz wurden anschließend 0,5 µl der cDNA in einem Gesamtvolumen von 5 µl zugegeben. Die Messung erfolgte mit Hilfe des qPCR-Cyclers mit in Tabelle 17 aufgeführtem Programm.

**Tabelle 17: Temperatur- und Zyklus-Bedingungen für die qRT-PCR Reaktion**

<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>		
95° C	15 min		Denaturierung
95° C	30 sec		Denaturierung
58° C	30 sec	45 Zyklen	Annealing der Primer
72° C	30 sec		Elongation
95° C	60 sec		Finale Elongation
60° C / 65° C – 95° C	1° C / 5 sec		Denaturierung zur Erstellung der Schmelzkurve
25° C			Abkühlen

### 3.6 Transfektion

Um Fremd-DNA oder -RNA in eukaryotische Zellen einzubringen, können verschiedene Mechanismen der Transfektion eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurden Zellen durch Elektroporation, mit Hilfe von Chemikalien oder auch über virale Transportsysteme (siehe Punkt 3.2.1) transfiziert.

#### 3.6.1 Elektroporation mittels Amaxa Kit

Bei der Elektroporation führen kurze elektrische Impulse dazu, dass temporär kleine Poren in der Zellmembran gebildet werden, über die Fremd-DNA oder -RNA in die Zelle eindringen kann. Während der Elektroporation befinden sich die Zellen in einer speziellen Nucleofector-Lösung in Suspension, die zu hoher Transfektionseffizienz und Viabilität der Zellen beitragen soll. Für alle Melanomzelllinien und primären Melanozyten wurde das Amaxa NHEM-Neo Nucleofector Kit in Kombination mit dem Programm A-024 im Amaxa Nucleofector II (Lonza) eingesetzt. In einem Transfektionsansatz wurden abhängig von der anschließend durchzuführenden Messung  $0,7-1,5 \times 10^6$  Zellen verwendet. Die Vorbereitung der Zellen und die Elektroporation erfolgten nach Angaben des Herstellerprotokolls. Für die Transfektion von siRNA wurden je Transfektionsansatz 3 µl einer einzelnen siRNA (Stockkonzentration 20 µM) bzw. bei Kombinationstransfektionen zweier siRNAs je 1,5 µl siRNA eingesetzt. Die Transfektion von Plasmiden erfolgte mit 1 µg DNA je Transfektionsansatz.

### 3.6.2 Fugene HD-Transfektion

Die Transfektion mit dem Fugene HD Transfektionsreagenz ist eine Art der chemischen, nicht-liposomalen Transfektion. Vorteile sind die hohe Transfektionseffizienz und eine geringe Toxizität für die zu transfizierenden Zellen. Die Transfektion der Zellen erfolgte nach Herstellerangaben. Für Imaging-Experimente mit genetisch kodierten Sensoren wurden die zu untersuchenden Zellen ca. 24 h vor Transfektion in 6 Well-Platten auf Coverslips mit 2 ml ihres Kulturmediums ausgesät, so dass eine 80-prozentige Konfluenz am Tag der Messung vorlag. Vor Transfektion wurden OptiMEM und Fugene zunächst auf Raumtemperatur gebracht. Nach Äquilibration wurden pro Well 1 µg des zu transfizierenden Vektors in 100 µl OptiMEM verdünnt und 4 µl Fugene zugegeben. Die einzelnen Komponenten wurden anschließend vorsichtig miteinander vermischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Inkubation wurden je Well 100 µl der Transfektionsmischung vorsichtig auf die Zellen aufgetropft. Nach 6 h Inkubation bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde das Kulturmedium der Zellen ausgetauscht, um Reste der Transfektionslösung zu entfernen. Es erfolgte eine weitere Kultivierung der Zellen bis zur Messung am folgenden Tag.

### 3.7 Transwell-Migration

Zur Untersuchung der Migration von Zellen wurde ein Transwell-Migrations-Assay mit stabilen 1205Lu Zelllinien durchgeführt. Hierfür wurden 1205Lu zunächst für drei Tage kultiviert und das verwendete Medium anschließend filtriert, um übrige Zellen und Zelldebris zu entfernen. Aufgrund der während der Kultivierung abgegebenen Stoffe in das Medium, konnte dieses zur Stimulation der Zellmigration eingesetzt werden. In einer 24-Well Platte wurde je 1 ml dieses vorinkubierten Mediums pro Well vorgelegt und die Migrationsinserts darin prääquilibriert. Die stabilen Zelllinien wurden gezählt und 200.000 Zellen in 150 µl frischem Medium in den oberen Teil des Migrationsinserts pipettiert. Die Migration der Zellen durch die Membran der Inserts in Richtung des unteren Kompartimentes konnte anschließend während einer Inkubation von 48 h bei 37° C stattfinden.

Um den Anteil an migrierten Zellen zu bestimmen, wurde das Medium zunächst aus dem unteren Kompartiment abgesaugt, gegen frisches Medium mit 1 µM Calcein ausgetauscht und für 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert. Hierdurch wurden sämtliche Zellen, die entweder an der Membran oder bereits am Boden des Wells hafteten, mit dem fluoreszierenden Farbstoff Calcein beladen. Anschließend wurde das Medium sowohl aus dem unteren als auch aus dem oberen Kompartiment entfernt und Well und Insert mit PBS gewaschen. Um die migrierten Zellen von der Membranunterseite und dem Boden des Wells abzulösen, wurden 800 µl Accutase in jedes Well gegeben, das Insert wieder eingesetzt und bei 37° C für 10 min inkubiert. Die Messung der Fluoreszenzintensität der in Accutase suspendierten Zellen erfolgte im Plate Reader, nach Abklopfen der Zellen und Herausnehmen der Inserts aus den einzelnen Wells.

Um den Einfluss von Antioxidantien und Prooxidantien auf die Migration zu untersuchen, wurden die Zellen während der Inkubation mit den Wirkstoffen N-Acetylcystein (NAC) und Trolox oder Buthioninsulfoximin (BSO) behandelt. NAC wirkt sowohl direkt als auch indirekt antioxidativ. Zum einen besitzt NAC eine SH-Gruppe, weshalb es direkt mit Oxidantien interagieren kann und sich

durch Oxidation eine Disulfidbrücke zwischen zwei NAC-Molekülen bildet. Zum anderen fördert NAC die zelluläre Produktion von Glutathion, da es durch N-Deacetylierung zu Cystein umgewandelt wird, einem direkten Vorläufermolekül (Gillissen & Nowak, 1998). Auch Trolox besitzt antioxidative Eigenschaften, da es ein Analog von Vitamin E ist. Dieses kann freie Elektronen abfangen und bildet selber ein mesomeriestabilisiertes und somit reaktionsträges Radikal (Cort et al, 1975). Im Gegensatz zu NAC und Trolox wirkt BSO prooxidativ. Es inhibiert die Glutamatcysteinligase, was zu einem Absinken der Level an antioxidativem Glutathion in der Zelle führt (OW Griffith, 1979). Die jeweiligen Substanzen wurden sowohl dem konditionierten Medium im unteren Kompartiment, als auch dem frischen Medium im oberen Kompartiment in folgenden Konzentrationen zugefügt: NAC 200  $\mu\text{M}$ , Trolox 20  $\mu\text{M}$ , BSO 1 mM. Die Migration wurde wie zuvor beschrieben nach 48-stündiger Inkubation gemessen.

## **3.8 Imaging**

### **3.8.1 Fura-2AM basiertes Kalzium-Imaging**

Kalziumkonzentrationen im Zytosol einzelner Zellen können mit Hilfe des ratiometrischen Farbstoffs Fura2-AM bestimmt werden. Durch die Bindung an Acetoxymethylester (AM) kann die Ladung des Farbstoffs überdeckt werden, was eine passive Diffusion durch die Zellmembran ins Innere der Zelle ermöglicht. Im Zytosol wird die AM-Gruppe durch endogene Esterasen abgespalten und die geladenen Gruppen verhindern ein Austreten des Farbstoffs durch die Membran. Fura-2AM ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der  $\text{Ca}^{2+}$  bindet und daraufhin seine Fluoreszenzeigenschaften verändert. Das Anregungsmaximum von ungebundenem Fura liegt bei 380 nm, während es sich nach Kalzium-Bindung zu 340 nm verschiebt. Unabhängig von der Bindung an Kalzium ist die Emission von Fura-2AM bei einer Wellenlänge von 510 nm maximal. Diese Eigenschaft bestimmt die ratiometrische Eigenschaft des Indikators und ermöglicht eine vergleichbare Bestimmung von intrazellulärem Kalzium trotz ungleichmäßiger Beladung der Zellen mit dem Farbstoff oder Ausbleichen über die Dauer der Messung.

Zur Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentrationen in WM3734 Zellen wurden diese am Tag vor der Messung mit einer Dichte von  $2,7 \times 10^5$  Zellen / Coverslip ausgesät. Die Beladung mit dem Fluoreszenzfarbstoff erfolgte in Medium mit 1  $\mu\text{M}$  Fura-2AM für 30 min bei Raumtemperatur unter Schütteln. Anschließend wurde das Coverslip in eine Imaging-Kammer mit angeschlossenem Perfusionssystem eingebaut und die Zellen direkt mit Ringerlösung umspült. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte mit Hilfe eines Olympus IX70 Mikroskops mit Xenon-Lampe (Polychome V Monochromator) bei 200-facher Vergrößerung und der Till Vision Software.

### **3.8.2 Sensor-basiertes Imaging mit genetisch kodierten Fluoreszenzindikatoren**

Verglichen mit Farbstoff-basierten Indikatoren wie Fura-2-AM bieten genetisch kodierte Sensoren mehrere Vorteile. Durch spezifische Zielsequenzen können sie gezielt in subzellulären Kompartimenten und Organellen exprimiert werden und führen so zu einer räumlich besseren Auflösung von

Signalen. Auch können sie an Proteine gebunden werden, was eine Untersuchung von subzellulären Mikrodomänen erlaubt. Weiterhin stellen genetisch kodierte Sensoren eine Möglichkeit für die Untersuchung von Signalen in *in vivo* Systemen dar.

Bei genetisch kodierten Sensoren können je nach Aufbau verschiedene Typen von Sensoren unterschieden werden. So gibt es Sensoren, die auf Basis von Aequorin, einem  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiven Protein, durch die Messung ihrer Lumineszenz Rückschlüsse auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle bzw. einzelnen Organellen ermöglichen. Da keine Belichtung zur Anregung verwendet werden muss, sind Messungen frei von Autofluoreszenz und Phototoxizität. Allerdings ist es aufgrund der niedrigen Emissionsrate schwierig eine subzelluläre Auflösung zu erreichen. Auch können Messungen nur über eine begrenzte Dauer durchgeführt werden, da die Lumineszenz irreversibel ist.

Die häufiger verwendeten Arten von Sensoren, die auch in dieser Arbeit eingesetzt wurden (siehe Tabelle 18) basieren auf Fluoreszenzproteinen. Hierbei kann zwischen zwei Typen von Sensoren unterschieden werden: Sensoren mit einem einzelnen Fluoreszenzprotein und oft FRET-basierten oder ratiometrischen Sensoren mit zwei Fluoreszenzproteinen. Sensoren, die nur ein einzelnes Fluoreszenzproteinen beinhalten, bestehen oft aus einem zirkulär permutierten Fluoreszenzprotein und einem responsiven Element, das der Bindung des zu untersuchenden Ions / Moleküls dient. Die Bindung des responsiven Elements führt zu einer Konformationsänderung des Fluoreszenzproteins, wodurch es zu einer Änderung in der Intensität der Fluoreszenz kommt. Vorteile dieser sogenannten Single-Fluoreszenzprotein-Sensoren sind sowohl der hohe dynamische Bereich als auch das kleine Spektrum der Anregungs- und Emissionswellenlänge, was eine Kombination mit anderen Fluoreszenzproteinen leicht möglich macht. Bis auf wenige Ausnahmen (Nagai et al, 2001; Rodriguez-Garcia et al, 2014; Wu et al, 2014; Zhao et al, 2011) sind mittels dieser Art von Sensoren allerdings nur intensimetrische Messungen möglich.

Der zweite Typ fluoreszenzbasierter Sensoren besitzt zwei unterschiedliche Fluoreszenzproteine. Durch diese ist eine FRET-basierte Messung möglich. Beim Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET) werden Teile der Elektronenanregungsenergie eines Donor-Fluorophors strahlungslos durch die Interaktion von Dipolen auf ein benachbartes Akzeptor-Fluorophor übertragen, wodurch dieses angeregt wird und selber Licht emittiert (Förster, 1946). Um diesen Transfer von Energie zu ermöglichen, müssen verschiedene Bedingungen erfüllt sein. So muss das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors eine ausreichende Überlappung aufweisen und die Fluoreszenz des Donormoleküls eine ausreichende Lebensdauer haben, um FRET zu ermöglichen (Syed Arshad Hussain, 2015). Weiterhin ist die Distanz zwischen Donor und Akzeptor von wesentlicher Bedeutung, da eine Energieübertragung nur bis zu einer Entfernung von 100 Å erfolgen kann. Diese Faktoren werden in den Sensoren genutzt, indem die beiden Fluoreszenzproteine über ein responsives Element miteinander verbunden sind. Die Bindung des zu untersuchenden Moleküls an das responsive Element führt zu einer Konformationsänderung des Sensors und somit zu einer messbaren Veränderung der FRET-Effizienz. Da FRET zu einer Verringerung in der Fluoreszenz des Donor-Fluorophors und gleichzeitig zu einem Fluoreszenzanstieg des Akzeptors führt, ist es möglich die beiden Werte ratiometrisch miteinander zu verrechnen. Ein Vorteil ratiometrischer Sensoren ist, dass sie quantitativer und weniger anfällig für Artefakte wie Ausbleichen oder variable Expressionsstärke des Sensors sind. Allerdings ergibt sich bei Sensoren mit zwei Fluoreszenzproteinen

auch das Problem, dass die Möglichkeiten weitere Fluorophore in die Messung zu integrieren sehr begrenzt ist, da bereits ein größerer Wellenlängenbereich besetzt ist.

**Tabelle 18: In der Arbeit verwendete genetisch kodierte Imaging-Sensoren**, Angabe der Spezifität, ihrer Lokalisation in der Zelle, des Sensortyps, des enthaltenen Fluorophors und den entsprechenden Anregungs- (Exc) und Emissionswellenlängen (Emm); FP = Fluoreszenzprotein

Sensor	Messung von	Lokalisation	Typ	Fluorophor	Exc	Emm
HyPer-3 (Bilan et al, 2013)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Zytosol	Single-FP (ratio-metrisch)	cpYFP	420 nm/ 500 nm	516 nm
R-GECO1.2 (Wu et al, 2013)	Kalzium (K <sub>d</sub> 1,2 µM)	Zytosol	Single-FP (intensio-metrisch)	cpmApple	568 nm	592 nm
4mtD3cpv (Palmer et al, 2006)	Kalzium (K <sub>d</sub> 0,6 µM)	Mitochondrien	Zwei-FP FRET (ratio-metrisch)	eCFP, cp173Venus	430 nm	475 nm/ 528 nm

### 3.8.3 Genetisch kodierte Kalziumsensoren

FRET-basierte genetisch kodierte Fluoreszenzindikatoren für Ca<sup>2+</sup> werden häufig auch als Cameleons bezeichnet. Die ersten Sensoren dieser Art, die auf GFP-Varianten und Calmodulin basierten, wurden von Miyawaki *et al.* entwickelt (Miyawaki et al, 1999; Miyawaki et al, 1997). Ihr grundlegender Aufbau besteht aus zwei GFP-Varianten, von der eine Variante eine niedrige und die andere Variante eine höhere Anregungs- und Emissionswellenlänge besitzt und die über Calmodulin, einen Glycylglyin-Linker und das Calmodulin-Bindepeptid M13 der leichten Myosinketten-Kinase verbunden sind (Miyawaki et al, 1997). Über die beiden letzten Jahrzehnte wurden diese Cameleons immer weiter entwickelt, weshalb mittlerweile viele Varianten existieren, die anstelle von GFP andere Fluoreszenzprotein-Paare als FRET-Donor und -Akzeptor enthalten. Hierbei ist die Gruppe der gelben Cameleons auf der Basis von CFP und YFP und deren Varianten als Fluoreszenzpaar zu erwähnen (Miyawaki et al, 2013; Nagai et al, 2004), sowie verschiedene in das Rotspektrum verschobene Cameleons (Mizuno et al, 2001; Waldeck-Weiermair et al, 2012; Waldeck-Weiermair et al, 2015). Ein Problem der ersten Sensoren war eine ungewollte Interaktion mit zellulären Proteinen, wie z.B. endogenem Calmodulin. Dies konnte jedoch durch Modifizierungen der Calmodulin-Peptid-Paare verbessert werden (Palmer et al, 2006).

Eine Änderung in der FRET-Effizienz der Cameleon-Sensoren ist durch die Bindung von Kalzium und einer darauf folgenden Strukturänderung des Sensors bedingt. Freie Ca<sup>2+</sup>-Ionen binden an das Calmodulin des Sensors, was wiederum zu einer Bindung von diesem an sein Bindepeptid M13 führt. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins, was eine Annäherung der beiden Fluorophore zur Folge hat und einen Energietransfer bei Anregung des Donors auf den Akzeptor ermöglicht.

Wie bereits erwähnt, ist ein großer Vorteil genetisch kodierter Sensoren die Möglichkeit diese zielgerichtet in Organellen exprimieren zu können. Speziell an Sensoren, mit denen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen in bestimmten Organellen gemessen werden sollen, werden verschiedene Ansprü-

che gestellt (Suzuki et al, 2016). So müssen diese Sensoren eine spezifische Lokalisation im Zielorganell haben und dort eine starke Fluoreszenz und schnelle Kinetik aufweisen, um eine Aufzeichnung der räumlichen und zeitlichen Dynamik gewährleisten zu können. Auch müssen diese Sensoren eine geeignete Affinität für Kalziumionen aufweisen, da die Konzentration abhängig vom untersuchten Organell vom nanomolaren bis in den millimolaren Bereich reichen kann. Ein weiterer Faktor ist eine geringe Beeinflussbarkeit durch Organell-spezifische Faktoren, wie z.B. einen sauren oder basischen pH-Wert. Zudem muss sichergestellt werden, dass keine Interferenz mit anderen, gleichzeitig eingesetzten Fluoreszenzmolekülen vorliegt und durch den Sensor keine toxischen Effekte für die Zellen bestehen.

Ein in dieser Arbeit sehr intensiv genutzter Sensor für die Messung von mitochondrialem  $\text{Ca}^{2+}$  ist der Sensor 4mtD3cpv. Dieser Sensor wurde durch Palmer *et al.* entwickelt und gehört zur Gruppe der gelben Cameleons mit einem eCFP und einem zirkulär permutierten Venus173 (cpv) Fluorophor, welche über ein modifiziertes Calmodulin und ein M13-Peptid verbunden sind (Palmer & Tsien, 2006). Durch das modifizierte Calmodulin D3 besitzt der Sensor eine  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität von  $0,6 \mu\text{M}$ . Für einen Transport des Proteins in die Mitochondrien ist eine mitochondriale Zielsequenz einer Untereinheit der Cytochrom-C-Oxidase verantwortlich (Poburko et al, 2009).

### **3.8.4 Messungen mit genetisch kodierte Sensoren**

#### *3.8.4.1 Einzelzellmessungen*

Die zu untersuchenden Zellen wurden 18-22 h vor Messung mit dem entsprechenden Sensor mittels Fugene transfiziert (siehe 3.6.2). Die Messung erfolgte an einem Axio Observer.Z1 (Zeiss), ausgestattet mit einem 40x Fluar Ölobjektiv (N.A. 1,3), den benötigten Filtersets (siehe Tabelle 6), einer LED Colibri und einer Evolve 512 x 512 EM-CCD Kamera. Die zu messenden Zellen, die auf Coverslips kultiviert wurden, wurden in ein Perfusionskammersystem eingebaut, mit Ringerlösung gewaschen und anschließend mit der ersten Lösung der Messung umspült. Die Bilderfassung auf allen Kanälen erfolgte, je nach Sensor und Versuchsdesign, alle 3 / 5 / 10 sec. Die Analyse der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der Axio Vision Software (Zeiss). Dabei wurde zur Berechnung der Fluoreszenz- bzw. FRET Ratio zunächst die Hintergrundfluoreszenz abgezogen. Die weitere Auswertung der Daten wurde in Excel vorgenommen. Eine Aussage über die statistische Signifikanz wurde mit Hilfe eines zweiseitigen ungepaarten T-Tests getroffen.

#### *3.8.4.2 Well-Messungen im Plate Reader*

Zellen wurden wie unter Punkt 3.6.1 beschrieben mit dem Sensor R-GECO1.2 24 h vor der Messung transfiziert. Nach 6 h Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit Accutase abgelöst, in frisches Kulturmedium aufgenommen und mit einer Dichte von 10000 Zellen / Well in einer 96 Well-Platte in  $200 \mu\text{l}$  Kulturmedium ausgesät, so dass sie über Nacht adhären konnten. Vor der Messung wurde das Kulturmedium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und in  $100 \mu\text{l}$  1 mM Ringer-Kalziumlösung aufgenommen. Die Messung erfolgte mit Hilfe des Tecan Plate Reader M200, wobei die Fluoreszenz des R-GECO1.2 Kalziumsensors mit 550 nm angeregt und die Emission bei 610 nm detektiert wurde. Nach Aufzeichnung der Basislinie über fünf Zyklen wurde den Zellen un-

terschiedliche Stimulanzen (siehe Tabelle 19) zugegeben und die Fluoreszenz über weitere 105 Zyklen aufgenommen. Die Auswertung der Daten erfolgte mittels Excel.

**Tabelle 19: Eingesetzte Stimulanzen mit ihrer Endkonzentration im Well**

<b>Substanz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>Substanz</b>	<b>Endkonzentration</b>
Kontrolle (Ringer Puffer)	-	$\alpha$ -MSH	10 nM
ATP	50 $\mu$ M	Endothelin-1	10 nM
Histamin	100 $\mu$ M	Insulin	1,75 $\mu$ g/ml
FMLF	10 $\mu$ M	Thapsigargin	1 $\mu$ M
ACTH	10 nM		

### 3.9 FACS

Zur Untersuchung des Zellzyklus wurde eine Propidiumiodid-Färbung der Zellen vorgenommen und mit Hilfe eines Durchflusszytometers analysiert. Propidiumiodid (PI) interkaliert in die DNA der Zelle, wodurch sich sein Absorptions- und Emissionsmaximum verschiebt. Diese Fluoreszenz kann mittels FACS detektiert werden, wobei die Stärke der Fluoreszenz Rückschlüsse auf die Menge der in der Zelle enthaltenen DNA und somit auf die Phase des Zellzyklus ermöglicht. So enthalten Zellen während der S-Phase einen höheren Anteil an DNA als in der G1-Phase. In der G2-Phase, in der die DNA verdoppelt vorliegt, ist dementsprechend auch die Fluoreszenzintensität im Vergleich zur G1-Phase doppelt so hoch.

Die zu untersuchenden Zellen wurden für unterschiedliche Zeitspannen (4 h, 6 h, 24 h, 72 h, 96 h, 120 h) unter Standardbedingungen bzw. unter Hypoxie inkubiert. Da lebende Zellen den Farbstoff aktiv wieder herauspumpen, mussten die Zellen vor der Färbung mit PI fixiert werden. Hierzu wurden die Zellen abgelöst, bei 4° C für 5 min abzentrifugiert und mit PBS gewaschen. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml kaltem 70 % Ethanol in PBS aufgenommen und über Nacht bei 4° C fixiert. Anschließend folgte ein weiterer Waschschrift mit PBS. Zur Färbung der Zellen mit Propidiumiodid wurde das Pellet in einem Gesamtvolumen von 250  $\mu$ l PBS-basierter Färbelösung resuspendiert (20  $\mu$ g PI + 200  $\mu$ g RNase pro 1 ml PBS).

Die Analyse der Fluoreszenz erfolgte über eine durchflusszytometrische Messung durchgeführt mit Hilfe von Michaela Perego. Hierbei wurden die Zellen zunächst über den *Forward*- und *Sideward-Scatter* betrachtet und Zelltrümmer und Dupletten ausgeschlossen. Die verbleibenden Zellen wurden nach ihrer Fluoreszenzintensität analysiert und entsprechend in G1-, S-, G2-M-Phase oder apoptotische Zellen eingeteilt.

### 3.10 Proteinbiochemie

#### 3.10.1 Probenherstellung

Zellen, deren Proteinexpression mittels Western Blot untersucht werden sollten, wurden nach 24 h Kultivierung geerntet. Um eine Degradierung der Proteine zu vermeiden wurden alle Schritte auf

Eis durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen, um alle Rückstände des Mediums und Zelltrümmer zu entfernen. In 250 µl PBS mit 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> wurden die Zellen anschließend mit einem Zellschaber abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Bei 4° C wurden die Zellen bei 16000 x g für 4 min pelletiert. Das so erhaltene Pellet konnte bei -80° C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

Zur Lyse der Zellen wurden diese in Lysepuffer resuspendiert, für 20 min auf Eis inkubiert und im Abstand von wenigen Minuten gevortext. In einer anschließenden Zentrifugation für 10 min bei 16000 x g und 4° C wurden die verbleibenden Zellreste von den Proteinlysaten getrennt. Die erhaltenen Lysate wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und ihr Proteingehalt in einem nächsten Schritt bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung der Lysate wurden diese bei -80° C gelagert.

### 3.10.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde entweder mit Hilfe des Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher) oder mit dem Quick Start Bradford Protein Assay Kit (Biorad) durchgeführt. Für beide Kits wurde das Protokoll nach Herstellerangaben befolgt.

Der BCA-Assay basiert auf der Umsetzung zweiwertiger Kupferionen zu einwertigen Kupferionen durch Proteine. Diese einwertigen Ionen reagieren mit Bicinchoninsäure, wodurch eine blauviolette Farbe entsteht, die kolorimetrisch nachgewiesen werden kann. In einer ersten Reaktion bilden Kupferionen zusammen mit Proteinen in einer alkalischen Umgebung einen hellblauen Komplex, wobei die zweiwertigen Kupferionen zu einwertigen Ionen reduziert werden. In einem zweiten Schritt reagieren die einwertigen Kupferionen mit Bicinchoninsäure (BCA), wobei ein blauviolettes Produkt entsteht. Dieser entstandene Kupfer-BCA-Komplex zeigt eine Absorption bei 562 nm, die proportional zur Proteinkonzentration ansteigt.

Beim Bradford-Assay macht man sich die Eigenschaften des Farbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau G250 zunutze. Dieser besitzt im ungebundenen Zustand ein Absorptionsmaximum bei 470 nm, das sich bei der Komplexbildung mit Proteinen auf 595 nm verschiebt. Durch die Zunahme der Absorption sind somit Rückschlüsse auf die Proteinkonzentration der Probe möglich.

Für die weitere Verwendung in einem Western Blot wurden Aliquots des Proteinlysates mit 40 µg bzw. 75 µg Gesamtprotein in 20 µl mit SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95° C oder für 15 min bei 65° C denaturiert. Die so behandelten Proben wurden bis zum weiteren Gebrauch bei -20° C gelagert und vor dem Auftragen wieder auf 37° C erwärmt.

### 3.10.3 Western Blot

Die Proteine der vorbereiteten Lysate wurden mit Hilfe einer SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamid gel electrophoresis*) ihrer Größe nach aufgetrennt. Dabei wandern die Proteine in einer diskontinuierlichen Polyacrylamidmatrix (aufgeteilt in Sammel- und Trenngel mit 5 % bzw. 10 % Polyacrylamid) durch Anlegen einer elektrischen Spannung entsprechend ihrer Größe durch

das Gel in Richtung Anode. Die Eigenladung der Proteine spielt dabei keine Rolle, da diese durch die Beladung mit SDS überdeckt wird und alle Proteine eine negative Ladung zeigen.

Die Proben wurden in die einzelnen Kammern des Gels aufgetragen und bei einer Spannung von 80 mV im Sammelgel und 150 mV im Trenngel aufgetrennt, bis die Lauffront das untere Ende des Gels erreichte.

Die Zusammensetzungen von Trenn- und Sammelgel war wie folgt:

	<b>Trenngel (10 %)</b>	<b>Sammelgel (5 %)</b>
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2,50 ml	3,08 ml
<b>Acrylamid</b>	4,91 ml	630 µl
<b>Sammel- bzw. Trenngelpuffer</b>	2,50 ml	1,25 ml
<b>APS</b>	75 µl	37,5 µl
<b>TEMED</b>	15 µl	7,5 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>10 ml</b>	<b>5 ml</b>

Nach der Auftrennung im Polyacrylamidgel konnten die Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran übertragen werden. Dies geschah durch Anlegen einer horizontalen Spannung von 350 mA für 90 min bei 4° C, bei der die durch das SDS negativ geladenen Proteine aus dem Gel auf die Membran wandern und an dieser aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften bleiben. Unspezifische Bindungsstellen der Membran wurden durch Inkubation in 5 % Magermilch in TBST-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur blockiert. Zur immunologischen Detektion des gewünschten Proteins wurde die Membran anschließend bei 4° C über Nacht mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Durch dreimaliges Waschen der Membran für je 10 min in TBST-Puffer wurde überschüssiger, nicht gebundener Primärantikörper entfernt. Im nächsten Schritt erfolgte die Bindung eines Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers an den Primärantikörper durch Inkubation der Membran mit dem Sekundärantikörper in 5 % Magermilch-TBST-Lösung für 1 h. Auch hier wurde der nicht gebundenen Sekundärantikörper anschließend durch dreimaliges Waschen für 10 min in TBST-Puffer bzw. TBS-Puffer im letzten Waschschrift entfernt. Nach Inkubation für 1-5 min mit ECL-Entwicklerlösung konnten die Proteinbanden mit Hilfe des ChemiDoc XRS-Systems detektiert werden.

### **3.11 Reverse Phase Protein Array (RPPA)**

Der „Reverse Phase Protein Array“ (RPPA) dient der quantitativen Analyse von Proteinprofilen in hohem Durchsatz. Hierbei werden die Proben in Form von Zell- und Gewebelysaten oder Körperflüssigkeiten auf einem Träger immobilisiert und mittels spezifischer Antikörper detektiert. Aufgrund der sehr kleinen und automatisiert aufgetragenen Spots können auf einem Träger bis zu 500 verschiedene Proben in mehrfachen technischen Replikaten analysiert werden. Da trotzdem nur sehr geringe Mengen an Protein benötigt werden, ist es möglich eine hohe Anzahl an Trägern mit identischem Probenmaterial zu spotten und so die Expression von bis zu 300 unterschiedlichen Proteinen gleichzeitig zu untersuchen. Die Träger mit Probenmaterial werden je mit einem spezifi-

schen Antikörper inkubiert und die Bindung dieses Antikörpers über einen Sekundärantikörper nachgewiesen (MD\_Anderson\_RPPA\_Core\_Facility, 2017; Paweletz et al, 2001).

Für die Herstellung von Proben zur RPPA-Analyse wurden je  $4 \times 10^5$  der zu untersuchenden Zellen in Kulturschalen ausgesät und für 24 h kultiviert. Um die ungewollte Degradation von Proteinen zu verhindern, wurde die Ernte der Zellen komplett auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 250  $\mu$ l PBS mit 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  mit Hilfe eines Zellschabers abgeschabt. Nach Zentrifugation für 4 min bei 4° C und 16000 x g wurde das erhaltene Zellpellet bei -80° C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die Lyse und nachfolgende Konzentrationsbestimmung des Proteingehaltes der Proben wurde wie in Punkt 3.10.1 und 3.10.2 beschrieben durchgeführt. Zur weiteren Verarbeitung der Proben wurden diese auf eine Gesamtproteinkonzentration von 1  $\mu$ g/ $\mu$ l eingestellt, mit 4x SDS-Probenpuffer ohne Bromphenolblau versetzt und für 5 min bei 95° C denaturiert. Die so vorbereiteten Proben wurden für die RPPA-Analyse von Gao Zhang an das MD Anderson Krebsforschungszentrum der Universität von Texas gesendet und dort durch G.B. Mills und Y. Lu weiter bearbeitet. Die erhaltenen Datensätze enthielten auf Proteinladung normalisierte und linearisierte Werte. Um Unterschied in Expressionsmustern zwischen den Kontrollzellen (pLKO.1) und Zellen mit MCU Knockdown (shMCU#1 und #2) zu erkennen, wurden die Werte der Knockdownzellen auf die zugehörige Kontrolle normiert.

### **3.12 *In vivo* Tumorwachstum und Migration**

#### **3.12.1 Induktion von Primärtumoren**

Sämtliche *in vivo* Experimente wurden von Adina Vultur und Andrea Waters am Wistar Institute Philadelphia durchgeführt. Dabei wurden Mäuse in drei Gruppen zu je 10 Mäusen unterteilt. Diesen wurden je 400.000 von einer der stabilen 1205Lu Melanomzelllinien (pLKO.1, shMCU#1 oder shMCU#2) injiziert. Sieben Tage nach Injektion der Zellen wurde mit der Messungen der entstandenen Primärtumore begonnen. Nach 36 Tagen Tumorwachstum wurde eine finale Messung des Tumors durchgeführt und den Mäusen Primärtumor, Leber, Lunge, Nieren und Gehirn zur weiteren Untersuchung entnommen.

#### **3.12.2 Gewebeschnitte und -färbung zur Untersuchung der Metastasierung *in vivo***

In den durchgeführten *in vivo* Experimenten sollte nicht nur das Tumorwachstum untersucht werden, sondern auch die Stärke der Metastasierung der jeweiligen Melanomzelllinien. Hierfür wurde den Versuchstieren zusätzlich zum Primärtumor auch Lunge, Leber, Nieren und Gehirn entnommen, um diese auf Metastasen untersuchen zu können. Die einzelnen Organe wurden in der *Core facility* des Wistar Instituts fixiert und in Paraffin eingebettet. Aus den Paraffinblöcken wurden von Alexandra Stark am Institut für Dermatologie des Universitätsklinikums des Saarlandes Gewebeschnitte zur Mikroskopie angefertigt und gefärbt.

Um Gewebestrukturen im Mikroskop unterscheiden zu können, wurden die Gewebeschnitte mit einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung angefärbt. Mit Hilfe von Hämatoxylin können alle sauren und basophilen Strukturen der Zelle blau angefärbt werden, wie der Zellkern und das raue ER. Eine Gegenfärbung in rot erfolgt über Eosin, das alle basischen Strukturen in der Zelle färbt. Dazu gehören die Mitochondrien, das glatte ER, Kollagen, Keratin und Proteine des Zellplasmas.

Zunächst wurden die Schnitte entparaffiniert und wieder in ein wässriges Milieu überführt. Hierfür wurden sie in einem Färbeschiffchen 4x 1 min in Xylol, anschließend 3x 1 min in 100 % Isopropanol und danach für 3 min in 70 % Isopropanol eingetaucht. Für die Hämatoxylin-Färbung wurde eine Hämalaun-Lösung im Verhältnis 1:10 in Wasser angesetzt und die Schnitte 6-10x mal in diese eingetaucht. Anschließendes Spülen der Schnitte mit Leitungswasser führte zu einer Erhöhung des pH-Wertes, was einen Farbumschlag der Hämatoxylin-Färbung von rötlich-braun zu blau-violett zur Folge hat. Um den Schnitten erneut das Wasser zu entziehen, wurden diese erneut in 100 % Isopropanol und Xylol eingetaucht. Der fertig angefärbte Schnitt konnte daraufhin mit Entellan eingedeckt und damit konserviert werden.



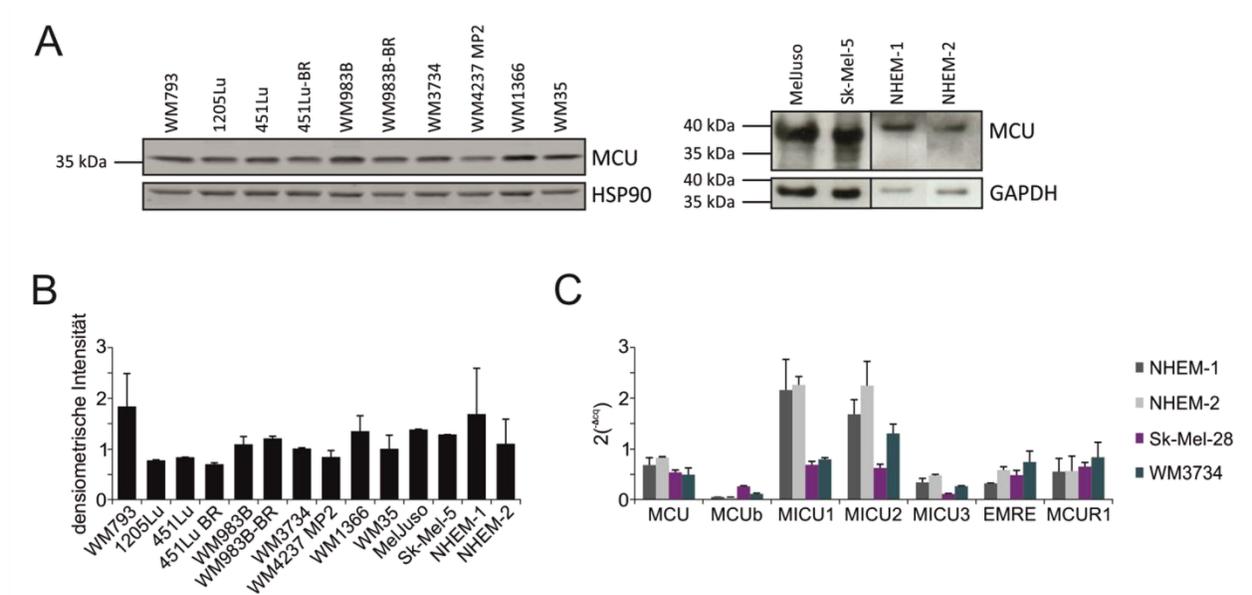
## 4. Ergebnisse

### 4.1 Nachweis des mitochondrialen Kalzium Uniporters in Melanomzelllinien

Der mitochondriale Kalzium Uniporter sowie seine verschiedenen Regulatoren, MICU1, MICU2, MCUB, EMRE und MCUR1 sind ubiquitär in verschiedenen Geweben exprimiert. MCU, das die Kanalpore bildet, ist zusammen mit seinem Homolog MCUB und EMRE in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert. Die Regulatoren MICU1 und MICU2 befinden sich dagegen im Intermembranraum der Mitochondrien, wo sie durch Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  umgebende Kalziumkonzentrationen wahrnehmen können und die Öffnung bzw. Inhibition des Kanals steuern. Da in unterschiedlichen Geweben die Expressionsstärke der Komponenten des Uniplex variiert (HumanProteinAtlas, 2017), sollte zu Beginn des Projektes die Expression in Melanomzellen und Melanozyten auf mRNA-Ebene sowie auf Proteinebene untersucht werden. Zur Untersuchung der Expressionsstärke auf Proteinebene wurden Western Blots durchgeführt und der mitochondriale Kalzium Uniporter mithilfe eines spezifischen Antikörpers detektiert. Um einen Überblick über die MCU-Proteinlevel in verschiedenen Melanomzelllinien unterschiedlichen Ursprungs (Primärtumor, Lymphmetastase, ferne Metastase, Xenograft Melanomlinien) zu erhalten, wurde eine Auswahl von Wistar-Melanomlinien getestet. Weiterhin wurden MelJuso und Sk-Mel-5 Zellen als Standardmelanomlinien und primäre Melanozyten (NHEM-1 und NHEM-2) untersucht. Wie in Abbildung 3A zu erkennen ist, konnte für alle untersuchten Zellen eine Bande bei  $\sim 35\text{-}40$  kDa nachgewiesen werden, die der erwarteten Größe von MCU entspricht (De Stefani et al, 2011). Nach Quantifizierung der Ergebnisse (siehe Abbildung 3B) konnten für WM793 und WM1366 die höchsten Werte festgestellt werden. Diese beiden Linien stammen aus primären Melanomen, die als VGM (*vertical growth melanoma*) klassifiziert wurden, d.h. ein invasives Potential besitzen und zur Metastasierung fähig sind. Auch für die aus einem Primärtumor stammende Linie MelJuso zeigten sich höhere Expressionswerte. Die im Vergleich niedrigsten Expressionslevel waren in den Xenograft-Linien 1205Lu, 451Lu und WM4237 MP2 festzustellen. Xenograft-Linien zeichnen sich dadurch aus, dass humane Melanomzellen in ein Tier, meist in Mäuse, übertragen und anschließend wieder aus dem entstandenen Tumor des Tieres isoliert und als Zelllinie etabliert wurden. Mittlere Expressionslevel zeigten die aus Hirnmetastasen stammenden Linien WM983B und WM3734, die aus einer Lymphknotenmetastase stammende Linie Sk-Mel-5, sowie die Linie WM35, die aus einem Primärmelanom der radialen Wachstumsphase stammt. Allerdings waren die Unterschiede in den Expressionsleveln der einzelnen Zelllinien nicht signifikant. Proben von primären Melanozyten zeigten unterschiedliche Ergebnisse: NHEM-1 besaßen hohe Proteinlevel an MCU, wobei hier größere Schwankungen auftraten. NHEM-2 zeigten durchschnittlich mittlere Expressionslevel. Eine Resistenz gegenüber BRAF-Inhibitoren scheint die Expression von MCU nicht zu beeinflussen. Die BRAF-Inhibitoren resistente Linie 451Lu-BR zeigte gegenüber ihrer Ursprungslinie 451Lu tendenziell geringere MCU-Level, während die resistente Linie WM983B-BR etwas höhere Level als ihre Ursprungslinie WM983B aufwies.

Weitere Komponenten des Uniporter Komplexes wurden mittels quantitativer Real-time PCR auf ihre Expressionsstärke hin untersucht. Wie bereits auf Proteinebene nachgewiesen, wird MCU sowohl in Melanozyten als auch in Melanomzellen deutlich exprimiert. Die Expressionslevel der Regulatoren EMRE und MCUR1 zeigen keine größeren Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen. Die höchsten Mengen an mRNA ließen sich sowohl bei Melanozyten als auch bei Melanomzellen für die

beiden wichtigen Regulatoren MICU1 und MICU2 nachweisen. Interessanterweise zeigen hier die Melanozyten höhere mRNA-Level als die Melanomlinien Sk-Mel-28 und WM3734. Im Gegensatz dazu verhält es sich für MCUb umgekehrt. In gesunden Melanozyten ist kaum mRNA, die für MCUb kodiert, nachweisbar, während die untersuchten Melanomlinien eine Expression dieses dominant-negativen Regulators zeigten. Weiterhin bemerkenswert ist die Expression von MICU3 in beiden Zelltypen. Bisher wurde MICU3 in nur wenigen Geweben überhaupt beschrieben (Plovanich et al, 2013a). Auch Abfragen von Datenbanken ergeben eine hauptsächliche Expression von MICU3 in neuronalen Zellen (HumanProteinAtlas, 2017).

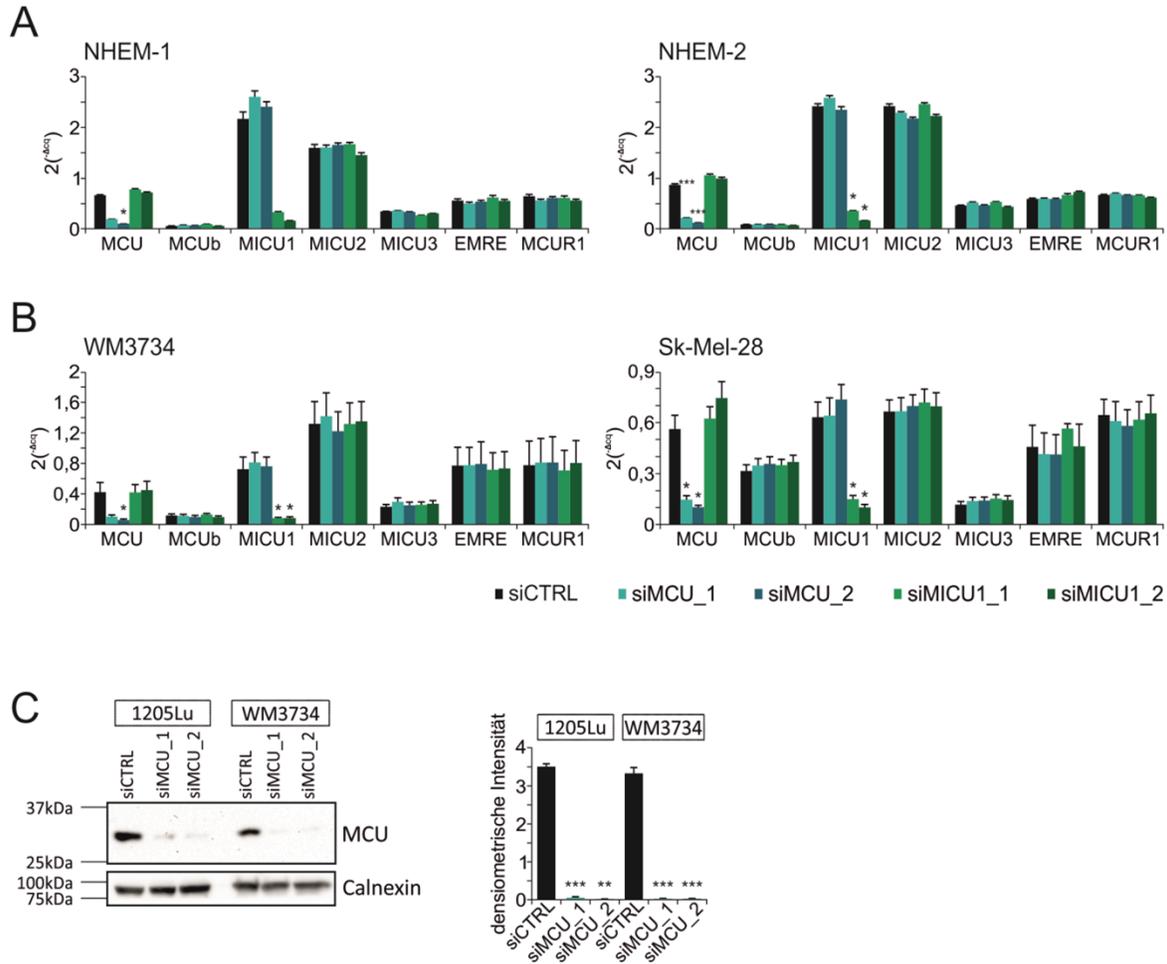


**Abbildung 3: Expression von MCU und seinen Regulatoren in Melanomzelllinien und primären Melanozyten; A-B:** Lysate verschiedener Melanomzelllinien (WM793, 1205Lu, 451Lu, 451Lu-BR, WM983B, WM983B-BR, WM3734, WM4237 MP2, WM1366, WM35, MelJuso, Sk-Mel-5) und primärer Melanozyten (NHEM-1, NHEM-2) wurde elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und die Expression von MCU mittels  $\alpha$ -MCU detektiert. **A:** Repräsentative Western Blots. **B:** Quantifizierung der Daten aus A durch densitometrische Bestimmung der Bandendichte und Normierung der Werte der MCU-Banden auf das zugleich detektierte Haushaltsgen Hsp90 bzw. GAPDH (Melanomlinien: n = 2; NHEM-1: n = 3; NHEM-2: n = 4). **C:** Der Nachweis der Expression der einzelnen Komponenten des Uniporter-Komplexes MCU, MCUb, MICU1, MICU2, MICU3, EMRE und MCUR1 erfolgte mittels qRT-PCR in primären Melanozyten (NHEM-1 und NHEM-2; n = 3) sowie in Sk-Mel-28 (n = 7) und WM3734 (n = 5) Melanomlinien. Eine Normierung der Daten erfolgte auf das Haushaltsgen TBP. *Experimentelle Durchführung der Western Blots (A): Alexandra Stark und Katharina Zimmermann; Experimentelle Durchführung der qRT-PCR (C): Alexandra Stark, Analyse: Katharina Zimmermann*

## 4.2 Herunterregulation von MCU in Melanozyten und Melanomzelllinien

### 4.2.1 Transiente Herunterregulation

Im Zuge dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwiefern durch MCU gesteuertes mitochondriales Kalzium einen Einfluss auf verschiedene Eigenschaften von Melanomzellen hat. Als grundlegende Methode sollte daher eine effiziente Herunterregulation von MCU bzw. seinem Regulator MICU1 erreicht werden. Für Experimente über kurze Zeiträume kommt dabei grundsätzlich eine transiente Herunterregulation auf Basis von siRNA in Frage.



**Abbildung 4: Transiente Herunterregulation von MCU und MICU1 durch siRNA; A-B:** Die relative mRNA-Menge als  $2^{(-\Delta\text{ctq})}$ -Wert von MCU, MICU1, MICU2, MICU3, EMRE und MCUR1 nach siRNA-vermittelter Herunterregulation von MCU oder MICU1 wurde durch qRT-PCR bestimmt. Die Zellen wurden 48-120 h nach Transfektion mit siRNA gegen MCU (siMCU\_1: hellblau, siMCU\_2: dunkelblau) oder MICU1 (siMICU1\_1: hellgrün, siMICU1\_2: dunkelgrün) bzw. Kontroll-siRNA (siCTRL: schwarz) geerntet und die enthaltene RNA isoliert. Die Daten wurden auf das gleichzeitig bestimmte Haushaltsgen TBP normiert. **A:** mRNA-Expressionslevel in NHEM-1 (links) und NHEM-2 (rechts) (n = 3); **B:** mRNA-Expressionslevel in WM3734 (links; n = 5) und Sk-Mel-28 (rechts; n = 4); **C:** Die Herunterregulation von MCU in 1205Lu und WM3734 Zellen wurde auf Proteinebene im Western Blot überprüft (n = 3). Die Proben zur Lysatherstellung wurden 72 h nach Transfektion der siRNA gegen MCU genommen. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot nach Detektion von MCU (links) und die quantitative Auswertung der relativen Proteinmenge im transienten Knockdown normiert auf die Ladekontrolle Calnexin (rechts). *Experimentelle Durchführung der qRT-PCRs A und B: Alexandra Stark, Auswertung: Katharina Zimmermann*

Zunächst wurde die siRNA-vermittelte Herunterregulation in beiden zur Verfügung stehenden Melanozytenlinien und zwei Melanomzelllinien (WM3734 und Sk-Mel-28) auf ihre Effizienz und mögliche *off-target* Effekte hin überprüft. Wie in Abbildung 4A erkennbar ist, zeigten die siRNAs MCU\_1 und MCU\_2 in beiden Melanozytenlinien eine deutliche Reduktion der MCU-mRNA, während die anderen Komponenten MCUb, MICU1, MICU2, MICU3, EMRE und MCUR1 in ihrer Expressionsstärke nicht signifikant beeinflusst wurden. Dabei war die Effizienz von siMCU\_2 mit einer Herunterregulation von 0,66 (NHEM-1) bzw. 0,87 (NHEM-2) auf 0,10 in NHEM-1 und 0,12 in NHEM-2 etwas besser als die der MCU\_1 siRNA mit 0,19 in NHEM-1 und 0,21 in NHEM-2. In Melanomzellen konnte ein

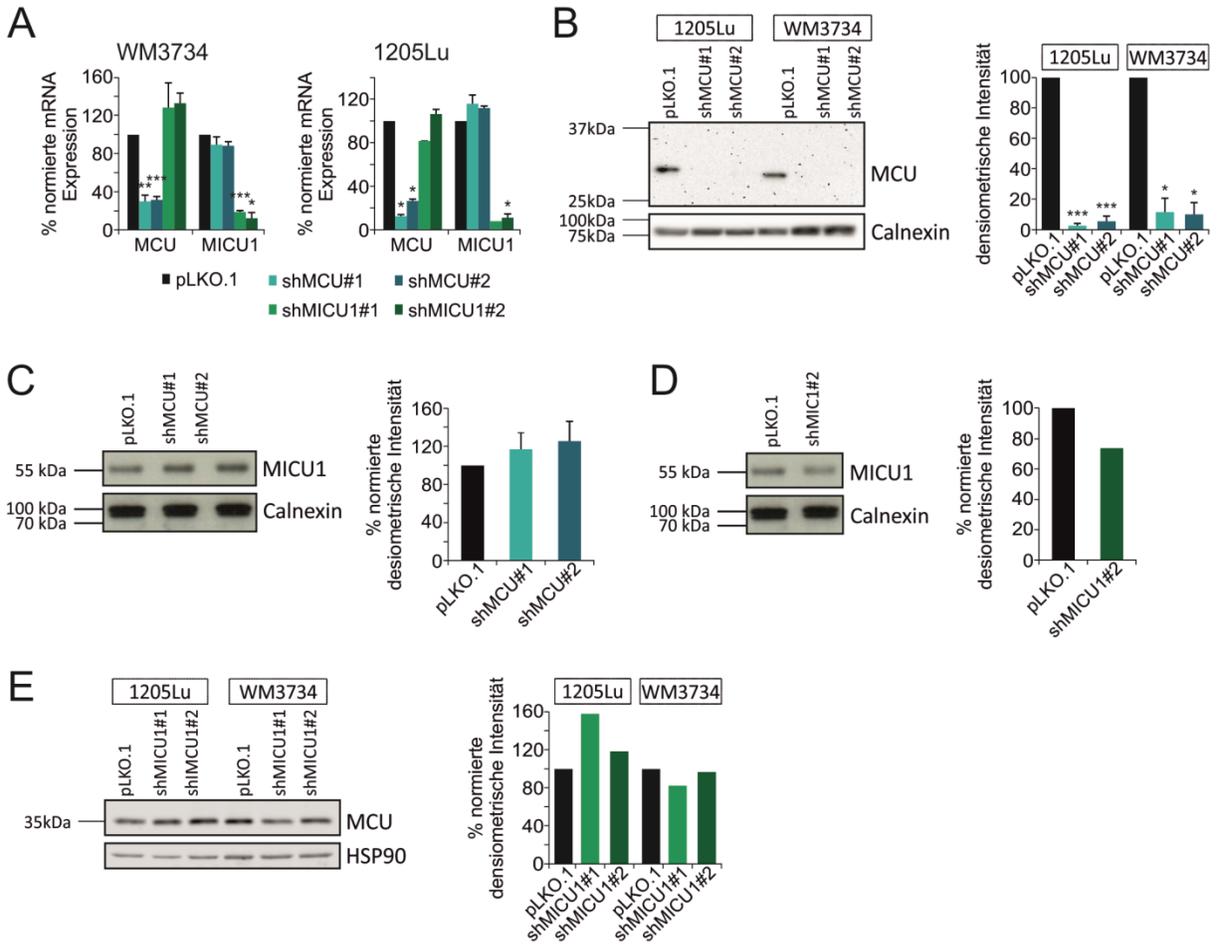
vergleichbares Ergebnis festgestellt werden (siehe Abbildung 4B). So reduzierte die siRNA MCU\_2 den mRNA Gehalt von 0,42 in WM3734 auf 0,06 und in Sk-Mel-28 von 0,56 auf 0,10 und die siRNA MCU\_1 auf 0,11 in WM3734 und 0,15 in Sk-Mel-28. Auch hier zeigte die siRNA einen spezifischen Effekt auf MCU, während die Expression der anderen untersuchten Komponenten weiterhin unverändert vorlag.

Außer MCU sollte auch sein Regulator MICU1 untersucht werden, weshalb die beiden siRNAs MICU1\_1 und MICU1\_2 in den bereits genannten Zelllinien getestet wurden. Auch hier zeigten beide siRNAs eine zufriedenstellende Effizienz und Spezifität, sowohl in Melanozyten als auch Melanomzellen (vgl. Abbildung 4A und B). Dabei führte MICU1\_1 zu einer Herunterregulation der MICU1-mRNA von 2,16 auf 0,33 in NHEM-1, von 2,41 auf 0,36 in NHEM-2, von 0,73 auf 0,09 in WM3734 und von 0,63 auf 0,15 in Sk-Mel-28. Eine etwas bessere Effizienz konnte für MICU1\_2 mit 0,16 in NHEM-1, 0,17 in NHEM-2, 0,09 in WM3734 und 0,10 in Sk-Mel-28 festgestellt werden.

Insgesamt zeigten die Sk-Mel-28 Zellen eine schlechtere Herunterregulation von MCU im Vergleich zu den WM3734 Zellen. Aus diesem Grund wurde in weiteren Versuchen auf diese Zelllinie verzichtet und stattdessen die Linie 1205Lu eingesetzt. Da eine Herunterregulation der mRNA noch nicht vollständig aussagekräftig über die wirkliche Reduktion des Proteins ist, sollte mittels Western Blot Verfahren auch die relative Proteinmenge in diesen beiden Zelllinien bestimmt werden. Auf Proteinebene konnte eine starke signifikante Reduktion von MCU sowohl in 1205Lu als auch in WM3734 72 h nach siRNA Transfektion nachgewiesen werden (siehe Abbildung 4C). Hierbei konnten keine deutlichen Unterschiede in der Effizienz zwischen den beiden verwendeten siRNAs MCU\_1 und MCU\_2 festgestellt werden. Für weitere Experimente wurden hauptsächlich die beiden Melanomlinien WM3734 und 1205Lu, sowie die beiden überprüften siRNAs gegen MCU bzw. MICU1 einzeln oder in Kombination miteinander eingesetzt.

#### **4.2.2 Stabile Herunterregulation**

Unmodifizierte siRNA ist für einen zuverlässigen Knockdown nur für einen Zeitraum von circa fünf bis maximal sieben Tagen, abhängig vom Zelltyp, nutzbar. Nach längeren Zeitspannen ist der größte Teil der siRNA bereits von der Zelle degradiert und es kann keine Herunterregulation der mRNA mehr stattfinden. Um Langzeiteffekte eines MCU- bzw. MICU1-Mangels in der Zelle beobachten zu können, musste ein stabileres System zur Herunterregulation gewählt werden. Deshalb wurden für die beiden Melanomlinien WM3734 und 1205Lu stabile Knockdown-Linien, basierend auf einer Integration von shRNA-Plasmiden ins Genom der Zellen, hergestellt (siehe Punkt 3.2). Die effiziente Herunterregulation und die Spezifität der shRNA wurde mittels qPCR und Western Blot validiert (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5: Stabile Herunterregulation in WM3734 und 1205Lu Knockdown-Linien durch shRNA; A:** Die Expression von MCU und MICU1 auf mRNA-Ebene wurde mittels qRT-PCR in WM3734 (links) und 1205Lu (rechts) mit stabil enthaltener shRNA gegen MCU (shMCU#1: hellblau, shMCU#2: dunkelblau) bzw. MICU1 (shMICU1#1: hellgrün, shMICU1#2: dunkelgrün) im Vergleich zur Kontrolle (pLKO.1: schwarz) untersucht. Für die stabilen WM3734 shRNA-Linien wurden vier, für die 1205Lu Linien zwei Experimente durchgeführt. Die erhaltenen  $2^{-(\Delta Cq)}$ -Werte wurden zunächst auf TBP und anschließend auf die mRNA-Expression der Kontrolle normiert. **B:** Die Herunterregulation von MCU auf Proteinebene wurde mittels Western Blot verifiziert. Lysate der stabilen Linien 1205Lu und WM3734 pLKO.1, shMCU#1 und shMCU#2 wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und Banden durch einen MCU-spezifischen Antikörper detektiert. Die quantitative Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mittels densitometrischer Bestimmung der Bandendichte und Normierung der Werte auf die Ladekontrolle und anschließender Normierung auf die jeweilige pLKO.1-Kontrolllinie. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (links) sowie die Quantifizierung aus drei unabhängigen Experimenten (rechts). **C:** Abbildung eines exemplarischen Western Blots in dem die Lysate von stabilen WM3734 pLKO.1, shMCU#1 und shMCU#2 aufgetrennt und auf MICU1 geprobt wurden (links), sowie der quantitativen Auswertung der Bandenstärke nach Normierung auf die Ladekontrolle und anschließender Normierung auf die zugehörige pLKO.1-Linie (rechts) (n = 4). **D:** Darstellung des Western Blots der Lysate von stabilen WM3734 pLKO.1 und MICU1#2 Linien (links) und Quantifizierung des Blots mit Calnexin als Ladekontrolle (rechts) (n = 1). **E:** Untersuchung der MCU-Proteinmenge in Lysaten der stabilen Linien 1205Lu und WM3734 pLKO.1, shMICU1#1 und shMICU1#2 mittels Western Blot. Abbildung des Western Blots (links) mit Quantifizierung der Bandenstärke auf Hsp90 als Ladekontrolle und anschließender Normierung auf die Expression der jeweiligen pLKO.1-Kontrolllinie (rechts) (n = 1). *Experimentelle Durchführung der qRT-PCR für WM3734 (A): Sandra Janku und Katharina Zimmermann, Auswertung Katharina Zimmermann; Experimentelle Durchführung der Western Blots C und D: Alexandra Stark (D) bzw. Alexandra Stark und Katharina Zimmermann (C), Analyse: Katharina Zimmermann*

In WM3734 zeigten die beiden Knockdown-Linien shMCU#1 und shMCU#2 eine Reduktion der MCU-mRNA auf 30,1 % bzw. 31,7 %. Für die shRNAs shMICU1#1 und shMICU1#2 reduzierte sich die mRNA von MICU1 im Vergleich zur Kontrolle pLKO.1 auf 19,0 % und 12,4 %. In beiden shMCU-Knockdown-Linien zeigte sich keine signifikante Auswirkung der MCU Reduktion auf die Expression von MICU1. In 1205Lu Zellen war der stabile Knockdown mit einer Reduktion der mRNA von MCU auf 12,5 % bzw. 26,6 % für shMCU#1 und shMCU#2, sowie einer Reduktion von MICU1 auf 8,0 % und 11,1 % für shMICU1#1 und shMICU1#2 sogar noch effizienter als in WM3734. Auch in dieser Melanomlinie zeigt die Herunterregulation von MCU keine signifikanten Auswirkungen auf die Expression von MICU1. Allerdings konnten sowohl in WM3734 als auch in 1205Lu Tendenzen zu einer Veränderung in der MCU Expression nach dem Knockdown von MICU1 (shMICU1#1 und shMICU1#2) beobachtet werden. So zeigten WM3734 auf mRNA-Ebene eine Erhöhung auf 128,4 % bzw. 132,8 % im Vergleich zur Kontrolle, während 1205Lu nur in shMCU#2 eine Erhöhung auf 106,4 % aufwies und in shMCU#1 eine Reduktion auf 81,7 % zu beobachten war (vgl. Abbildung 5A).

Bei der Untersuchung der Proteinexpression konnte festgestellt werden, dass die Herunterregulation der MCU mRNA in den beiden shMCU#1 und shMCU#2 Linien völlig ausreichend war, um auch die Proteinmenge signifikant zu reduzieren (vgl. Abbildung 5B). Die Effizienz der integrierten shRNA-Plasmide konnte somit auch auf Proteinebene sowohl in WM3734 als auch in 1205Lu bestätigt werden. Zur Untersuchung der Spezifität wurden Lysate der stabilen MCU-Knockdown-Linien im Western Blot auf MICU1 geprobt. Wie in Abbildung 5C erkennbar ist, hatte die hairpin-RNA gegen MCU keine signifikanten Auswirkungen auf die Expression von MICU1.

Trotz der sehr guten Effizienz auf mRNA-Ebene konnte im Western Blot kein zuverlässiger und ausreichender Knockdown von MICU1 in den stabilen Linien mit den shRNA-Plasmiden shMICU1#1 und shMICU1#2 detektiert werden (siehe Abbildung 5D). Die Proteinlevel von MICU1 ließen sich nur auf 74 % im Vergleich zur Kontrolle herunterregulieren. Auch zeigten sich Unklarheiten über die Spezifität der shRNA. Wie bereits auf mRNA-Ebene beobachtet, zeigten sich auch in der Proteinmenge instabile Veränderungen in der MCU-Expression, sowohl in Richtung einer Erhöhung als auch einer Reduktion des Proteins (vgl. Abbildung 5E).

MICU1 nimmt eine sehr komplexe und noch immer nicht vollständig aufgeklärte Funktion als Regulator von MCU ein. Auch führt seine Herunterregulation zu einer verringerten Stabilität anderer Proteine, wie MICU2, das auch an der Regulation von MCU beteiligt ist (siehe 1.4.3). Deshalb wurde im Laufe dieser Arbeit der Fokus des Projektes hauptsächlich auf die Wirkung von MCU gelegt, da dieses die porenbildende Komponente des Kanals darstellt und seine Herunterregulation direkte Auswirkungen hat.

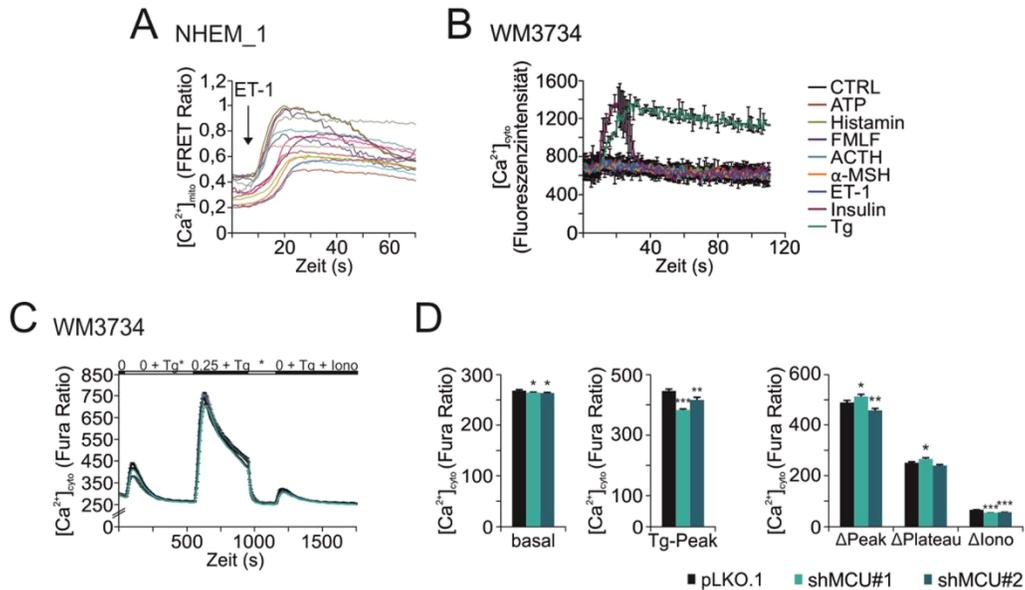
### **4.3 Zytoplasmische Kalziumströme in Melanomzellen**

Wie bereits von Stanisz *et al.* gezeigt werden konnte, spielen zytoplasmische Kalziumströme eine wichtige Rolle bei der Regulation verschiedener Mechanismen in Melanomzellen (Stanisz *et al.*, 2016). Da eine Funktion von Mitochondrien das Abpuffern von zytoplasmischen Kalziumkonzentratio-

nen ist, stellte sich die Frage, ob MCU eine Auswirkung auf die Aufnahme von Kalzium über die Plasmamembran in die Zelle hat. Um eine möglichst relevante Aussage treffen zu können, sollte zunächst ein physiologischer Stimulus identifiziert werden, der zu einem Kalziueinstrom in das Zytosol bzw. in die Mitochondrien führt.

Bereits in vorangegangenen Projekten der Arbeitsgruppe wurde zur Stimulation von SOCE in primären humanen Melanozyten Endothelin-1 eingesetzt (Stanisz et al, 2014). Für einen weiteren Einstrom von Kalzium in die Mitochondrien lässt sich auf Einzelzellebene allerdings beobachten, dass nicht alle Melanozyten auf diesen Stimulus gleich gut reagieren, sondern einige Zellen keine Reaktion zeigen (Daten nicht gezeigt). Dies könnte unter anderem daran liegen, dass einzelne Melanozyten aufgrund von Komponenten des verwendeten Kulturmediums Rezeptoren internalisieren und so weniger leicht zu stimulieren sind. Allerdings können nicht reagierende Zellen leicht identifiziert und aus weiteren Analysen ausgeschlossen werden. Wird ein Einstrom von Kalzium jedoch aktiviert, so ist dieser in der Regel sehr deutlich erkennbar (vgl. Abbildung 6A).

Auch für Melanomzellen sollte ein physiologischer Stimulus zur Aktivierung des zytosolischen sowie des mitochondrialen Kalziueinstroms identifiziert werden. Da hier noch keine Vorkenntnisse vorhanden waren, mussten verschiedene Substanzen auf ihre stimulierende Wirkung hin untersucht werden. Zur Untersuchung des zytosolischen Kalziueinstroms wurden WM3734 mit dem Kalziumsensor R-GECO1.2 transfiziert und eine Änderung der Fluoreszenz nach Kalziumbindung mit Hilfe eines Plate Readers detektiert (siehe Punkt 3.8.4.2). Wie in Abbildung 6B erkennbar ist, zeigten die meisten der untersuchten Substanzen keine Aktivierung des Kalziueinstroms in die Zelle. Auch gängige Stimulanzen wie ATP, Histamin oder Endothelin-1, die in anderen Zelltypen einen Kalziueinstrom auslösen, hatten unter diesen Bedingungen in WM3734 keine Auswirkung auf die Kalziumaufnahme. Allerdings zeigte eine hohe Konzentration an Insulin (1,75 µg/ml) eine kurze Erhöhung des zytosolischen Kalziums. Wie erwartet führte auch die nicht physiologische Stimulation mit Thapsigargin zu einer Aufnahme von Kalziumionen in das Zytosol. Die Stimulation des Kalziueinstroms durch Insulin konnte leider nur auf Ebene eines Einstroms in das Zytosol beobachtet werden. Bei Betrachtung des mitochondrialen Kalziums auf Einzelzellebene konnte mit Insulin keine zuverlässige und reproduzierbare Stimulation eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstroms erreicht werden (Daten nicht gezeigt), während die Zugabe von Thapsigargin in den meisten Zellen zu einem Einstrom von Kalzium in die Mitochondrien führte. Da der Anteil an Melanomzellen, welche sich durch Insulin aktivieren ließen, sehr stark variierte und verschiedene Melanomlinien unterschiedlich auf die Substanzen reagierten, wurde für weitere Versuche Thapsigargin als Stimulanz eingesetzt. Dieser Inhibitor der SERCA-Pumpe des ER löst zwar nicht die komplette Signalkaskade des Kalziueinstroms aus, aber führt durch die Aktivierung von SOCE zu einer reproduzierbaren und zeitgleichen Stimulation aller Einzelzellen einer Messung. Dies erleichtert das Erkennen auch kleiner Effekte in der Kalziumdynamik.



**Abbildung 6: Stimulation des Kalziueinstroms und Auswirkung der MCU Herunterregulation auf SOCE; A:** In Melanozyten ist ein mitochondrialer Kalziueinstrom durch Stimulation mit Endothelin-1 induzierbar. Melanozyten wurden 24 h vor Messung mit dem mitochondrialen Kalziumsensors 4mtD3cpv transfiziert und in 1 mM  $\text{Ca}^{2+}$ -Ringerlösung gemessen. Dargestellt sind exemplarisch auf Endothelin-1 reagierende Zellen nach Aussortierung nicht-reagierender Zellen. **B:** Messung des zytosolischen Kalziums mittels Fluoreszenz des R-GECO1.2 Sensors im Plate Reader. Die Zellen wurden mit ATP, Histamin, FMLF, ACTH,  $\alpha$ -MSH, Endothelin-1, Insulin oder Thapsigargin stimuliert (n = 2). **C:** Verlauf der mittleren intrazellulären Kalziumkonzentration als 340 nm/360 nm-Ratiowert in Anhängigkeit der Zeit in stabilen WM3734 pLKO.1 (schwarz, n = 186), shMCU#1 (hellblau, n = 133) und shMCU#2 (dunkelblau, n = 167) Linien. **D:** Quantifizierung der Ratiowerte aus D für die basalen Kalziumlevel vor extrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Zugabe, Thapsigargin-Peak,  $\Delta$ Kalziumpeak,  $\Delta$ Plateau und  $\Delta$ Ionomycin-Peak.

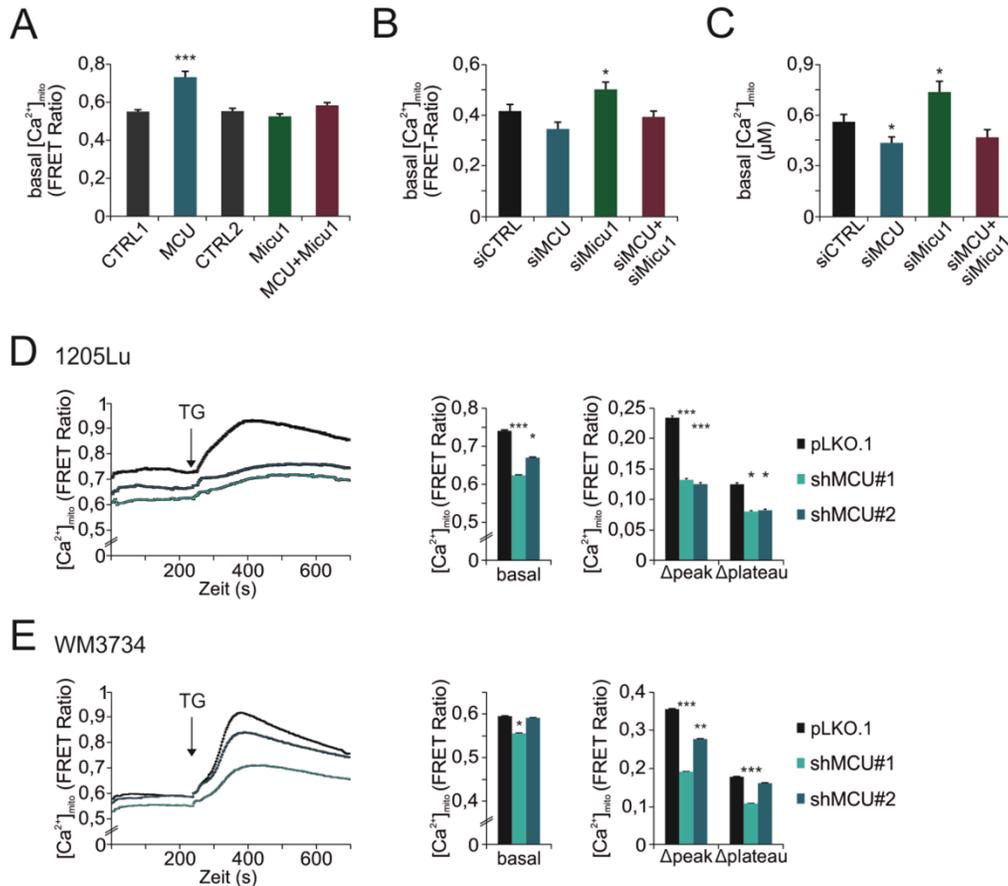
In Brustkrebszellen konnte bereits ein Einfluss von MCU auf SOCE beschrieben werden (Tang et al, 2015). Um zu überprüfen, ob das Fehlen des mitochondrialen Kalziumuniporters auch in Melanomzellen Auswirkungen auf zytosolische Kalziumströme hat, wurden die Veränderungen der Kalziumkonzentrationen im Zytosol der stabilen WM3734 Zellen mit Hilfe von Fura-2  $\text{Ca}^{2+}$ -Imaging untersucht (siehe Abbildung 6C). Im Ruhezustand ließ sich eine leichte Reduktion in den basalen Kalziumkonzentrationen der beiden stabilen Knockdown-Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle erkennen. Nach Inhibierung der SERCA-Pumpe durch Thapsigargin kommt es zu einer Entleerung des ERs, das als intrazellulärer Kalziumspeicher dient. Hier war eine Reduktion der Kalziumlevel in beiden MCU-Knockdown-Linien zu beobachten. Die ER-Entleerung führt zur Aktivierung der CRAC-Kanäle, so dass Kalzium bei extrazellulärer Zugabe in die Zelle einströmen kann. Im Versuch konnte bei einer Zugabe von 0,25 mM extrazellulärem Kalzium ein leichter Unterschied im Einstrom zwischen MCU-Knockdown-Zellen und Kontrollzellen festgestellt werden. Allerdings zeigten shMCU#1 Zellen einen etwas erhöhten Einstrom, während shMCU#2 Zellen einen verringerten Einstrom aufwiesen. Bei vollständiger Entleerung der intrazellulären Kalziumspeicher durch Ionomycin, waren geringere Kalziumlevel in beiden shMCU-Linien zu erkennen (siehe Abbildung 6D).

#### 4.4 Der Einfluss von MCU auf das mitochondriale Kalzium in Melanomzellen

In einem vorangegangenen Projekt der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass in HEK293-Zellen eine Überexpression von MCU zu erhöhten basalen Kalziumkonzentrationen in den Mitochondrien führt, während die alleinige Überexpression von MICU1 keine Auswirkungen hat (Masterarbeit K. Zimmermann 2013). Dieses Verhalten sollte auch in Melanomzellen überprüft werden. Wie in Abbildung 7A dargestellt ist, waren auch in WM3734 signifikant erhöhte mitochondriale Kalziumlevel nach transientser MCU Überexpression zu beobachten. Wie auch in HEK293 führte eine Erhöhung der Menge an MICU1 nicht zu einer Veränderung des basalen mitochondrialen Kalziums. Konträr zu den in HEK293 gewonnenen Daten war auch nach gemeinsamer Überexpression von MCU und MICU1 in WM3734 Melanomzellen kein Effekt im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten.

Im Kontrast zur Überexpression von MCU und MICU1 sollte auch die Auswirkung eines Fehlens dieser beiden Proteine untersucht werden. Hierfür wurde sowohl ein siRNA-vermittelter Knockdown in Melanomzellen und Melanozyten, als auch ein shRNA-vermittelter Knockdown in stabilen Melanomlinien betrachtet. In primären humanen Melanozyten führte die Herunterregulation des Regulatorproteins MICU1 zu einem signifikanten Anstieg des basalen mitochondrialen Kalziums, während der Knockdown von MCU eine starke Tendenz zu reduzierten Kalziumkonzentrationen in den Mitochondrien zeigte (vgl. Abbildung 7B). Für eine kombinierte Herunterregulation beider Proteine war kein Kalziumphänotyp zu beobachten. Erwartungsgemäß führte der transiente Knockdown von MCU und MICU1 in WM3734 Melanomzellen zu denselben Effekten: siMICU1 erhöhte das basale Kalzium, während siMCU das basale Kalzium signifikant reduzierte. Auch hier zeigte sich keine signifikante Veränderung des basalen mitochondrialen Kalziums nach kombinierter Herunterregulation von MCU und MICU1 (siehe Abbildung 7C).

Wie in Abbildung 7D und E gezeigt, war auch in den stabilen Knockdown-Systemen eine Reduktion der basalen mitochondrialen Kalziumlevel in ruhenden Zellen erkennbar. In 1205Lu konnte eine signifikante Verminderung der FRET Ratiowerte von 0,741 auf 0,624 in shMCU#1 und 0,670 in shMCU#2 festgestellt werden (vgl. Abbildung 7D). Auch in WM3734 waren die Werte von 0,595 auf 0,556 in shMCU#1 und 0,591 in shMCU#2 verringert (vgl. Abbildung 7E). Mit Hilfe von Thapsigargin wurde der Einstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  in die Mitochondrien ausgelöst. Hierbei wurde deutlich, dass das Fehlen von MCU in den Mitochondrien zu einer verminderten Aufnahme von Kalzium in WM3734 führte bzw. in 1205Lu die Aufnahme fast vollständig verhinderte (siehe Abbildung 7D und E).

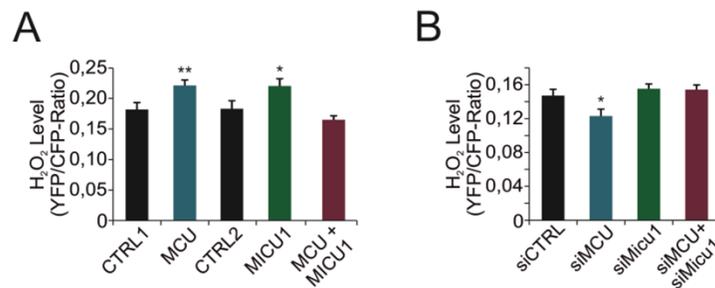


**Abbildung 7: Einfluss von MCU und MICU1 auf das mitochondriale Kalzium; A:** Mitochondriale Kalziumlevel als Mittelwerte der FRET Ratio bei Überexpression von MCU (blau) (n = 66), MICU1 (grün) (n = 66), MCU+MICU1 (violett) (n = 87) bzw. ihren Vektorkontrollen CTRL1 (schwarz) (n = 52) und CTRL2 (schwarz) (n = 63) in unstimulierten WM3734. **B:** Mitochondriale Kalziumlevel als Mittelwerte der FRET Ratio in primären Melanozyten 48-72 h nach Transfektion mit siRNA gegen MCU (blau) (n = 16), MICU1 (grün) (n = 29) oder ihrer Kombination (violett) (n = 19) im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen (schwarz) (n = 26). **C:** Mitochondriale Kalziumlevel als Mittelwerte der FRET Ratio in WM3734 Melanomzellen 72 h nach Transfektion mit siRNA gegen MCU (blau) (n = 62), MICU1 (grün) (n = 76) oder ihrer Kombination (violett) (n = 59) im Vergleich zu Kontroll-transfizierten Zellen (schwarz) (n = 52). **D:** Verlauf der mitochondrialen Kalziumkonzentration als FRET Ratiowert in Anhängigkeit der Zeit in stabilen 1205Lu pLKO.1 (schwarz, n = 72), shMCU#1 (hellblau, n = 67) und shMCU#2 (dunkelblau, n = 64) Linien (links) und die Quantifizierung der Ratiowerte für die basalen Kalziumlevel vor Thapsigargin-Stimulation (Mitte),  $\Delta$ Einstrompeak und  $\Delta$ Plateau (rechts). **E:** Verlauf der mitochondrialen Kalziumkonzentration als FRET Ratiowert in Anhängigkeit der Zeit in stabilen WM3734 pLKO.1 (schwarz, n = 143), shMCU#1 (hellblau, n = 156) und shMCU#2 (dunkelblau, n = 135) Linien (links) und die Quantifizierung der Ratiowerte für die basalen Kalziumlevel vor Thapsigargin-Stimulation (Mitte),  $\Delta$ Einstrompeak und  $\Delta$ Plateau (rechts). Alle dargestellten Messungen erfolgten mit Hilfe des 4mtD3cpv-Sensors in 1 mM  $Ca^{2+}$ -Ringerpuffer.

#### 4.5 Auswirkungen von MCU auf die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies

Wie bereits beschrieben (siehe Punkt 1.4.1) spielt mitochondriales Kalzium eine wichtige Rolle in der Regulation der ROS-Produktion. Da in Melanomzellen die mitochondriale Kalziumkonzentration durch MCU und MICU1 beeinflusst wird (vgl. Punkt 4.4), sollten die Auswirkungen der Expressionsänderung dieser beiden Proteine auf die ROS-Level näher betrachtet werden.

Im Hinblick auf die Menge der reaktiven Sauerstoffspezies, die sich im Zytosol der Zelle befinden, zeigte die MCU-Überexpression einen klaren Effekt. So konnte mit einer Fluoreszenzratio von 0,221 im Vergleich zu einer Ratio von 0,182 in Kontrollzellen ein signifikanter Anstieg der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Level nachgewiesen werden (siehe Abbildung 8A). Interessanterweise führte auch die Überexpression von MICU1, die keine Auswirkungen auf die basalen Level des mitochondrialen Kalziums zeigte, zu einer Erhöhung des messbaren H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit einer Ratio von 0,221, während eine kombinierte Überexpression keinen signifikanten Effekt hatte. In Übereinstimmung mit den reduzierten basalen Leveln des mitochondrialen Kalziums, konnte in Folge einer transienten MCU Herunterregulation eine signifikante Verringerung der zytosolischen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen gemessen werden (vgl. Abbildung 8B). Hier ergab sich ein Ratio-Wert von 0,123 für siMCU im Vergleich zur Kontrolle mit 0,147. Im Gegensatz dazu konnte im transienten Knockdown kein signifikanter Unterschied zur Kontrolle bei fehlendem MICU1 festgestellt werden. Auch die kombinierte Herunterregulation von MCU und MICU1 zeigte keine Auswirkungen im Vergleich zur Kontrolle.



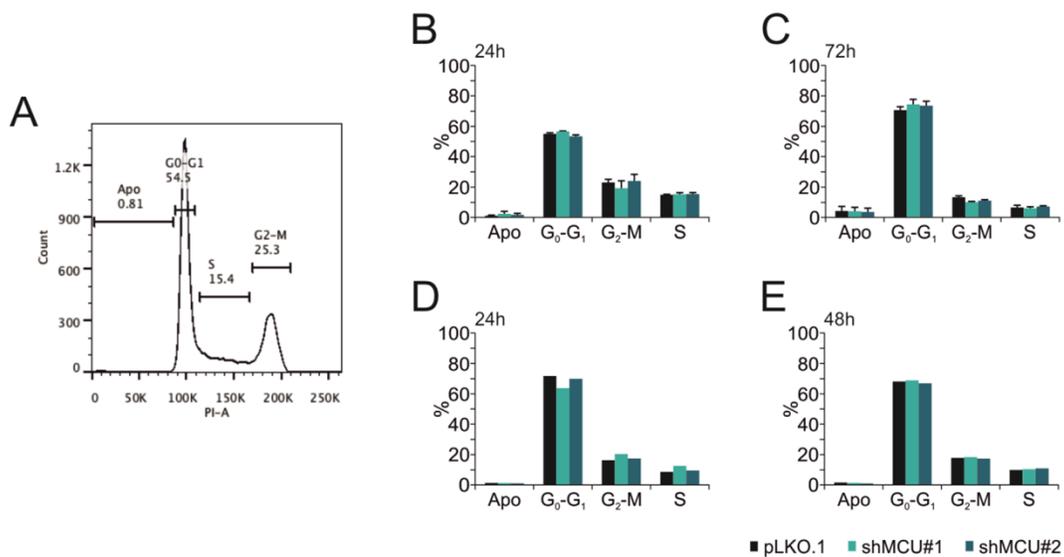
**Abbildung 8: Die Auswirkungen von MCU und MICU auf die ROS-Produktion in WM3734; A:** Menge an intrazellulärem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Mittelwerte der YFP/CFP-Ratio bei Überexpression von MCU (blau) (n = 57), MICU1 (grün) (n = 52) oder MCU+MICU1 (violett) (n = 57) im Vergleich mit den jeweiligen Leervektorkontrollen CTRL1 (schwarz) (n = 36), CTRL2 (schwarz) (n = 40). **B:** Menge an intrazellulärem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als Mittelwerte der YFP/CFP-Ratio bei Herunterregulation von MCU (n = 89), MICU1 (n = 81) oder MCU+MICU1 (n = 79) 72 h nach Transfektion im Vergleich zur Kontrolle CTRL (n = 89).

## 4.6 Regulation von Zellzyklus und Proliferation durch mitochondriales Kalzium

### 4.6.1 Zellzyklus

Da Kalzium auch einen Einfluss auf die Regulation von Prozessen wie der Proliferation von Zellen haben kann, sollte zunächst die Auswirkung eines MCU Knockdowns auf den Zellzyklus von Melanomzellen untersucht werden. Anhand der enthaltenen Menge genomischer DNA in der Zelle können Aussagen darüber getroffen werden, in welchem Stadium des Zellzyklus sie sich gerade befindet. Proben stabiler WM3734 Knockdown Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten mittels FACS betrachtet (siehe Abbildung 9A). Nach 24 h befand sich der größte Teil der Zellen aller Bedingungen in der G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-Phase: bei Kontrollzellen 55,2 %, bei shMCU#1 56,8 % und bei shMCU#2 53,6 %. Durchschnittlich 15,3 % der Zellen aller Bedingungen waren in der S-Phase (Kontrolle: 15,1 %, shMCU#1: 15,4 %, shMCU#2: 15,5 %), während sich zwischen 19,4 % (shMCU#1) und 24,1 % (shMCU#2) (Kontrollzellen: 23,3 %) in der G<sub>2</sub>-M-Phase befanden (vgl. Abbildung 9B). Nach

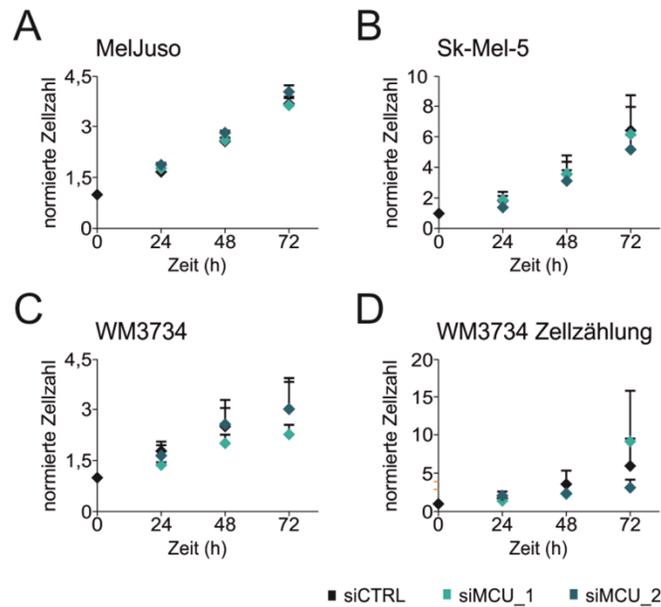
drei Tagen war der prozentuale Anteil an Zellen in der G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-Phase relativ gleichmäßig auf 70,7 % in der Kontrolle, 74,5 % in shMCU#1 und 73,6 % in shMCU#2 angestiegen, während sich der Anteil der Zellen in der S-Phase auf 6,8 % in der Kontrolle, 6,3 % in shMCU#1 und 7,4 % in shMCU#2 reduzierte. In der G<sub>2</sub>-M-Phase konnten 13,6 % der Kontrollzellen, 10,2 % der shMCU#1-Zellen und 11,2 % der shMCU#2-Zellen nachgewiesen werden. Der Anteil an apoptotischen Zellen stieg in allen Bedingungen gleichmäßig auf durchschnittlich 4,2 % an (vgl. Abbildung 9C). Insgesamt betrachtet konnten zu verschiedenen Zeitpunkten keine Unterschiede zwischen Kontrollzellen und Zellen mit MCU Knockdown festgestellt werden. Um zu untersuchen, ob sich Stress stärker auf den Zellzyklus von MCU herunterregulierten Melanomzellen auswirkt, wurden die stabilen WM3734 Zellen für 24 h bzw. 48 h unter Hypoxiebedingungen kultiviert. Hierbei zeigten sich kaum Unterschiede zwischen den beiden Zeitpunkten (vgl. Abbildung 9D und E). Nach 48 h konnten 71,8 % der Kontrollzellen, 63,7 % der shMCU#1 und 69,9 % der shMCU#2 der G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>-Phase zugeordnet werden, nach 48 h lagen diese Werte bei 68,1 %, 68,8 % und 66,8 %. In der G<sub>2</sub>-M-Phase wurden durchschnittlich 17,8 % der Zellen detektiert (Kontrolle: 16,1 % bzw. 17,8 %, shMCU#1: 20,2 % bzw. 17,3 %, shMCU#2: 17,2 % bzw. 18,2 %). Auch im prozentualen Anteil der Zellen in der S-Phase und im Anteil apoptotischer Zellen konnte kein Unterschied zwischen den unterschiedlichen Bedingungen beobachtet werden. So waren bei Kontrollzellen nach 24 h 8,37% und nach 48 h 9,88 % der Zellen in der S-Phase, bei shMCU#1 12,4% bzw. 10,3 % und bei shMCU#2 9,29 % bzw. 10,8 %. Der Anteil an apoptotischen Zellen betrug in shMCU#1 1,04 % (24 h) bzw. 1,25 % (48 h), in shMCU#2 0,81 % bzw. 0,97 % und in Kontrollzellen 1,05 % bzw. 1,57 %.



**Abbildung 9: MCU hat keinen Effekt auf den Zellzyklus in WM3734 Zellen;** A: Darstellung einer repräsentativen Verteilung von WM3734 Zellen auf die die Zellzyklusphasen G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>-M oder S und apoptotische Zellen anhand ihrer Fluoreszenzintensität von in die DNA interkaliertem Propidiumiodid. B-E: Verteilung des prozentualen Anteils an stabilen WM3734 pLKO.1 (schwarz), shMCU#1 (hellblau) und shMCU#2 (dunkelblau) Zellen auf die Zellzyklusphasen G<sub>0</sub>-G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>-M oder S bzw. der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen. Die Ermittlung der Zellzyklusphase geschah mittels durchflusszytometrischer Messung nach 24h (B) bzw. 72 h (C) Inkubation unter Standardbedingungen (n = 2) oder 24 h (D) bzw. 48 h (E) unter Hypoxie (n = 1). Die durchflusszytometrische Messung und Analyse der Daten erfolgte mit Hilfe von Michaela Perego.

## 4.6.2 Proliferation

Auch wenn eine Störung des mitochondrialen Kalziums durch das Fehlen von MCU nicht zu einer Veränderung des Zellzyklus führt (vgl. Punkt 4.6.1), besteht die Möglichkeit, dass die Proliferation der Zellen in veränderter Form vorliegt. Um dies zu untersuchen, wurden MTT-Assays mit MelJuso, Sk-Mel-5 und WM3734 Zellen nach transienter MCU Herunterregulation durch siRNA durchgeführt.

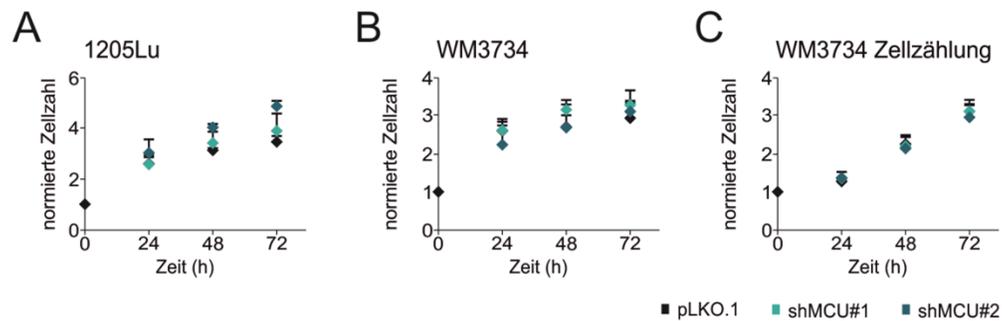


**Abbildung 10: MCU zeigt keine Auswirkung auf die Proliferation verschiedener Melanomzellen nach transienter Herunterregulation;** A-C: Proliferation von MelJuso (A), Sk-Mel-5 (B) und WM3734 (C) Zellen nach Transfektion mit siRNA gegen MCU (siMCU\_1: hellblau, siMCU\_2: dunkelblau) oder einer non silencing Kontrolle (schwarz). Gemessen wurde die Fluoreszenz nach Umsetzung des MTT-Reagenz als Maß der Gesamtzahl an Zellen in 24-stündigen Intervallen. Es wurden jeweils 3-4 unabhängige Experimente durchgeführt und die erhaltenen Daten auf den zugehörigen bei 0 h gemessenen Wert normiert. D: Messung der Proliferation anhand der Zellzahl für WM3734 Zellen nach Herunterregulation mit siRNA gegen MCU (siMCU\_1: hellblau, siMCU\_2: dunkelblau). Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und die erhaltenen Zellzahlen auf den zugehörigen bei 0 h gemessenen Wert normiert. *Experimentelle Durchführung der MTT-Assays (A-C): Alexandra Stark, Analyse: Katharina Zimmermann*

Wie in Abbildung 10A, B und C zu erkennen ist, zeigten sich in allen drei Zelllinien keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll-transfizierten Zellen und MCU-herunterregulierten Zellen. Um ausschließen zu können, dass diese Ergebnisse auf einen veränderten Stoffwechsel zurückzuführen sind, welcher die Werte des MTT-Assays beeinflussen würde, wurde für WM3734 zusätzlich eine Zellzählung durchgeführt. Auch hier konnten keine Unterschiede zwischen Knockdown und Kontrolle festgestellt werden (vgl. Abbildung 10D). Interessanterweise zeigten Sk-Mel-5 und WM3734 große Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten, was möglicherweise auf eine unterschiedlich gute Überlebensrate der Zellen bzw. einen unterschiedlich starken Stressimpuls nach Transfektion zurückzuführen sein könnte.

Um diesen Einflussfaktor einer vorhergehenden Transfektion auszuschließen, wurde die Proliferation auch in stabilen 1205Lu und WM3734 Zellen untersucht (siehe Abbildung 11A und B).

Hier waren die Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten wesentlich geringer als in den siRNA Versuchen. Allerdings konnte auch hier weder bei WM3734 noch bei 1205Lu ein Unterschied im Wachstum zwischen Kontrollzellen und den beiden Knockdown-Linien shMCU#1 und shMCU#2 beobachtet werden. Auch hier wurde zur Kontrolle die Bestimmung der Proliferation von WM3734 Zellen zusätzlich durch Zellzählung überprüft, da diese Versuche mit einem Stoffwechsel-sensitiven Reagenz durchgeführt wurden. Auch in diesem Fall zeigte sich keine Auswirkung der Herunterregulation von MCU auf die Proliferation der Zellen (vgl. Abbildung 11C).



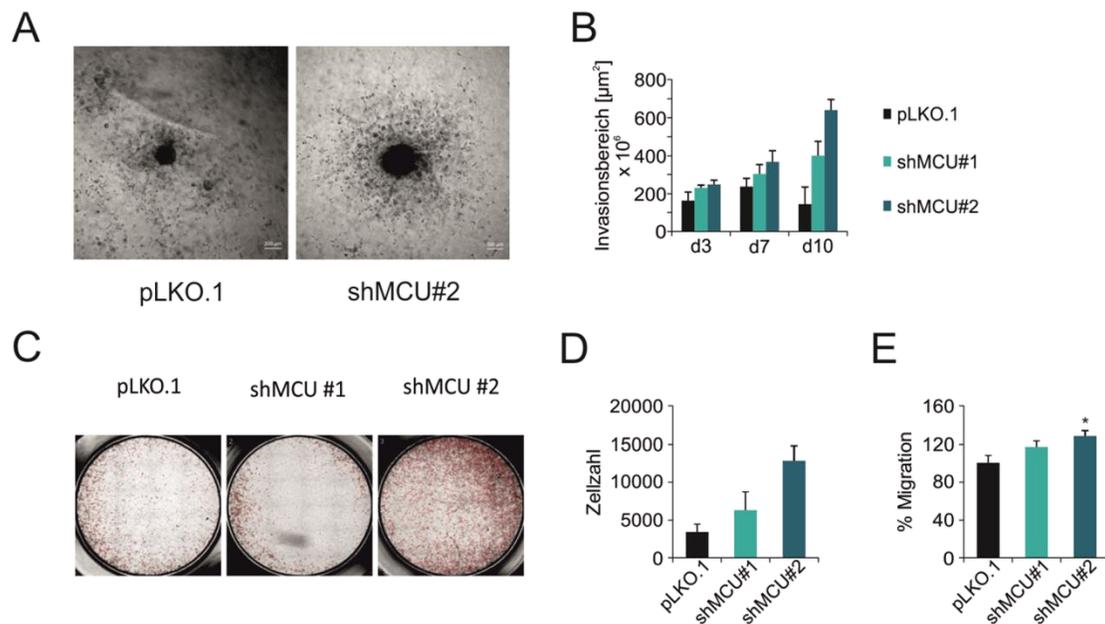
**Abbildung 11: MCU zeigt keine Auswirkung auf die Proliferation verschiedener Melanomzellen bei stabiler Herunterregulation; A-B:** Proliferation von stabilen 1205Lu (A) und WM3734 (B) pLKO.1 (schwarz), shMCU#1 (hellblau) und shMCU#2 (dunkelblau). Gemessen wurde die Fluoreszenz nach Umsetzung des Resaruzin-Reagenz als Maß der Gesamtzahl an Zellen in 24-stündigen Intervallen. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt und die erhaltenen Daten auf den zugehörigen bei 0 h gemessenen Wert normiert. **C:** Messung der Proliferation anhand der Zellzahl für stabile WM3734 Zelllinien. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und die erhaltenen Zellzahlen auf den zugehörigen bei 0 h gemessenen Wert normiert.

#### 4.7 Tumorpotential von Melanomzellen mit reduziertem MCU

Das Potential von Krebszellen einen neuen Tumor oder Metastasen zu formen hängt nicht nur von der Geschwindigkeit ihrer Proliferation ab, sondern auch von ihrer Fähigkeit in Gewebe einzuwandern und sich darin vorwärts zu bewegen. Nachdem keine Auswirkungen auf die Proliferation durch das Fehlen des mitochondrialen Kalziumuniporters festgestellt werden konnten, war demnach die Beobachtung der Invasion und Migration ein weiterer interessanter Punkt.

Zur Einschätzung des invasiven Potentials wurden Sphäroide in eine Kollagenmatrix eingebettet und die Einwanderung in diese untersucht. Diese Versuche wurden in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Tumorerogenität und Plastizität des Universitätsklinikums Essen von Batool Shannan durchgeführt. Wie in Abbildung 12B dargestellt ist, zeigten die Sphäroide der MCU-Knockdown-Linien shMCU#1 und shMCU#2 bereits drei Tage nach Einbettung in die Matrix eine Tendenz zu einer verstärkten Einwanderung in das Kollagen. Diese Tendenz war auch nach einer Woche zu erkennen. Nach zehn Tagen in Kollagen war ein deutlicher Unterschied zwischen Kontrolle und MCU Knockdown sichtbar. Während der Einwanderungsradius der Kontrollzellen durch Zellsterben bereits wieder reduziert wurde, stieg der Radius der Knockdown-Linien weiter an und erreichte mit Werten von  $407969 \mu\text{m}^2$  (shMCU#1) und  $644032 \mu\text{m}^2$  (shMCU#2) einen 2,6- bzw. 4,2-mal so hohen Wert wie die Kontrolle mit  $154010 \mu\text{m}^2$ .

Um eine Beurteilung der Migration der Zellen treffen zu können, wurde diese mittels Transwell-Assays untersucht. In Abbildung 12C sind beispielhaft die gefärbten Membranen nach Migration der Zellen dargestellt. Wie hier bereits zu erkennen und in Abbildung 12D quantitativ dargestellt ist, konnten für die beiden shMCU-Linien mit durchschnittlich 6310 (shMCU#1) und 12827 Zellen (shMCU#2) eine größere Anzahl an Zellen auf der Unterseite der Membran nach 48 h Migration nachgewiesen werden als für die Kontrolle mit 3436 Zellen. Da ein kleiner Anteil an Zellen allerdings nicht nur die Membran durchwanderte und auf der Unterseite wieder adhärierte, sondern auf den Boden des Wells absank und erst dort anhaftete, musste die Art der Auswertung an diese Bedingung angepasst werden, weshalb die migrierten Zellen im unteren Kompartiment des Wells durch eine Färbung mit Calcein detektiert wurden (siehe Punkt 3.7). Hierbei zeigte sich tendenziell eine stärkere Migration der shMCU#1 Zellen mit 117 % im Vergleich zur Kontrolle. Für die Linie shMCU#2 konnte mit einer Migration von 128 % eine signifikant erhöhte Migration festgestellt werden (vgl. Abbildung 12E).



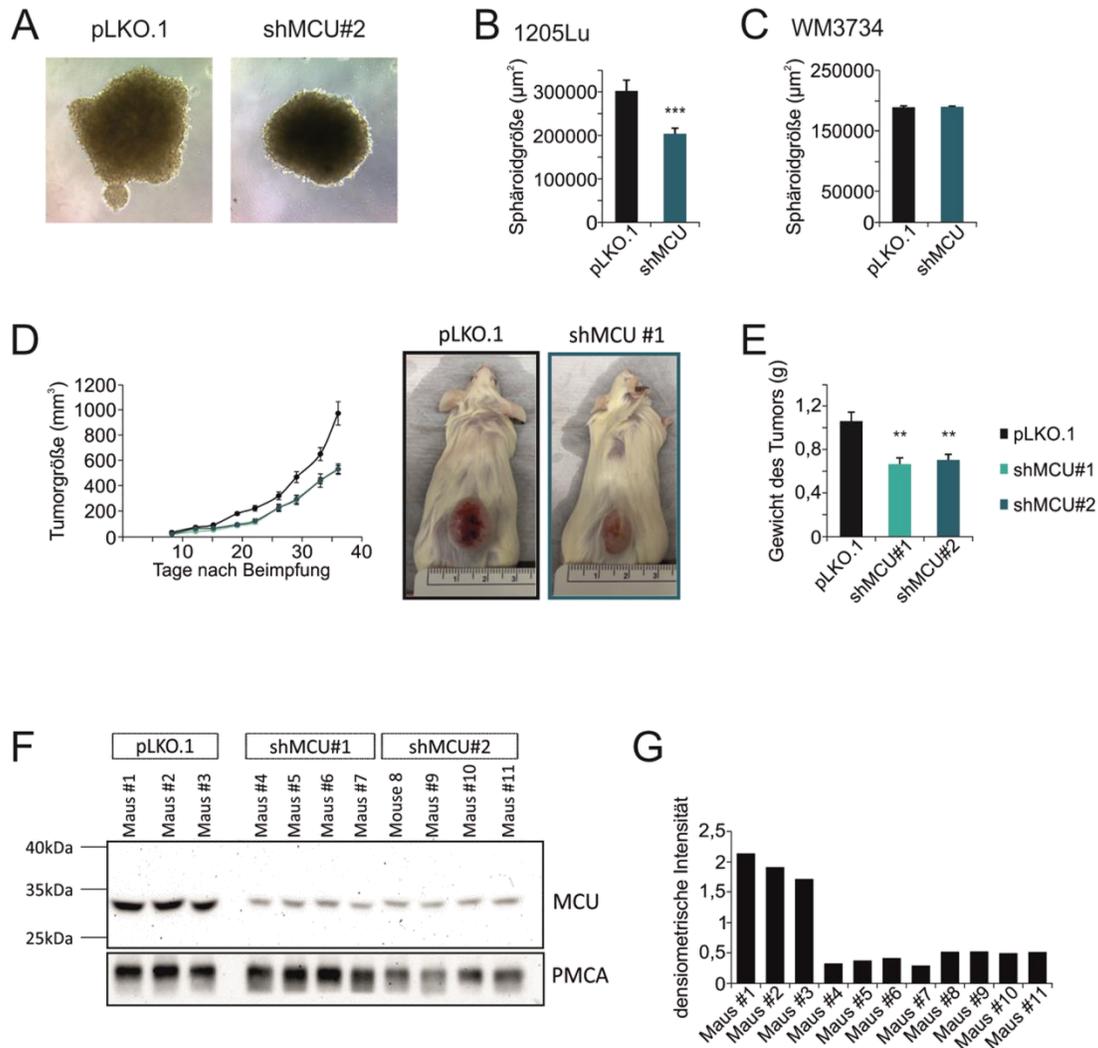
**Abbildung 12: Potential zur Invasion und Migration stabiler MCU-Knockdown-Zelllinien;** **A:** Repräsentative Bilder von Sphäroiden, die aus pLKO.1 und shMCU#2 Linien gebildet wurden und ihre Einwanderung in die sie umgebende Kollagenmatrix. **B:** Die Bestimmung des invasiven Potentials erfolgte durch Messung der Eindringtiefe der Zellen aus den Sphäroiden in eine umgebende Kollagenmatrix. **C:** Repräsentative Bilder der Färbung migrierter 1205Lu Zellen an der Unterseite der Migrationsmembran **D:** Quantifizierung der Migration anhand der Anzahl gefärbter 1205Lu pLKO.1 (schwarz), shMCU#1 (hellblau) und shMCU#2 (dunkelblau) Zellen. Es wurden zwei unabhängige Experimente mit Doppelbestimmung der einzelnen Bedingungen durchgeführt. **E:** Bestimmung der Migration der stabilen 1205Lu Knockdownlinien durch eine Membran mittels Calcein-Färbung der migrierten Zellen. Der erhaltene Fluoreszenzwert wurde anschließend auf die pLKO.1 Kontrolllinie normiert. Es wurden sechs unabhängige Experimente mit Doppelbestimmung der einzelnen Bedingungen durchgeführt. *Die Versuche zur Invasion in Kollagen wurden durch Batoool Shannan durchgeführt und ausgewertet. Die mikroskopische Analyse der Migration anhand einer Zellfärbung (C und D) wurde mit Hilfe von James Hayden durchgeführt.*

## 4.8 Tumorwachstum

Nachdem in Melanomzellen mit herunterreguliertem MCU ein verstärktes Potential zur Migration und Invasion, jedoch keine Veränderung in der Proliferation beobachtet werden konnte, war es von großem Interesse diese Charakteristika *in vivo* bzw. unter physiologischeren Voraussetzungen zu untersuchen. Wie bereits in Punkt 4.6.2 beschrieben, wurde die Proliferation der Melanomzellen in einem zweidimensionalen *in vitro* System analysiert. Allerdings spielen für das Wachstum von Zellen verschiedene Faktoren, wie beispielsweise Zell-Zell-Kontakte eine wichtige Rolle (Ribatti, 2017; Sharif & Wellstein, 2015). Aus diesem Grund wurde zur weiteren Betrachtung der Proliferation ein dreidimensionales System gewählt: Die Zellen wurden zur Bildung von Sphäroiden angeregt und deren Wachstum über mehrere Tage verfolgt. Somit konnten Einflüsse wie gegenseitige Wachstumskontrolle durch Zellkontakte und die entstehende Mikroumgebung mit berücksichtigt werden. Wie in Abbildung 13B und C dargestellt, konnte auch unter diesen Bedingungen im stabilen MCU Knockdown der WM3734 Zellen kein Unterschied zur Kontrolle festgestellt werden. Dagegen wiesen stabile 1205Lu Zellen mit herunterreguliertem MCU mit einer Fläche von 203594  $\mu\text{m}^2$  ein signifikant reduziertes Wachstum der Sphäroide im Vergleich zu Kontrollzellen mit 304026  $\mu\text{m}^2$  auf.

Auch bei *in vivo* Versuchen, in denen stabile 1205Lu Melanomzellen in Mäuse injiziert und das Wachstum des Primärtumors über mehrere Wochen verfolgt wurde, konnte diese Beobachtung bestätigt werden. Hier zeigten sich bereits 19 Tage nach Injektion der Tumorzellen ein starker Unterschied in der Größe des Primärtumors (siehe Abbildung 13D). Während zu diesem Zeitpunkt ein Tumor aus Kontrollzellen im Durchschnitt ein Volumen von 181  $\text{mm}^3$  hatte, konnte für Tumore aus MCU-Knockdown-Linien ein Volumen von 85  $\text{mm}^3$  (shMCU#1) bzw. 95  $\text{mm}^3$  (shMCU#2) gemessen werden. Nach 36 Tagen Tumorwachstum waren die Primärtumore der Knockdown-Linien mit einer Größe von durchschnittlich 530  $\text{mm}^3$  (shMCU#1) bzw. 533  $\text{mm}^3$  (shMCU#2) nur ungefähr halb so groß wie die Tumore mit 974  $\text{mm}^3$ , die sich aus den Kontrollzellen gebildet hatten. Auch das finale Gewicht der Tumore entsprach diesem Ergebnis (vgl. Abbildung 13E). Während Tumore der Kontrollzellen im Schnitt 1,06 g wogen, waren die Tumore aus shMCU#1 nur 0,67 g und aus shMCU#2 0,71 g schwer.

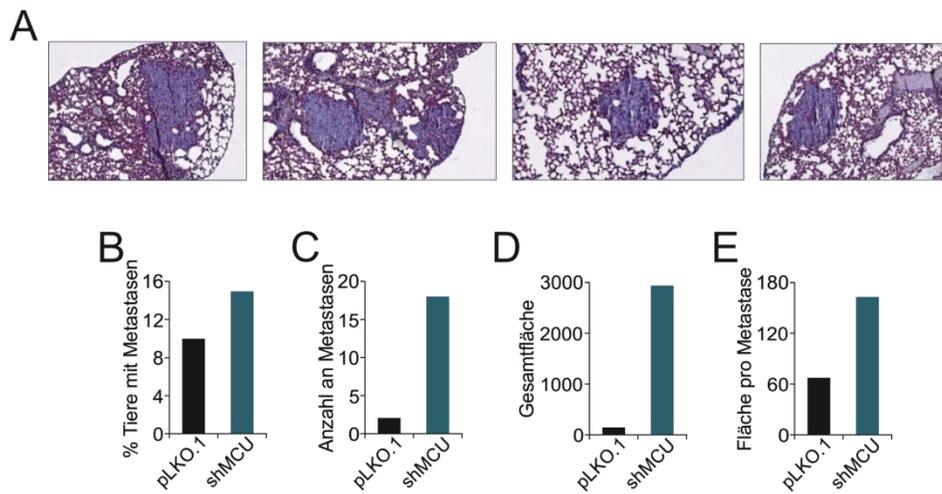
Unter Zellkulturbedingungen ist es möglich, die Stabilität der Knockdown-Linien in regelmäßigen Abständen durch Selektion mit Puromycin zu überprüfen und so eine dauerhafte Herunterregulation von MCU zu gewährleisten. Da dies während der *in vivo* Experimente nicht möglich war, mussten die entstandenen Primärtumore auf ihren stabilen MCU Knockdown hin verifiziert werden. Dies geschah mit Hilfe eines Western Blots, wie in Abbildung 13F dargestellt. Auf einer Höhe von ungefähr 35 kDa konnten für Mäuse der Kontrollgruppe deutliche Banden mit einem gegen MCU gerichteten Antikörper detektiert werden. In den beiden Gruppen der Mäuse, denen die Linien shMCU#1 oder shMCU#2 injiziert wurde, konnten dagegen nur sehr schwache Banden für MCU nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der Bandenstärke mit Normierung auf die Ladekontrolle ist in Abbildung 13G zu sehen, wobei sich die Werte der Kontrollgruppe in einem Bereich zwischen 1,7 und 2,1 befinden, während die Werte der MCU Banden der Knockdown-Tumore maximale Werte von 0,5 erreichen. Auch nach 36 Tagen Inkubation der stabilen 1205Lu Melanomlinien in der Maus konnte somit noch immer eine deutliche Reduktion des MCU-Proteins nachgewiesen werden.



**Abbildung 13: MCU hat einen Einfluss auf das Tumorwachstum; A-C:** Wachstum von Sphäroiden aus 1205Lu pLKO.1 (schwarz) (n = 93) und shMCU#2 (blau) (n = 81)(B) und WM3734 pLKO.1 (n = 95) und shMCU#2 (n = 127) Zellen (C) auf Agar-beschichteten Platten. Exemplarische Abbildung der gebildeten Späroide aus 1205Lu Zellen nach fünf Tagen (A) und die Mittelwerte der mittels ImageJ quantitativ bestimmten Fläche (B und C). **D:** Entwicklung der Größe des Primärtumors aus 1205Lu pLKO.1 (schwarz) (n = 10), shMCU#1 (hellblau) (n = 10) und shMCU#2 (dunkelblau) (n = 10) Zellen in Mäusen (links). Abbildung repräsentativer Beispiele der Kontrollgruppe und der shMCU#1-Gruppe nach 36 Tagen Tumorstadium (rechts). **E:** Durchschnittliches Gewicht der Tumore aus D am Endpunkt (36 Tage) bei Entnahme. **F:** Validierung der stabilen Herunterregulation von MCU in den Primärtumoren mittels Western Blot. Aus jeder der Gruppen wurden zufällig 3-4 Mäuse zur Überprüfung ausgewählt, ein Lysat aus einem Teil des Tumors hergestellt, elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und mit  $\alpha$ -MCU geprobt. **G:** Quantifizierung des Western Blots aus F durch densitometrische Bestimmung der Bandenstärke und deren Normierung auf die Ladekontrolle PMCA (n = 1). *Experimentelle Ausführung und Analyse D-E: Adina Vultur und Andrea Waters*

*In vitro* zeigte sich bereits ein verstärktes Potential zur Migration und Invasion in Melanomzellen mit verringerten Mengen an MCU (vgl. Punkt 4.7). Um das hiermit verknüpfte Potential der Melanomzellen zur Metastasierung zu analysieren, wurden die Lungen der Versuchstiere auf Metastasen hin untersucht. Dieses Organ wurde zur Untersuchung ausgewählt, da sich erfahrungsgemäß hier bereits vor allen anderen Organen in der Maus erkennbare Metastasen bilden und diese sich deut-

lich von der Struktur des Lungengewebes unterscheiden lassen, wie in Abbildung 14A an Beispielen dargestellt ist. Die untersuchten Gewebeschnitte wurden von Alexandra Stark in der Abteilung für Dermatologie des Universitätsklinikums Homburg hergestellt und die computerbasierte Auswertung erfolgte durch Anna Höwner der Arbeitsgruppe Tumorheterogenität und Plastizität des Universitätsklinikums Essen. Bei der Auswertung der Lungenschnitte konnten in einem höheren Anteil der Tiere, deren Tumor aus einer der shMCU-Linien entstand, Metastasen in der Lunge gefunden werden, als in Tieren der Kontrollgruppe (siehe Abbildung 14B). Auch war die gesamte Anzahl an gefundenen Metastasen mit 18 in Mäusen mit den shMCU-Tumoren wesentlich höher als in Kontrollmäusen mit nur 2 Metastasen (vgl. Abbildung 14C). Metastasen aus shMCU-Linien wiesen zudem eine größere Fläche mit durchschnittlich  $163374 \mu\text{m}^2$  pro Metastase und einer gesamten Fläche von  $2940727 \mu\text{m}^2$  auf, als die Metastasen aus Kontrollzellen mit durchschnittlich  $67709 \mu\text{m}^2$  pro Metastase und einer Gesamtfläche von  $135418 \mu\text{m}^2$  (vgl. Abbildung 14D und E).

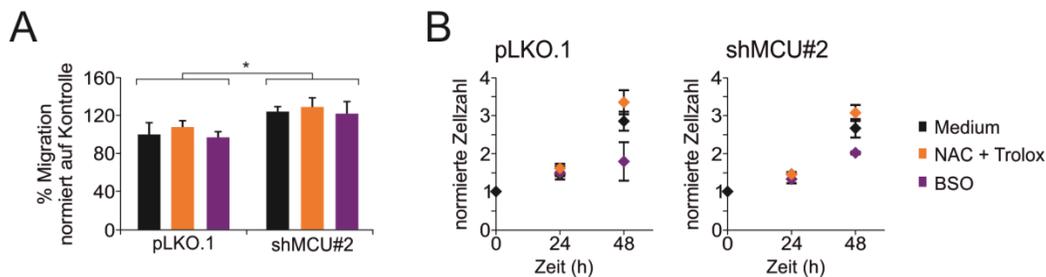


**Abbildung 14: Metastasierung von 1205Lu Melanomzellen *in vivo***; A: Exemplarische Abbildung von Metastasen in Gewebeschnitten von Lungen aus Mäusen der in Punkt 4.8 beschriebenen Versuchsreihe. Aus den entnommenen Lungen wurden Paraffinschnitte angefertigt, eine HE-Färbung durchgeführt und die Schnitte mit Hilfe eines Axio Scan.Z1 Mikroskops eingescannt. B-E: Quantitative Auswertung der entdeckten Metastasen in den untersuchten Lungenschnitten anhand des prozentualen Anteils an Tieren mit Metastasen in der Kontrollgruppe (schwarz) und der MCU-Knockdown-Gruppe (blau) (B), der Anzahl an gefundenen Lungenmetastasen (C), der Gesamtfläche aller Metastasen einer Gruppe (D) und der durchschnittlichen Fläche pro Metastase (E). *Anfertigung der Gewebeschnitte und Färbung: Alexandra Stark, Digitalisierung: Katharina Zimmermann, bioinformatische Auswertung der Bilder: Anna Höwner*

#### 4.9 Auswirkungen von pro- und antioxidativen Substanzen auf MCU-Knockdown Melanomzellen

Da bereits von Le Gal *et al.* sowie Piskounova *et al.* gezeigt werden konnte, dass sich Antioxidantien förderlich auf die Metastasierung von Melanomzellen auswirken (Le Gal *et al.*, 2015; Piskounova *et al.*, 2015), sollte untersucht werden, ob in diesem Zusammenhang eine Verbindung mit der Regulation von mitochondrialem Kalzium und ROS durch den mitochondrialen Kalziumuniporter besteht. Hierfür wurden Transwell-Migrationsexperimente durchgeführt, bei denen die Zellen gleichzeitig einer Kombination aus antioxidativ wirkendem NAC und Trolox oder oxidationsförderndem BSO

ausgesetzt waren. Wie in Abbildung 15A dargestellt ist, konnte zunächst wieder eine signifikant verstärkte Migration der 1205Lu shMCU#2 Zellen im Vergleich zu den 1205Lu Kontrollzellen festgestellt werden (vgl. Punkt 4.7). Ohne Behandlung wiesen die Knockdownzellen bereits eine Migration von 124 % verglichen mit der Kontrolle (100 %) auf. Sowohl in Kontrollzellen als auch in shMCU#2 führte die Behandlung mit den antioxidativen Substanzen NAC und Trolox zu einer tendenziell erhöhten Migration mit 108 % in Kontrollzellen und 129 % in MCU-Knockdown-Zellen. Im Gegensatz dazu konnte bei Behandlung mit BSO, was zu einer Verminderung des antioxidativen Gluthations in der Zelle führt, eine Tendenz zu einer geringeren Migration mit 97 % in Kontrollzellen und 122 % in Knockdownzellen beobachtet werden.



**Abbildung 15: Einfluss von Anti- und Prooxidantien auf die Migration und Proliferation; A:** Die Migration von 1205Lu pLKO.1 und shMCU#2 Zellen über 48 h durch eine Membran wurde unter Einfluss der Antioxidantien NAC und Trolox (orange) bzw. der prooxidativ wirkenden Substanz BSO (violett) untersucht. Die Substanzen wurden den Zellen zu Beginn der Inkubation zugegeben und die Migration mittels Calceinfärbung quantifiziert. Es wurden sechs unabhängige Experimente mit Doppelbestimmung der einzelnen Bedingungen durchgeführt und die erhaltenen Fluoreszenzwerte auf die Mediumkontrolle der pLKO.1-Linie normiert. **B:** Die Auswirkungen einer Behandlung mit NAC und Trolox (orange) bzw. BSO (violett) im Vergleich zur Mediumkontrolle (schwarz) auf die Proliferation von 1205Lu pLKO.1 und shMCU#2 Zellen wurde mittels Zellzählung nach 24 h und 48 h Behandlung untersucht. Dabei wurden drei unabhängige Experimente mit Doppelbestimmung der einzelnen Bedingungen durchgeführt. Die erhaltenen Zellzahlen wurden auf die nach 0 h gezählte Anzahl an Zellen normiert.

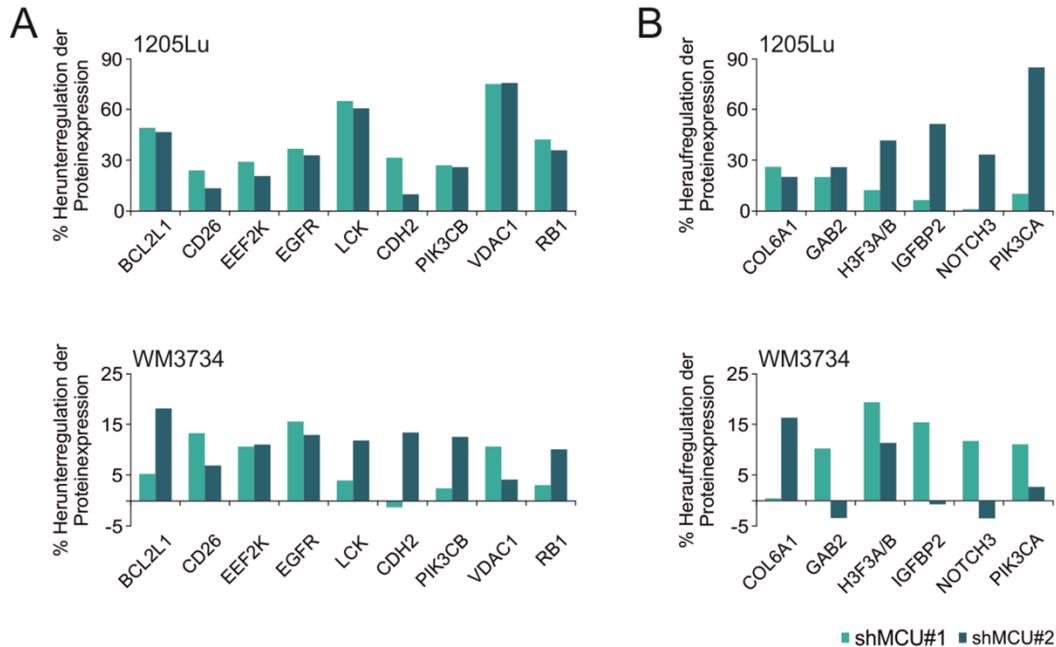
Während der Inkubation über 48 h, in denen die Migration der Zellen stattfindet, laufen die normalen Prozesse der Zelle, wie die Zellteilung, weiter ab. Da die Anzahl der Zellen einen Einfluss auf die Migration nehmen kann, wurde untersucht, ob sich die Behandlung auch auf das Wachstumsverhalten der Melanomzellen auswirkt. Bei einer Behandlung über 24 h zeigte sich kein Unterschied im Wachstum zwischen behandelten und unbehandelten Zellen, weder in der Kontroll- noch in der shMCU-Linie (vgl. Abbildung 15B). Nach 48 h Behandlung mit den unterschiedlichen Substanzen, waren leichte Unterschiede zu beobachten, die jedoch nicht signifikant waren. In den Kontrollzellen lagen mit NAC und Trolox behandelte Zellen mit einem normierten Wert von 3,35 sehr nahe an der unbehandelten Kontrolle mit einem Wert von 2,86 während mit BSO behandelte Zellen ein tendenziell geringeres Wachstum mit einem normierten Wert von 1,80 zeigten. Dieser Trend war auch in der shMCU#2-Knockdownlinie erkennbar. Mediumkontrolle und mit NAC und Trolox behandelte Zellen zeigten ähnliches Wachstum mit normierten Werten von 2,68 (Mediumkontrolle) und 3,08 (NAC + Trolox), während BSO-behandelte Zellen mit einem Wert von 2,03 eine tendenziell geringere Proliferation aufwiesen (siehe Abbildung 15B).

## 4.10 Potentielle Regulationsmechanismen durch MCU

### 4.10.1 RPPA Screen

Um Hinweise zu finden, welche weiteren molekularen Mechanismen bei verringerten MCU-Mengen zu den beobachteten Phänotypen führen könnten und wie sich die Herunterregulation von MCU auf die Expression anderer Proteine auswirkt, wurde ein RPPA Screen mit den stabilen Knockdown-Zelllinien 1205Lu und WM3734 durchgeführt. Die dabei erhaltenen Expressionswerte der untersuchten Proteine wurden anschließend auf die Werte der jeweiligen Kontrolllinie (pLKO.1) normiert, um Änderungen nach der Herunterregulation von MCU detektieren zu können. Im betrachteten Set an Proteinen konnten insgesamt 15 Kandidaten identifiziert werden, die eine deutliche Abweichung von mindestens 0,1 in ihrer Expression aufzeigten und diese mit gleicher Tendenz in beiden Zelllinien (1205Lu und WM3734) in je mindestens einer Bedingung (shMCU#1 oder shMCU#2) auftrat. In Abbildung 16 sind die normierten prozentualen Werte dieser Proteine dargestellt. Hier fällt auf, dass eine Verringerung der Proteinexpression in 1205Lu Zellen für die meisten Proteine sehr klar ersichtlich war, während in WM3734 kaum eine Reduktion der Proteinmenge erkennbar ist. Auch bei einer verstärkten Expression war dieser Effekt eindeutiger in 1205Lu als in WM3734 Zellen zu bemerken. Proteine, bei denen eine verringerte Expression bei reduzierter MCU Expression beobachtet wurde (vgl. Abbildung 16A), können verschiedensten Mechanismen in der Zelle zugeordnet werden. So konnten regulatorische Proteine wie BCL2L1 (*Bcl-2-like protein 1*) oder RB1 (*retinoblastoma-associated protein*) identifiziert werden, die Einflüsse auf Zelltod und Zellzyklus ausüben. Zudem konnte ein Einfluss auf die Expressionsstärke verschiedenster Kinasen festgestellt werden: EEF2K (*calmodulin-dependent protein kinase 3*), EGFR (*epidermal growth factor receptor*), PIK3CB (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform*, PI3K) und LCK (Tyrosin-Protein Kinase LCK). Weiterhin zeigte sich eine verringerte Expression nach MCU Knockdown bei der CD26 Peptidase, dem Adhäsionsprotein CDH2 (N-Cadherin) und dem in der äußeren mitochondrialen Membran und Plasmamembran lokalisierten Kanal VDAC1 (*voltage-dependent anion channel*).

Nach der Herunterregulation von MCU konnte jedoch nicht nur eine Reduktion der Level anderer Proteine beobachtet werden, sondern auch eine verstärkte Expression (vgl. Abbildung 16B). Viele dieser Proteine spielen eine Rolle für verschiedene Signalwege, so wie IGFBP2 (*insulin-like growth factor-binding protein 2*), NOTCH3 oder auch GAB2 (*GRB2-associated-binding protein*) und PIK3CA (*Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform*). Dabei ist eine erhöhte Expression der katalytischen PI3K alpha-Untereinheit besonders interessant, da die katalytische beta-Untereinheit eine verringerte Expression nach MCU Knockdown zeigte. Aber auch Proteine, die für Strukturen verantwortlich sind, konnten im Screen identifiziert werden. So wiesen sowohl COL6A (Collagen Typ VI) und H3F3A/B (Histon3.3) nach MCU Reduktion höhere Proteinlevel auf.



**Abbildung 16: Im RPPA Screen identifizierte Proteine, deren Expression durch die Herunterregulation von MCU beeinflusst werden könnte;** Die aus dem RPPA-Screen erhaltenen Werte wurden auf eine Abweichung von mindestens  $\pm 0,1$  zur Kontrolle untersucht. Diese Abweichung musste sowohl in 1205Lu als auch in WM3734 mit einer Tendenz in dieselbe Richtung (Herauf- bzw. Herunterregulation) in mindestens einer der beiden Knockdown-Linien shMCU#1 (hellblau) und shMCU#2 (dunkelblau) vorliegen. Zur anschaulicheren Darstellung wurde die prozentuale Herunter- bzw. Heraufregulation aus den normierten relativen Werten der Proteinexpression berechnet. **A:** Prozentuale Angabe der Herunterregulation der Expressionsstärke von BCL2L1, CD26, EEF2K, EGFR, LCK, CDH2, PIK3CB, VDAC1 und RB1 in 1205Lu (oben) und WM3734 (unten) shMCU#1 (hellblau) und shMCU#2 (dunkelblau) Linien. **B:** Prozentuale Angabe der Heraufregulation der Expressionsstärke von COL6A1, GAB2, H3F3A/B, IGFBP2, NOTCH3 und PIK3CA in 1205Lu (oben) und WM3734 (unten) Linien.

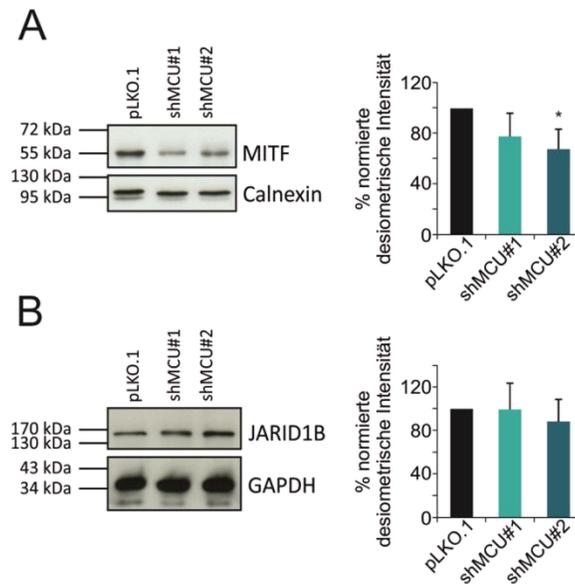
## 4.10.2 Überprüfung des RPPA Hits VDAC1 und anderer potentieller Regulatoren im Western Blot

### 4.10.2.1 MITF und JARID1B – Marker für verschiedene Phänotypen

Sowohl MITF als auch JARID1B gelten als Marker für Phänotypen, die Melanome aufzeigen und zwischen denen sie wechseln können. Erhöhte Level an MITF werden häufig mit einer verstärkten Proliferation von Melanomzellen verknüpft, weshalb MITF als Marker für einen proliferativen Phänotyp dient. Im Gegensatz dazu wurden erhöhte Mengen an JARID1B in Melanomzellen gefunden, die zum sogenannten „slow-cycling“-Phänotyp gehören, d.h. Zellen, die nur eine sehr geringe Proliferationsrate aufweisen und einen invasiven Charakter zeigen.

Um zu überprüfen, ob MCU eine Auswirkung auf den Wechsel zwischen den verschiedenen Phänotypen in Melanomzellen hat, wurden die Proteinlevel dieser beiden Proteine in stabilen MCU-Knockdown-Linien anhand von Western Blot Analysen untersucht. Wie in Abbildung 17A in einem repräsentativen Blot dargestellt, konnte in Blots, die auf MITF geprobt wurden, in allen Spuren eine deutliche Bande mit einer Größe von ungefähr 55 kDa detektiert werden. Dabei ist die Bande der

Kontrollzellen stärker als die Banden der beiden shMCU-Linien. In der Quantifizierung der Expressionsstärke wurde deutlich, dass geringere Mengen an MITF nach Herunterregulation von MCU vorlagen. Dabei zeigte die shMCU#2-Linie eine signifikante Reduktion der MITF-Level auf 68 % im Vergleich zur Kontrolle, während die shMCU#1-Linie nur eine Reduktion auf 78 % aufwies. Für Zellysate, die auf JARID1B getestet wurden, konnten in allen Spuren Banden mit einer Größe von ca. 170-180 kDa detektiert werden (siehe Abbildung 17B). Dabei konnte keine Abhängigkeit der Expressionsstärke von JARID1B von der MCU Expression beobachtet werden.

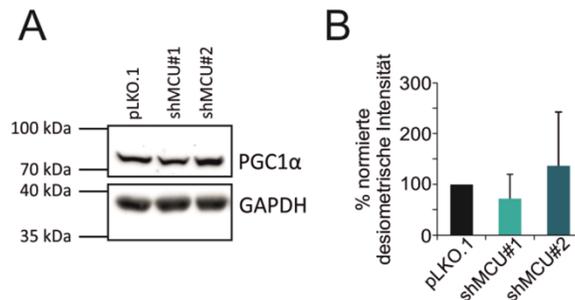


**Abbildung 17: Expression der Marker MITF und JARID1B auf Proteinebene unter dem Einfluss der Herunterregulation von MCU; A:** Die Proteinexpression von MITF wurde mittels Western Blot analysiert. Lysate der stabilen WM3734 pLKO.1, shMCU#1 und shMCU#2 Linien wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und Banden durch einen MITF-spezifischen Antikörper detektiert. Die quantitative Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mittels densitometrische Bestimmung der Bandendichte und Normierung der Werte auf die Ladekontrolle Calnexin und anschließender Normierung auf die pLKO.1-Kontrolllinie. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot (links) sowie die Quantifizierung aus vier unabhängigen Experimenten (rechts). **B:** Abbildung eines exemplarischen Western Blots in dem die Lysate von stabilen WM3734 pLKO.1, shMCU#1 und shMCU#2 aufgetrennt und auf JARID1B geprobt wurden (links), sowie der quantitativen Auswertung der Bandenstärke nach Normierung auf die Ladekontrolle GAPDH und anschließender Normierung auf die zugehörige pLKO.1-Linie (rechts) (n = 5). *Experimentelle Durchführung der Western Blots: Alexandra Stark (A) bzw. Alexandra Stark und Katharina Zimmermann (B), Analyse: Katharina Zimmermann*

#### 4.10.2.2 PGC1 $\alpha$

Es wurde bereits gezeigt, dass MITF als direkter Regulator der Expression von PGC1 $\alpha$  fungiert (Haq et al, 2013a) und somit eine Wirkung auf den oxidativen Metabolismus von Melanomzellen hat. PGC1 $\alpha$  ist ein transkriptionaler Koaktivator, der die Expression verschiedener Gene, die am Energiemetabolismus und der mitochondrialen Biogenese beteiligt sind, kontrolliert. So zeigen PGC1 $\alpha$  positive Melanome beispielsweise einen erhöhten mitochondrialen Energiemetabolismus und eine verstärkte Kapazität in ihrer ROS-Detoxifizierung (Vazquez et al, 2013).

Da wie in Punkt 4.10.2.1 beschrieben eine Änderung der Proteinlevel von MITF in WM3734 Zellen mit herunterreguliertem MCU festgestellt werden konnte, sollte untersucht werden, ob sich dies auch auf die Proteinexpression von PGC1 $\alpha$  auswirkt. In Abbildung 18A ist ein repräsentativer Western Blot, der auf PGC1 $\alpha$  geprobt wurde, dargestellt. Bei allen Lysaten konnten Banden mit einer Höhe zwischen 80 und 90 kDa detektiert werden, die PGC1 $\alpha$  entspricht, das eine vorhergesagte Größe von 91 kDa besitzt. In den einzelnen Versuchen schwankte die Bandenstärke hier allerdings erheblich, was auch durch die hohen Standardabweichungen der Quantifizierung (siehe Abbildung 18B) deutlich wird. Aufgrund der starken Schwankungen zwischen den einzelnen Experimenten konnte kein erkennbarer Unterschied in der PGC1 $\alpha$  Expression zwischen Kontrollzellen und MCU-Knockdown-Linien festgestellt werden.



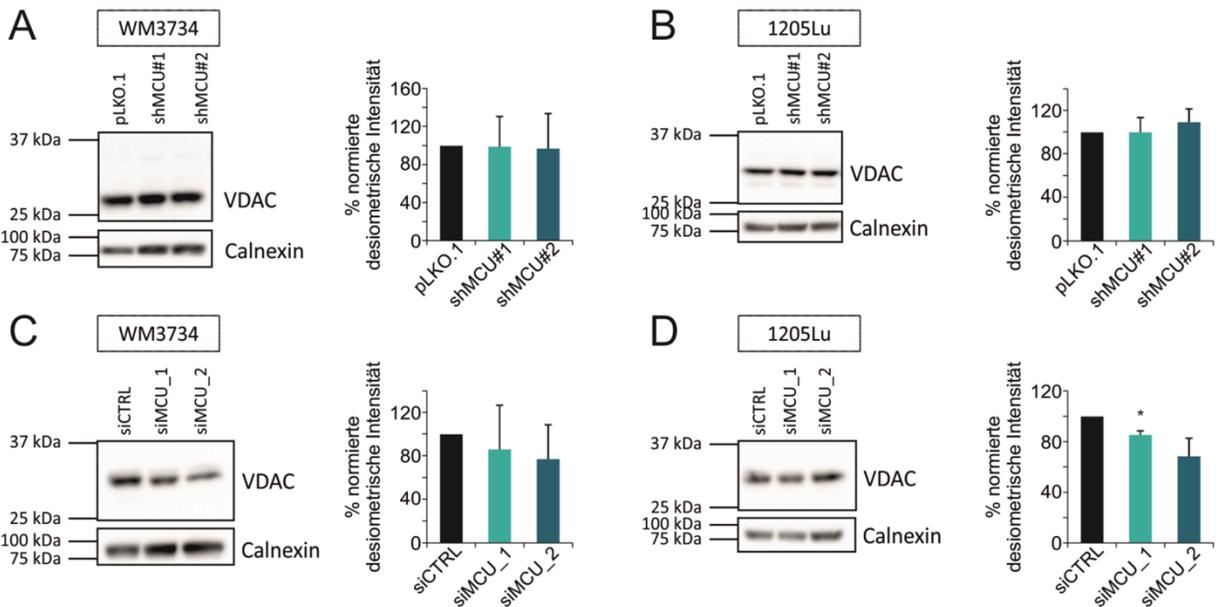
**Abbildung 18: Expression von PGC1 $\alpha$  auf Proteinebene unter dem Einfluss der Herunterregulation von MCU;** Die Proteinexpression von PGC1 $\alpha$  wurde mittels Western Blot analysiert. **A:** Abbildung eines exemplarischen Western Blots in dem die Lysate von stabilen WM3734 pLKO.1, shMCU#1 und shMCU#2 aufgetrennt und auf PGC1 $\alpha$  geprobt wurden. **B:** Quantitative Bestimmung der Proteinmenge mittels densitometrischer Bestimmung der Bandendichte und Normierung der Werte auf die Ladekontrolle GAPDH und anschließender Normierung auf die pLKO.1-Kontrolllinie (n = 4). *Experimentelle Durchführung der Western Blots: Alexandra Stark; Analyse: Katharina Zimmermann*

#### 4.10.2.3 VDAC1

Mit Hilfe des RPPA Screens (siehe 4.10.1) wurden verschiedene interessante Kandidaten identifiziert, deren Proteinlevel abhängig von dem vorhandenen Level an MCU bzw. von weiteren, durch MCU gesteuerten Mechanismen, sein könnten. Ein vielversprechender Kandidat war hierbei VDAC1, der sogenannte „*voltage dependent anion channel*“, für den eine deutliche Herunterregulation in stabilen 1205Lu Knockdown-Linien zu beobachten war. VDAC1 spielt auch eine wichtige Rolle für die mitochondriale Kalziumaufnahme, da es in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert ist und dort die Funktion eines Ionenkanals einnimmt.

Zunächst wurden die stabilen MCU-Knockdown-Linien auf ihre Expression von VDAC1 mittels Western Blot untersucht, da diese auch für den RPPA Screen eingesetzt worden waren. Hier zeigte sich für WM3734 shMCU#1 und shMCU#2 mit 99 %  $\pm$  32 % und 97 %  $\pm$  37 % keine Änderung in der VDAC1 Proteinmenge (siehe Abbildung 19A). Auch in der RPPA Analyse konnten bereits nur geringe Veränderungen in diesen Zelllinien festgestellt werden (vgl. Punkt 4.10.1). Überraschenderweise wiesen auch die Linien 1205Lu shMCU#1 und shMCU#2 mit 100 %  $\pm$  14 % und 109 %  $\pm$  12 % sehr ähnliche Level an VDAC1 wie die Kontrolllinie auf (siehe Abbildung 19B), obwohl diese im RPPA Datensatz eine deutliche Reduktion der Proteinexpression zeigten. Um feststellen zu können, ob der

in der RPPA Analyse beobachtete Effekt nur über kurze Dauer nach MCU Herunterregulation messbar ist, wurden die beiden Linien WM3734 und 1205Lu im transienten MCU Knockdown mit siRNA überprüft. Für WM3734 konnte eine tendenzielle Reduktion der VDAC1 Expression auf 86 % (siMCU\_1) bzw. 77 % (siMCU\_2) beobachtet werden, wobei diese jedoch nicht signifikant war (vgl. Abbildung 19C). Auch in der 1205Lu Melanomlinie zeigte sich nach Herunterregulation von MCU mit siRNA eine Reduktion von VDAC1. Hierbei reduzierte siMCU\_1 die VDAC1-Menge signifikant auf 85 %  $\pm$  4 %, während siMCU\_2 eine Reduktion auf 69 %  $\pm$  14 % verursachte (siehe Abbildung 19D).



**Abbildung 19: Expression von VDAC1 auf Proteinebene unter dem Einfluss der Herunterregulation von MCU; A-B:** Analyse der VDAC1 Proteinexpression mittels Western Blot bei stabiler MCU Herunterregulation. Lysate der stabilen WM3734 pLKO.1, shMCU#1 und shMCU#2 Linien (A) bzw. der stabilen 1205Lu pLKO.1, shMCU#1 und shMCU#2 Linien (B) wurden elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und Banden durch einen  $\alpha$ -VDAC1 Antikörper detektiert. Die quantitative Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mittels densitometrischer Bestimmung der Bandendichte und Normierung der Werte auf die Ladekontrolle Calnexin und anschließender Normierung auf die jeweilige pLKO.1-Kontrolllinie. Dargestellt ist je ein repräsentativer Western Blot (links) sowie die Quantifizierung aus vier (1205Lu) bzw. sechs (WM3734) unabhängigen Experimenten (rechts). **C-D:** Analyse der VDAC1 Proteinexpression bei transienter MCU Herunterregulation durch siRNA. 72 h nach siRNA-Transfektion in WM3734 (C) und 1205Lu (D) Zellen wurden Proben zur Gewinnung des Gesamtproteins genommen. Die gewonnenen Zelllysate wurden im Western Blot aufgetrennt und VDAC1 Banden durch einen spezifischen Antikörper detektiert. Die quantitative Bestimmung der Proteinmenge erfolgte mittels densitometrischer Bestimmung der Bandendichte und Normierung der Werte auf die Ladekontrolle Calnexin und anschließender Normierung auf die jeweilige pLKO.1-Kontrolllinie. Dargestellt ist je ein repräsentativer Western Blot (links) sowie die Quantifizierung aus drei (1205Lu) bzw. fünf (WM3734) Experimenten (rechts). *Experimentelle Durchführung der Western Blots: Alexandra Stark (C und D) bzw. Alexandra Stark und Katharina Zimmermann (A), Analyse: Katharina Zimmermann*

#### 4.11 Sensitivität auf die Inhibition verschiedener Signalwege

Ein großes Problem bei der Behandlung von metastasierten Melanomen ist das sehr häufige Auftreten von Rezidiven, die durch die Entwicklung von Resistenzen gegenüber den eingesetzten Medikamenten auftreten. Um dies zu verhindern, wird nach wichtigen Mechanismen gesucht, die diese Resistenzen vermitteln. Werden diese Mechanismen identifiziert, können diese blockiert und somit

die Sensitivität gegenüber der Behandlung wieder hergestellt werden (Haq et al, 2013b; Roesch et al, 2013). Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob die Herunterregulation von MCU einen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber verschiedenen Inhibitoren ausübt.

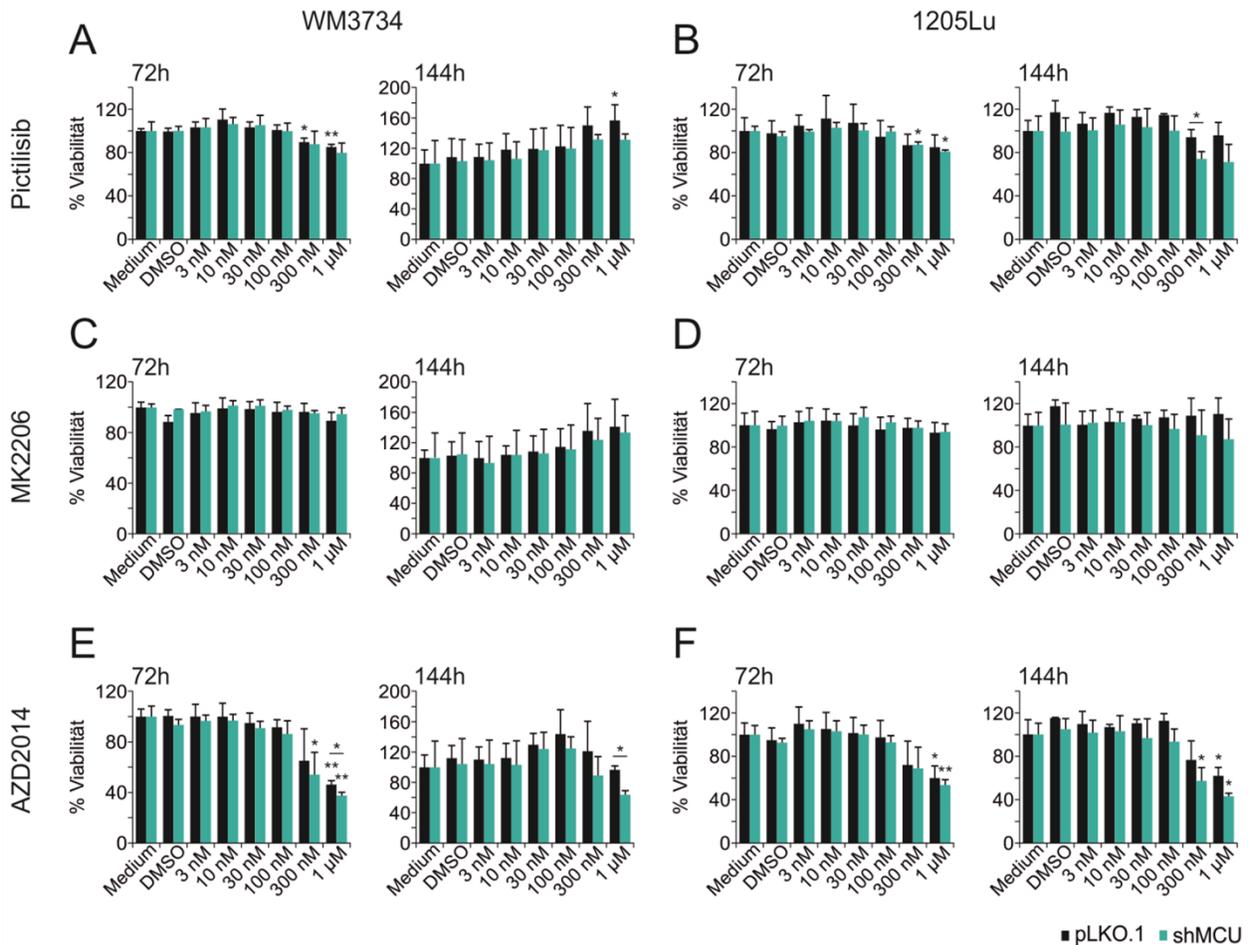
#### 4.11.1 Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges

Zunächst wurden Inhibitoren des PI3K/Akt-Signalweges und des dadurch regulierten Faktors mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), die in klinischen Studien bereits gute Effekte erzielen konnten, auf ihre zytotoxische Wirkung gegenüber WM3734 und 1205Lu pLKO.1, shMCU#1 und shMCU#2 getestet. Bei der Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges über verschiedene Rezeptoren, z.B. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Zytokinrezeptoren, kommt es zunächst zu einer Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), die Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat (PIP3) bildet. Durch Bindung von PIP3 an die Proteinkinase B (Akt) wird diese phosphoryliert und aktiviert. Aktiviertes Akt ist wiederum in der Lage mTOR zu phosphorylieren und somit zu aktivieren. Die Aktivierung von mTOR führt letztendlich zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, die für Wachstum und Proliferation der Zelle von Bedeutung sind. Dieser Signalweg ist häufig in Tumoren konstitutiv aktiv und deshalb ein interessantes Angriffsziel zur Tumorbehandlung.

Pictilisib setzt am Beginn des Signalweges an und ist ein direkter Inhibitor von PI3K. Sowohl in WM3734 als auch in 1205Lu Zellen war nach einer Behandlung über 72 h ab einer Konzentration von 300 nM eine Reduktion in der Viabilität der Zellen zu beobachten (siehe Abbildung 20A und B links). Dabei reduzierte sich die Viabilität in WM3734 in der MCU-Knockdown-Linie auf 88 % (300 nM) bzw. 80 % (1  $\mu$ M) und in der Kontrolllinie pLKO.1 signifikant auf 90 % (300 nM) bzw. 85 % (1  $\mu$ M). In 1205Lu konnten Werte von 87 % (300 nM) bzw. 85 % (1  $\mu$ M) für die Kontrolllinie und 87 % (300 nM) bzw. 81 % (1  $\mu$ M) für die shMCU-Linie festgestellt werden. Dabei konnte sowohl in WM3734 als auch in 1205Lu kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und MCU Herunterregulation beobachtet werden. Nach einer Behandlung über sechs Tage zeigte sich in WM3734 pLKO.1 interessanterweise eine Tendenz zu einem verbesserten Wachstum der behandelten Zellen, das sich bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M signifikant auf 157 % erhöhte (vgl. Abbildung 20A rechts). Auch in der shMCU-Linie ließ sich hier eine leichte Tendenz beobachten, die jedoch geringer war als in der Kontrolllinie. Auch 1205Lu pLKO.1 Zellen wiesen nach 144h eine leichte Tendenz zu einem verbesserten Wachstum bis zu einer Konzentration von 100 nM auf (vgl. Abbildung 20B rechts). Im Gegensatz zu WM3734 zeigte sich hier aber wie auch nach 72 h bei hohen Konzentrationen eine Reduktion des Wachstums auf 94 % (300 nM) bzw. 96 % (1  $\mu$ M) in pLKO.1 und 75 % (300 nM) bzw. 72 % (1  $\mu$ M) in shMCU Zellen.

Alle Isoformen der Proteinkinase B (Akt1, Akt2 und Akt3) die über PI3K aktiviert werden, können durch MK2206 inhibiert werden, wodurch es zu einer Verhinderung der Autophosphorylierung und der Phosphorylierung von Zielmolekülen kommt. Nach einer Behandlung über 72 h konnte bei keiner der verwendeten Konzentrationen in WM3734 und in 1205Lu Zellen eine Auswirkung auf die Viabilität festgestellt werden (siehe Abbildung 20C und D links). Wie bereits bei der Inhibition von PI3K durch Pictilisib zeigte sich in WM3734 nach 144 h Behandlung eine leichte Tendenz zu einem verbesserten Wachstum mit steigender Konzentration. Bei der Höchstkonzentration von 1  $\mu$ M lie-

ßen sich Werte von durchschnittlich 141 % (pLKO.1) und 134 % (shMCU#2) feststellen (siehe Abbildung 20C rechts). In 1205Lu konnte auch nach 144 h keine Auswirkung auf die Viabilität in der Kontrolllinie pLKO.1 beobachtet werden, während sie sich in der MCU-Knockdown-Linie bei hohen Konzentrationen tendenziell verringerte auf Werte von 91 % (300 nM) und 87 % (1 µM) (siehe Abbildung 20D rechts).



**Abbildung 20: Viabilität von WM3734 und 1205Lu Zellen nach Behandlung mit Inhibitoren des PI3K/Akt-Signalweges;** Stabile WM3734 Zellen (A, C und E) sowie stabile 1205Lu Zellen (B,D und F) wurden über 72 h (jeweils links) bis zu 144 h (jeweils rechts) mit den Inhibitoren Pictilisib, MK2206 oder AZD2014 in Konzentrationen von 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM bis 1 µM behandelt. Die Viabilität wurde mit Hilfe eines Resazurinumsatz-Assays in je drei unabhängigen Experimenten untersucht, wobei die erhaltenen Fluoreszenzwerte zunächst auf ihre entsprechenden 0 h Werte und anschließend auf die jeweilige Mediumkontrolle zu jedem untersuchten Zeitpunkt normiert wurden. Signifikanzen (\*) ohne eingezeichneten Bezug sind auf die jeweilige Mediumkontrolle der Zelllinie zu beziehen **A-B:** Behandlung mit dem PI3K-Inhibitor Pictilisib. **C-D:** Behandlung mit dem Akt-Inhibitor MK2206. **E-F:** Behandlung mit dem mTOR-Inhibitor AZD2014. *Experimentelle Durchführung der Assays: Alexandra Stark, Sandra Janku und Katharina Zimmermann; Analyse: Katharina Zimmermann*

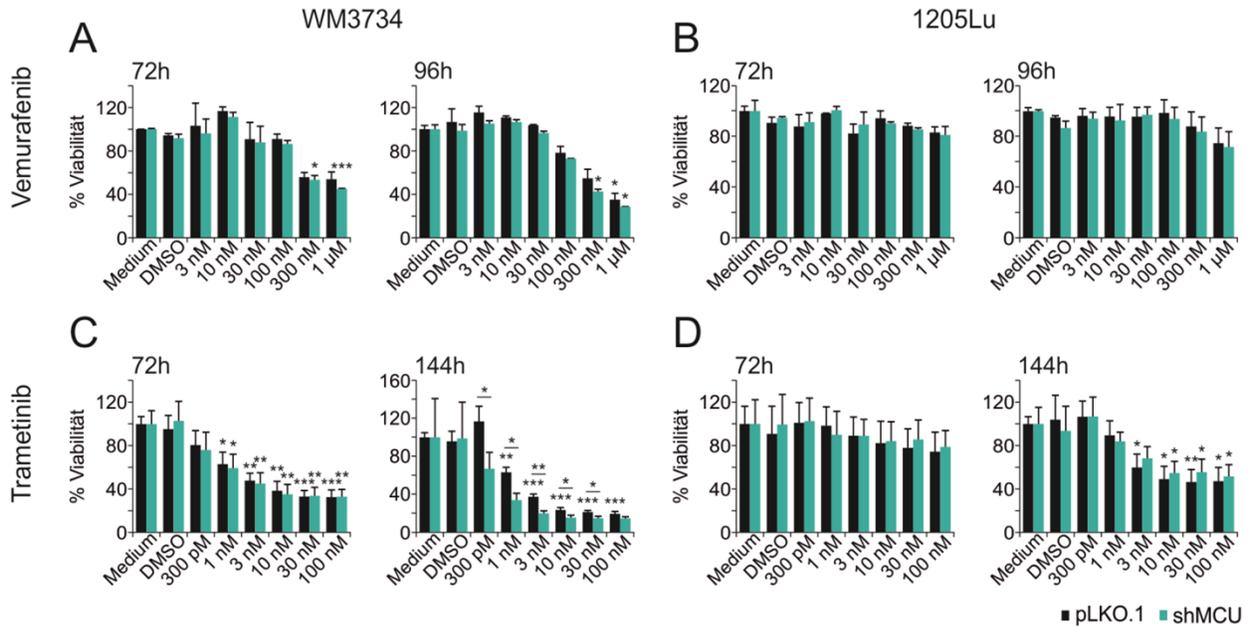
Ein durch Akt phosphoryliertes und somit aktiviertes Zielmolekül ist mTOR, welches als Kinase verschiedene Transkriptionsfaktoren und andere Moleküle durch Phosphorylierung aktiviert. Damit stellt mTOR einen der letzten Schritte des PI3K/Akt-Signalweges dar und kann spezifisch durch

AZD2014 inhibiert werden. Bei Konzentrationen von 300 nM und 1  $\mu$ M konnten nach 72 h Behandlung sowohl in WM3734 als auch in 1205Lu deutliche Verringerungen der Viabilität gemessen werden (vgl. Abbildung 20E und F links). In WM3734 reduzierte sich die Viabilität in pLKO.1 auf 65 % (300 nM) bzw. 46 % (1  $\mu$ M) und in shMCU signifikant auf 54 % (300 nM) bzw. 38 % (1  $\mu$ M). Dabei reagierten die Zellen mit herunterreguliertem MCU bei der Höchstkonzentration stärker auf die Behandlung als die Kontrollzellen. In 1205Lu verringerten sich die Werte in der Kontrolllinie auf 72 % (300 nM) bzw. 60 % (1  $\mu$ M) und in der MCU-Knockdown-Linie auf 69 % (300 nM) bzw. 54 % (1  $\mu$ M). Wie bereits bei der Behandlung mit Pictilisib und MK2206 ließ sich nach sechstägiger Behandlung eine leichte Tendenz zu einem vermehrten Wachstum bei niedrigen Konzentrationen in WM3734 beobachten (vgl. Abbildung 20E rechts). Während allerdings bei einer Konzentration von 300 nM die Kontrolllinie noch ein besseres Wachstum mit 121 % aufwies, war es in der shMCU-Linie bereits auf 90 % reduziert. Bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M reduzierten sich die Werte für pLKO.1 durchschnittlich auf 97%, während die Viabilität in der MCU-Knockdown-Linie bei nur noch 64 % lag und sich so signifikant von der Kontrolllinie unterschied. Auch in 1205Lu zeigte sich tendenziell eine höhere Sensitivität der Knockdown-Linie gegenüber der Kontrolllinie. So reduzierte sich die Viabilität der pLKO.1 Zellen auf 77 % (300 nM) bzw. 62 % (1  $\mu$ M), während sie in shMCU bereits auf nur 57 % (300 nM) bzw. 43 % (1  $\mu$ M) verringert war (siehe Abbildung 20F rechts).

#### 4.11.2 Inhibition des MAPK-Signalweges

In einem großen Anteil an Melanomen ist eine Mutation in BRAF zu finden, die zu einer konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signalweges führt. Durch die Mutation befindet sich BRAF in einem dauerhaft aktiven Zustand, in dem es in der Lage ist MEK1 und MEK2 (MAPK/ERK Kinase 1/2) durch Phosphorylierung zu aktivieren. Diese wiederum aktivieren ERK (*extracellular-signal-regulated kinase*), was letztendlich zur unkontrollierten Proliferation der Zellen führt.

Ein bereits länger zur Therapie eingesetzter Wirkstoff ist der BRAF-Inhibitor Vemurafenib. Wie in Abbildung 21A (links) dargestellt, führte eine Behandlung mit Konzentrationen von 300 nM und 1  $\mu$ M in BRAF V600E mutierten WM3734 Zellen nach 72h zu einer verringerten Viabilität. Bei Kontrollzellen sanken die prozentualen Werte auf 56 % (300 nM) bzw. 54 % (1  $\mu$ M), in Zellen mit stabil herunterreguliertem MCU signifikant auf 53 % (300 nM) bzw. 45 % (1  $\mu$ M). Niedrigere Konzentrationen hatten keinen deutlichen Effekt auf die Viabilität. Ähnliche Ergebnisse waren nach 96 h Vemurafenib-Behandlung zu beobachten (vgl. Abbildung 21A rechts): pLKO.1 wiesen nur 78 % (100 nM), 55 % (300 nM) bzw. 35 % (1  $\mu$ M) Viabilität im Vergleich zur Mediumkontrolle auf, shMCU Zellen reduzierten ihre Werte auf 73 % (100 nM), 43 % (300 nM) bzw. 29 % (1  $\mu$ M). Im Gegensatz zu WM3734 zeigten stabile 1205Lu Zellen kaum eine Sensitivität gegenüber Vemurafenib, obwohl sie auch eine BRAF V600E Mutation tragen. Hier konnte bei der höchsten Konzentration von 1  $\mu$ M nur eine leichte Reduktion nach 72 h auf 83 % (pLKO.1) bzw. 81 % (shMCU) und nach 96h auf 75 % (pLKO.1) bzw. 72 % (shMCU) festgestellt werden (vgl. Abbildung 21B).



**Abbildung 21: Viabilität von WM3734 und 1205Lu Zellen nach Behandlung mit Inhibitoren des MAPK-Signalweges; A-B:** Stabile WM3734 Zellen (A) und stabile 1205Lu Zellen (B) wurden über 72 h (links) bis 96 h (rechts) mit dem BRAF-Inhibitor Vemurafenib mit Konzentrationen von 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM bis 1 µM behandelt. Die Viabilität wurde mit Hilfe eines Resazurinumsatz-Assays in zwei unabhängigen Experimenten untersucht, wobei die erhaltenen Fluoreszenzwerte zunächst auf ihre entsprechenden 0 h Werte und anschließend auf die jeweilige Mediumkontrolle zu jedem untersuchten Zeitpunkt normiert wurden. **C-D:** Behandlung von WM3734 (C) und 1205Lu (D) Zellen über 72 h (links) bzw. 144 h (rechts) mit 300 pM, 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM und 100 nM des MEK-Inhibitors Trametinib. Die Viabilität wurde mittels Resazurinumsatz-Assay in drei unabhängigen Experimenten bestimmt und die erhaltenen Fluoreszenzwerte zunächst auf ihre entsprechenden 0 h Werte und anschließend auf die jeweilige Mediumkontrolle zu jedem untersuchten Zeitpunkt normiert. Signifikanz (\*) ohne eingetragenen Bezug sind auf die jeweilige Mediumkontrolle der Zelllinie zu beziehen. *Experimentelle Durchführung der Assays: Alexandra Stark, Sandra Janku und Katharina Zimmermann; Analyse: Katharina Zimmermann*

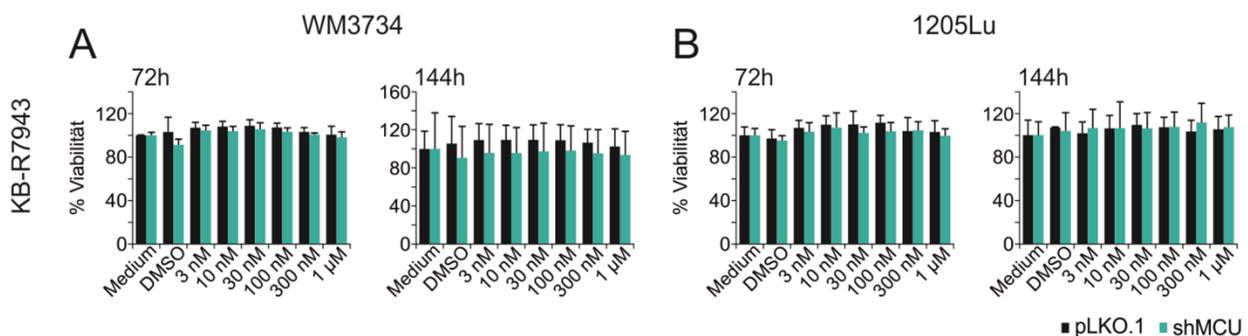
Wie bereits beschrieben, kommt es durch BRAF zu einer Aktivierung der MAPK-Kinase MEK. Um an dieser Stelle des Signalweges einzugreifen, wird der MEK-Inhibitor Trametinib eingesetzt, der auch bereits in der Melanomtherapie zugelassen wurde. Bereits nach einer Behandlung über 72 h verringerte sich die Viabilität in stabilen WM3734 Zellen stark (siehe Abbildung 21C links). Schon ab einer geringen Konzentration von 1 nM konnte eine signifikante Reduktion auf 63 % (pLKO.1) bzw. 59 % (shMCU) beobachtet werden. Die stärksten Auswirkungen ließen sich sowohl bei Konzentrationen von 30 nM als auch bei 100 nM messen: die Werte sanken sowohl in pLKO.1 als auch in shMCU auf 33 % bzw. 34 % (shMCU mit 30 nM). Nach einer Behandlung über sechs Tage verstärkten sich die beobachteten Effekte (vgl. Abbildung 21C rechts). Dabei reagierten Zellen mit MCU Herunterregulation signifikant sensibler auf die jeweiligen Konzentrationen Trametinib als die Kontrolllinie pLKO.1. Die Viabilität reduzierte sich bei 1 nM auf 63 % (pLKO.1) bzw. 34 % (shMCU), bei 3 nM auf 38 % (pLKO.1) bzw. 20 % (shMCU), bei 10 nM auf 24 % (pLKO.1) bzw. 15 % (shMCU) und bei 30 nM auf 21 % (pLKO.1) bzw. 15 % (shMCU). Bei 15 % scheint eine maximale Reduktion erreicht zu sein, da sich auch bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 100 nM keine weitere Inhibition in shMCU erreichen ließ. Wie in Abbildung 21D erkennbar ist, zeigten 1205Lu Zellen eine deutlich ge-

ringere Sensitivität gegenüber Trametinib als WM3734. Nach 72 h Behandlung führte selbst die höchste eingesetzte Konzentration von 100 nM nur zu einer Verringerung der Viabilität auf 74 % (pLKO.1) bzw. 79 % (shMCU) (siehe Abbildung 21D links). Nach einer Behandlung über 144 h war eine deutlichere Inhibition erkennbar (vgl. Abbildung 21D rechts). Ab einer Konzentration von 10 nM war sowohl in 1205Lu als auch in WM3734 eine signifikante Reduktion erkennbar. In der 1205Lu Kontrolllinie wurden Werte von 49 % (10 nM) und 47 % (30 nM und 100 nM) erreicht, in der shMCU-Linie Werte von 55% (10 nM), 56 % (30 nM) und 52 % (100 nM).

#### 4.11.3 Inhibition des Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauschers NCX

Da der mitochondriale Kalziumeinstrom nicht nur durch den Uniporter-Komplex bestimmt wird, sondern auch durch Faktoren wie den zytosolischen Kalziumkonzentrationen oder das Membranpotential, sollte untersucht werden, wie sich eine weitere Manipulation der Kalziumhomöostase auf die Viabilität der Melanomzellen auswirkt. Hierfür wurde KB-R7943, ein Inhibitor des Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauschers NCX, eingesetzt. KB-R7943 blockiert den reversen Modus von NCX, bei dem Ca<sup>2+</sup> in die Zelle transportiert wird (Iwamoto et al, 1996). Neben dieser Hauptwirkung konnte allerdings auch noch eine inhibierende Wirkung von KB-R7943 auf verschiedene Kalziumeinstromwege, wie z.B. Ryanodinrezeptoren (Barrientos et al, 2009) oder SOCE (Arakawa et al, 2000) und auf die Öffnung der mitochondrialen PTP beobachtet werden (Wiczler et al, 2014).

Wie in Abbildung 22A zu sehen ist, hatte die Behandlung mit KB-R7943 in WM3734 Zellen weder nach 72 h, noch nach 144 h Behandlung eine Auswirkung auf die Viabilität der Zellen, unabhängig von der MCU-Expression. Auch in 1205Lu pLKO.1 und shMCU Zellen zeigte sich keine Änderung der Werte zur Mediumkontrolle zu beiden untersuchten Zeitpunkten (vgl. Abbildung 22B).



**Abbildung 22: Viabilität von WM3734 und 1205Lu Zellen nach Behandlung mit KB-R7943;** Behandlung über 72 h (links) bzw. 144 h (rechts) mit dem NCX-Inhibitor KB-R7943 mit Konzentrationen von 3 nM, 10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM bis 1 µM. Die Viabilität wurde mittels Resazurinumsatz-Assay in drei unabhängigen Experimenten bestimmt und die erhaltenen Fluoreszenzwerte zunächst auf ihre entsprechenden 0 h Werte und anschließend auf die jeweilige Mediumkontrolle zu jedem untersuchten Zeitpunkt normiert. **A:** Viabilität von WM3734 pLKO.1 und shMCU nach Behandlung. **B:** Viabilität von 1205Lu pLKO.1 und shMCU nach Behandlung. *Experimentelle Durchführung der Assays: Alexandra Stark, Sandra Janku und Katharina Zimmermann; Analyse: Katharina Zimmermann*



## 5. Diskussion

### 5.1 Expressionsmuster von MCU und seinen regulierenden Komponenten in Melanozyten und Melanomzellen

MCU und einige seiner Regulatoren sind in menschlichem Gewebe ubiquitär exprimiert. Allerdings variieren die Expressionsmuster der einzelnen Komponenten abhängig von Zelltyp und Gewebe (HumanProteinAtlas, 2017; Paillard et al, 2017). Zudem scheinen auch Kalziumsignale eine regulatorische Wirkung auf die mRNA Expression der Komponenten zu haben (Markus et al, 2016). Aus diesem Grund sollten zu Beginn dieser Arbeit die Expressionslevel der einzelnen Komponenten in Melanomzellen und primären Melanozyten untersucht und miteinander verglichen werden. Bei Betrachtung der MCU Expression auf Proteinebene (siehe Abbildung 3) lassen sich die verschiedenen Melanomzelllinien in drei Gruppen mit niedriger, hoher oder mittlerer Expression einteilen. Interessanterweise waren in der Gruppe mit der höchsten MCU-Expression mit MelJuso, WM793 und WM1366 Linien vertreten, die alle aus Primärtumoren stammen. Im Gegensatz dazu befanden sich alle Xenograft-Linien in der Gruppe mit der niedrigsten Expression von MCU, während sich in hauptsächlich aus Metastasen stammenden Melanomlinien eine mittlere Expression detektieren ließ (WM983B, WM3734, Sk-Mel-5, WM35). Mit zunehmendem Grad der Metastasierung zeigt sich also eine abnehmende Expression von MCU. Diese Ergebnisse erinnern an das TRPM1-Expressionsmuster, welches in Melanozyten noch hoch exprimiert wird und mit fortschreitendem Stadium und höherem metastatischem Potential in immer geringeren Mengen zu finden ist (Deeds et al, 2000; Duncan et al, 2001). Hierbei muss allerdings beachtet werden, dass die Daten zu TRPM1 anhand von primärem Patientenmaterial erhoben wurden, während in dieser Arbeit etablierte Melanomlinien verwendet wurden. Zum Teil werden diese bereits seit mehreren Jahren in Kultur gehalten, wobei es zu weiteren Mutationen und Veränderungen der Linien kommen kann. Melanome sind zudem auch sehr heterogen, was zusätzlich zu einer Variabilität der Daten führen kann. Um eine Korrelation zwischen der Expression von MCU und der Tumorprogression zu bestätigen, sollten Daten aus primärem Material hinzugezogen werden. In primären Melanozyten konnten unterschiedliche Level an MCU detektiert werden (siehe Abbildung 3). Passend zu der Hypothese, dass mit zunehmender Malignität die Menge an MCU sinkt, ließen sich in NHEM-1 hohe und NHEM-2 mittlere Proteinmengen an MCU feststellen, wobei hier eine starke Streuung der Daten vorlag. Auch auf mRNA-Ebene zeigten Melanozyten tendenziell eine etwas stärkere Expression als die untersuchten Melanomlinien. Da primäre Melanozyten nicht immortalisiert sind, können sie nur über einen begrenzten Zeitraum in Kultur gehalten werden. Die Zeitpunkte und Zeitspanne der Probenentnahmen könnten also bereits einen Einfluss auf die erhaltenen Daten haben und größere Abweichungen zwischen einzelnen Experimenten erklären.

Für die Kalziumaufnahme in die Mitochondrien sind nicht nur die Expressionslevel von MCU entscheidend, sondern auch die Expression seiner Regulatoren und ihrer Verhältnisse zueinander (Paillard et al, 2017). Wie von Paillard *et al.* gezeigt, führen die Unterschiede in den Expressionsverhältnissen zu gewebsspezifischen Kalziumphänotypen und können durch gezielte Überexpression einzelner Komponenten im Kalziumphänotyp eines anderen Zelltyps resultieren. In Herz- und Skelettmuskeln liegt bedingt durch eine niedrige MICU1-Expression eine geringe MICU1/MCU-Ratio vor. In diesen Zellen ist der benötigte Grenzwert an Kalzium zur Aufhebung der Inhibition des Ka-

nals vergleichsweise niedrig, wobei die Kooperativität der Aktivierung verringert ist. Durch eine Überexpression von MICU1 verschiebt sich die MICU1/MCU-Ratio zu höheren Werten, die denen von Leberzellen ähnlich sind und der Kalziumphänotyp gleicht sich dem von Hepatozyten an, was eine kontraktile Dysfunktion des Herzens zur Folge hat (Paillard et al, 2017). Vergleicht man die Expressionsverhältnisse von MICU1 und MCU in Melanozyten und Melanomlinien, ist in Melanozyten eine höhere MICU1/MCU-Ratio feststellbar als in Melanomzellen (vgl. Abbildung 3). Dementsprechend sollten Melanozyten einen Kalziumphänotyp ähnlich dem von Paillard *et al.* für Hepatozyten beschriebenen, mit hohen Grenzwerten zur Aktivierung und hoher Kooperativität aufweisen, während es in Melanomzellen schon bei niedrigeren Grenzwerten zu einer Aufhebung der Inhibition und einer Aktivierung mit niedriger Kooperativität kommen müsste (Paillard et al, 2017).

Für MICU2, das Paralog von MICU1, konnten in den untersuchten Zellen ähnliche Expressionslevel wie für MICU1 festgestellt werden, mit Ausnahme von WM3734, in denen MICU2 höher als MICU1 exprimiert wird. Hierbei sollte beachtet werden, dass diese Daten mittels qRT-PCR generiert wurden und somit nur die Expression auf Ebene der mRNA beschreiben. Auf die letztendlich in der Zelle vorhandenen Mengen an Protein kann in diesem Fall kein direkter Rückschluss gezogen werden, da die Stabilität von MICU2 auch stark von einer Stabilisierung durch MICU1 abhängig ist, indem es mit diesem Heterodimere bildet (Kamer et al, 2017; Kamer & Mootha, 2014; Patron et al, 2014; Petrungraro et al, 2015; Plovanich et al, 2013b). Allerdings könnte davon ausgegangen werden, dass ähnliche Mengen an MICU2-Protein wie an MICU1 vorliegen, da diese in einem 1:1 Verhältnis aneinander binden. So sollten alle in der Zelle vorhandenen MCU-Kanäle durch stabile MICU1-MICU2-Heterodimere kontrolliert sein und kaum MICU1-Homodimere vorliegen. Interessanterweise ließ sich sowohl in Melanomzellen als auch in Melanozyten die Expression von MICU3 nachweisen. Bisher war die Expression von MICU3 nur in Skelettmuskeln (Paillard et al, 2017) und neuronalem Gewebe (Plovanich et al, 2013b) bekannt. Da Melanozyten wie neuronales Gewebe neuroektodermalen Ursprungs sind, könnte dies eine Erklärung für das Auftreten von MICU3 sein. Bisher liegen allerdings noch keine Daten zur Funktion von MICU3 vor, weshalb keine Rückschlüsse auf die Regulation des Kanalkomplexes durch die Expression von MICU3 gezogen werden können.

Bei der Regulation des Kalziumeinstroms spielt nicht nur das Expressionsverhältnis von MICU1 zu MCU eine Rolle, sondern auch die Expression des dominant-negativen Regulators MCUB. Dieser übt eine modulatorische Funktion durch seinen inhibitorischen Effekt auf MCU aus und weist auch ein gewebespezifisches Expressionsmuster auf (Raffaello et al, 2013). Im Vergleich zu den anderen Komponenten des Uniporter-Komplexes konnten nur geringe Mengen an MCUB in den untersuchten Melanomzelllinien und Melanozyten nachgewiesen werden. Vor allem in den untersuchten Melanozyten lagen die mRNA Mengen für MCUB nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze (vgl. Abbildung 3). Betrachtet man zudem das Verhältnis zwischen MCU und MCUB, liegt in Melanozyten eine wesentlich höhere MCU/MCUB-Ratio als in den analysierten Melanomlinien vor. Dies würde für einen niedrigeren Kalziumeinstrom bzw. niedrigere Kalziumlevel in den Mitochondrien der Melanomzellen im Vergleich zu gesunden Melanozyten sprechen. Zusammen mit der Beobachtung, dass in Zelllinien aus Primärtumoren höhere Mengen an MCU zu finden sind als in Zellen aus fernen Metastasen bzw. Xenograft Metastasen, lässt dies Rückschlüsse auf eine Rolle des mitochondrialen Kalziums für die Tumorprogression und Metastasierung zu. Demnach könnte ein verringerter mitochondrialer Kalziumeinstrom durch geringe MCU-Mengen oder eine inhibierende Wirkung seiner Regulatoren,

wie beispielsweise MCUb, mit einer verstärkten Metastasierung und damit auch der Tumorprogression assoziiert sein. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, könnten Messungen der mitochondrialen Kalziumaufnahme in isolierten Zellen aus Patientenmaterial durchgeführt werden.

## 5.2 Etablierung eines Knockdowns von MCU und MICU1

Zur Analyse der Funktion von MCU in Melanomzellen und Melanozyten wurden Knockdown-Studien mittels siRNA und shRNA durchgeführt, wofür deren Spezifität und Effizienz in einem ersten Schritt validiert werden sollte. Für Experimente über kurze Zeiträume kann eine Herunterregulation durch siRNA erfolgen, die sich mittels Elektroporation einfach in Zellen einbringen lässt. Für Untersuchungen in Melanozyten ist die siRNA-vermittelte Herunterregulation das Mittel der Wahl. Da diese Zellen aus primärem, gesundem Gewebe isoliert wurden und sehr langsam proliferieren bzw. nur über kurze Zeiträume in Kultur gehalten werden können, ist sowohl eine Proteinüberexpression nur schwer erreichbar, als auch die Generierung eines stabilen Knockdowns nicht möglich. In Melanozyten und auch in den beiden untersuchten Melanomlinien konnte für alle siRNAs, die gegen MCU oder MICU1 gerichtet waren, eine gute Effizienz und eine hohe Spezifität des Knockdowns erreicht werden (siehe Abbildung 4). Im Gegensatz zu MICU1 mit einer Halbwertszeit des Proteins von ca. 5 h ist MCU mit einer Halbwertszeit von über 24 h sehr lange stabil (Petrungaro et al, 2015). Aus diesem Grund war es für die weiteren Experimente essentiell eine ausreichende Herunterregulation von MCU auf Proteinebene erreichen zu können. Trotz der langen Halbwertszeit ließ sich 72 h nach Transfektion der siRNA bereits eine starke Reduktion für MCU auf Proteinebene in WM3734 und 1205Lu beobachten.

Für Melanomzellen wurden durch Integration von shRNA-kodierenden Plasmiden stabile Knockdown-Linien generiert, um Untersuchungen über längere Zeiträume zu ermöglichen (siehe Abbildung 4). Sowohl in WM3734 als auch in 1205Lu konnte auf RNA- und Proteinebene eine effiziente und spezifische Herunterregulation von MCU erzielt werden. In manchen Zelltypen konnte bereits gezeigt werden, dass Änderungen in der Expression von MCU sich auch auf andere Proteine des Komplexes auswirken können. So beschrieben Sancak *et al.*, dass in HEK293T Zellen, in denen MCU herunterreguliert wurde, geringere Mengen an MCUb und EMRE vorlagen. Zwar hatte die Herunterregulation von MCU keine Auswirkung auf die Expression von EMRE auf mRNA-Ebene, führt aber trotzdem zu einer geringeren Menge des Proteins, da EMRE unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich durch MCU stabilisiert wird (Sancak et al, 2013). Eine ähnliche Beobachtung konnte von Petrungaro *et al.* und Plovanich *et al.* für MICU1 gemacht werden: die Überexpression von MCU zeigte eine stabilisierende Wirkung auf MICU1 (Petrungaro et al, 2015) und MICU2 (Plovanich et al, 2013b). Dementsprechend könnte eine Herunterregulation von MCU auch die Destabilisierung von MICU1 zur Folge haben und so die vorhandene Proteinmenge reduzieren. In Melanomzellen konnte diese Theorie jedoch nicht bestätigt werden. Weder auf Ebene der mRNA, noch auf Proteinebene konnte eine Reduktion von MICU1 nach MCU Knockdown detektiert werden (vgl. Abbildung 4 und Abbildung 5).

Die stabile Herunterregulation von MICU1 zeigte zunächst auf mRNA-Ebene vielversprechende Resultate. Hier konnte eine deutliche Verringerung der MICU1 mRNA erreicht werden. Trotz der ge-

ringen Halbwertszeit von MICU1 war jedoch keine zufriedenstellende Reduktion der Proteinmenge im Western Blot zu beobachten. Möglicherweise ist die verbleibende mRNA ausreichend, um die MICU1-Expression durch eine erhöhte Translation dieser mRNA auf Proteinebene aufrecht zu erhalten. Eine andere Möglichkeit wäre, dass in Melanomzellen MICU1 auf Proteinebene besonders gut stabilisiert ist und hier eine längere Halbwertszeit besitzt, so dass annähernd wildtypische MICU1 Level trotz reduzierter mRNA erhalten werden können. Da allerdings auch Zweifel an der Qualität des verwendeten MICU1-Antikörpers bestehen, sollten die generierten Zelllinien weiterhin mit einem anderen Antikörper gegen MICU1 getestet werden.

Wie auch bei MCU kann eine Änderung der MICU1 Expression in manchen Zelltypen Auswirkungen auf die Stabilität anderer Proteine des Uniporter Komplex haben. Plovanich *et al.* beschrieben, dass die Expression von MICU1 und seinem Paralog MICU2 voneinander abhängig ist. MICU2, das mit MICU1 Dimere bildet und somit an den Uniporter Komplex gebunden ist, wird direkt durch MICU1 stabilisiert. So führt sowohl eine Überexpression als auch eine Herunterregulation von MICU1 in HEK293T bzw. HeLa Zellen zu einer entsprechend erhöhten bzw. reduzierten Menge an MICU2 (Patron *et al.*, 2014; Plovanich *et al.*, 2013b). Diese Abhängigkeit scheint allerdings zelltypspezifisch zu sein, da sowohl in MEF Zellen als auch in Hepatozyten von MICU1-Knockout Mäusen keine Regulation der MICU2 Expression durch MICU1 festgestellt werden konnte (Antony *et al.*, 2016). Auch für MCU wirken sich Änderungen in der MICU1 Expression abhängig vom Zelltyp aus. In HeLa Zellen konnte keine Änderung der MCU Expression nach MICU1 Herunterregulation festgestellt werden (Patron *et al.*, 2014), während in Mitochondrien muriner Leberzellen mit MICU1 Knockdown eine Reduktion der MCU Proteinlevel beschrieben wurde (Plovanich *et al.*, 2013b). Interessanterweise zeigte sich auch in Melanomzellen die Tendenz zu einer Veränderung der Menge an MCU RNA und Protein nach stabiler Herunterregulation von MICU1. Die hier beobachteten Ergebnisse waren insgesamt jedoch inkonsistent. So konnte in WM3734 auf RNA-Ebene tendenziell eine erhöhte Expression beobachtet werden, während die Proteinmenge sich marginal verringerte. Im Gegensatz dazu war in 1205Lu eine erhöhte Menge an Protein vorhanden, obwohl die MCU mRNA in einer der beiden Knockdown-Linien in geringerer Menge detektiert werden konnte (vgl. Abbildung 5). Somit lässt sich keine zuverlässige Aussage über einen Einfluss der MICU1 Herunterregulation auf die MCU Expression in Melanomzellen treffen. Ein weiteres Problem einer stabilen MICU1 Herunterregulation wurde von Liu *et al.* aufgezeigt. Die Arbeitsgruppe beobachtete eine Anpassung in älteren MICU1<sup>-/-</sup> Knockout-Mäusen, wobei das basale mitochondriale Kalzium vergleichbar mit den Werten wildtypischer Mäuse war und sich der pathologische Phänotyp einer Ataxie und Muskelschwäche verbesserte. Hierbei war interessanterweise eine altersabhängige Verstärkung in der Reduktion von EMRE zu beobachten (Liu *et al.*, 2016). Auch für die stabilen MICU1-Knockdown-Linien war nicht auszuschließen, dass eine Anpassung über die Zeit durch Veränderungen in der Zusammensetzung des Uniporter Komplexes oder durch andere Mechanismen geschieht.

Nicht nur durch seine direkte Kalzium-vermittelte Regulation der Kanalaktivität, sondern auch durch seinen Einfluss auf die Stabilität anderer Komponenten, wie MICU2, spielt MICU1 eine sehr komplexe Rolle in der Regulation des Uniporter Komplexes. Eine Manipulation von MCU, das die porenbildende Komponente des Kanals darstellt, versprach somit ein eindeutigeres Verständnis des Einflusses mitochondrialen Kalziums auf die Melanombiologie. Aus diesem Grund wurde der weitere Fokus dieser Arbeit auf die Auswirkungen der Herunterregulation von MCU gelegt.

## 5.3 Kalziumströme in Melanomzellen unter dem Einfluss von MCU

### 5.3.1 Stimulation von Kalziumströmen in Melanozyten und Melanomzellen

Zur Aktivierung des Kalziumeinstroms in Melanozyten wurde eine Stimulation mit Endothelin-1 eingesetzt. Endothelin-1 wird beispielsweise in der Haut von Keratinozyten nach Bestrahlung mit UV-Licht sekretiert. Dieses bindet an den Endothelin B Rezeptor ( $ET_B$ ), einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, auf der Oberfläche von umgebenden Melanozyten und aktiviert so die Phospholipase C (PLC) (Kang et al, 1998). Durch die Aktivierung von PLC wird der Botenstoff Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) und Diacylglycerol in der Zelle produziert (Yada et al, 1991).  $IP_3$  bindet an seinen Rezeptor, der in der ER-Membran lokalisiert ist und führt somit zu einer Entleerung der Kalziumspeicher. Dies führt zu einer Oligomerisierung der STIM-Moleküle und einer daraus folgenden Aktivierung der Orai-Kanäle in der Plasmamembran, durch die  $Ca^{2+}$  in die Zelle strömen kann (Stanisz et al, 2012). Dieser Prozess wird im Allgemeinen auch als speichergesteuerter Kalziumeinstrom (SOCE) bezeichnet. Steigt die intrazelluläre Kalziumkonzentration in Mikrodomänen im Bereich der Mitochondrien weit genug an, kommt es zu einer Aktivierung von MCU und einem  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die mitochondriale Matrix (siehe Punkt 1.4.3). Mit Hilfe mitochondrialer Kalziumsensoren konnte ein mitochondrialer Kalziumeinstrom in Melanozyten nach Stimulation mit Endothelin-1 in dieser Arbeit bestätigt werden (siehe Abbildung 6). Ein Anstieg der mitochondrialen Kalziumkonzentration ist nach Stimulation allerdings nicht in allen Zellen und auch nicht in völlig gleichmäßiger Form erkennbar. Diese Beobachtung lässt sich durch unterschiedliche Rezeptor-expression der Einzelzellen, sowie durch die Abhängigkeit der Menge an mitochondrialem Kalzium von verschiedenen Faktoren erklären. So wird die mitochondriale Aufnahme nicht nur durch die Amplitude und Dauer des intrazellulären Kalziumanstiegs beeinflusst, sondern auch dadurch, ob  $Ca^{2+}$ -Ionen über die Plasmamembran oder intrazelluläre Ionenkanäle in das Zytoplasma gelangen (De Stefani et al, 2016). Dabei hat die Bildung von Mikrodomänen mit hohen Kalziumkonzentrationen eine essentielle Bedeutung für die Aktivierung von MCU. Da die Aktivierung durch Endothelin-1 über eine komplexe physiologische Signalkaskade verläuft, besteht die Möglichkeit, dass sich in Einzelzellen unterschiedliche Mikrodomänen ausbilden und es nicht zu einer Aktivierung des mitochondrialen Kalziumeinstroms kommt.

Für Melanozyten sind die Endothelinrezeptoren  $ET_A$  und  $ET_B$  vor allem für die Melaninproduktion und Proliferation von Bedeutung (Imokawa et al, 1996; Imokawa et al, 1992; Yada et al, 1991). Auch Melanomzellen besitzen funktionale  $ET_B$  Rezeptoren (Yohn et al, 1994), deren Expression mit zunehmender Tumorprogression zunimmt (Cruz-Munoz et al, 2012; Demunter et al, 2001). Yohn *et al.* demonstrierten bereits vor mehr als zwei Jahrzehnten, dass eine Stimulation der metastatischen Melanomzelllinien Sk-Mel-28, Sk-Mel-30 und CU800 mit ET-1 durch Bindung an  $ET_B$  einen Anstieg des intrazellulären freien Kalziums zur Folge hat (Yohn et al, 1994). Entgegen dieser Beobachtung konnte in dieser Arbeit für die Melanomlinie WM3734 kein  $Ca^{2+}$ -Einstrom in die Zelle unter den gewählten Versuchsbedingungen durch ET-1 induziert werden (siehe Abbildung 6). Dies ist erstaunlich, da in WM3734, als Linie einer Gehirnmetastase, eine ausreichende Expression an  $ET_B$  Rezeptoren erwartet werden konnte (Cruz-Munoz et al, 2012). Eine mögliche Erklärung bieten die Daten von Kikuchi *et al.* und Eberle *et al.* Die Gruppe um Kikuchi beschrieb eine geringere Expression des  $ET_B$  Rezeptors in metastatischen Melanomzelllinien, einhergehend mit einer geringeren

Antwort auf eine ET-1 Stimulation (Kikuchi et al, 1996). Auch Eberle *et al.* beobachteten eine Herunterregulation des ET<sub>B</sub> Rezeptors in kultivierten Melanomzelllinien (Eberle et al, 1999). In Anbetracht der Tatsache, dass hohe Mengen an ET<sub>B</sub> meist in Primärmaterial und nicht in kultivierten Zelllinien festgestellt wurden (Cruz-Munoz et al, 2012; Demunter et al, 2001), könnte dies einen möglichen Erklärungsansatz darstellen. So könnte es bei der hauptsächlich in dieser Arbeit verwendeten WM3734 Linie im Laufe ihrer Kultivierung zu einer Herunterregulation oder auch Internalisierung des ET<sub>B</sub> Rezeptors gekommen sein, die eventuell durch Zusätze im Kulturmedium ausgelöst wurden. Eine Expressionsanalyse von ET<sub>B</sub> in verschiedenen Melanomlinien könnte zur weiteren Aufklärung des beobachteten Effekts beitragen. In den durchgeführten Versuchen zur Untersuchung eines potentiellen stimulatorischen Effekts verschiedener Substanzen auf den Ca<sup>2+</sup>-Einstroms in Melanomlinien, konnte ein kurzer Anstieg des intrazellulären Kalziums nach Zugabe von Insulin in WM3734 beobachtet werden. Bei weiterer Untersuchung auf Einzelzellebene ließ sich diese Aktivierung jedoch nicht verlässlich reproduzieren. Möglicherweise handelt es sich bei der beobachteten Reaktion um ein Artefakt der Messung, was in weiteren Messreihen überprüft werden sollte. Da keiner der eingesetzten physiologischen Agonisten einen reproduzierbaren Kalziumeinstrom induzierte, wurde für weitere Experimente Thapsigargin eingesetzt. Thapsigargin ist ein Inhibitor der sarko-/endoplasmatischen Retikulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase, die Ca<sup>2+</sup>-Ionen unter Verbrauch von ATP in das ER bzw. SR transportiert. Da Kalzium durch Leckströme aus dem ER entweichen kann (Camello et al, 2002), führt eine Inhibition der SERCA zu einem Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentrationen, während diese im ER sinkt. Die resultierende Entleerung des ERs führt zur Aktivierung von SOCE und daraufhin zu einem Anstieg des intrazellulären Kalziums.

### 5.3.2 Der Einfluss von Mitochondrien und MCU auf SOCE

Es wurde bereits von verschiedenen Arbeitsgruppen demonstriert, dass Mitochondrien auf unterschiedlichen Ebenen eine regulatorischen Funktion auf SOCE ausüben. Hoth *et al.* zeigten bereits 1997, dass funktionale Mitochondrien in T-Lymphozyten eine Voraussetzung für anhaltenden SOCE sind (Hoth et al, 1997). Vor allem die Funktion der Mitochondrien hohe zytosolische Kalziumkonzentrationen durch Aufnahme von Ca<sup>2+</sup> abzapfen, spielt hierbei eine entscheidende Rolle (Gilibert & Parekh, 2000). Während des Einstroms von Kalzium in die Zelle bewegen sich Mitochondrien zur Plasmamembran (Quintana et al, 2006), wo sie aufgrund der hohen Kalziumkonzentrationen immobilisiert werden können (Yi et al, 2004). Dort sind sie in der Lage große Mengen der einströmenden Kalziumionen aufzunehmen. Durch diese mitochondriale Kalziumaufnahme reduziert sich die lokale zytosolische Kalziumkonzentration und es kommt zu einer verringerten kalziumabhängigen langsamen Inaktivierung der CRAC-Kanäle (Gilibert & Parekh, 2000; Hoth et al, 2000). Demnach sollten Zellen mit herunterregulierten Mengen an MCU, die Ca<sup>2+</sup> nicht oder nur reduziert in die Mitochondrien aufnehmen können, eine schnellere Inaktivierung der CRAC-Kanäle aufweisen. In stabilen MCU-Knockdown WM3734 Zellen zeigte die shMCU#1-Linie im Vergleich zur Kontrolle einen etwas stärkeren Ca<sup>2+</sup>-Einstrom, während die shMCU#2-Linie einen etwas schwächeren Einstrom nach Stimulation aufwies (vgl. Abbildung 6). Auch in der Plateauphase ließen sich unterschiedliche Tendenzen der beiden Knockdown-Linien zueinander beobachten. Diese gegensätzlichen Beobachtungen sprechen dafür, dass die MCU Herunterregulation keinen erkennbaren Effekt auf den speichergesteuerten Einstrom und dessen Inaktivierung hat. Giacomello *et al.* und

Quintana *et al.* demonstrierten, dass Mitochondrien für die Orai-Aktivierung in Hela Zellen nicht benötigt werden und so auch nicht SOCE kontrollieren (Giacomello et al, 2010; Quintana et al, 2011). Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Tang *et al.*, die eine Verringerung von SOCE nach Knockdown von MCU in Brustkrebszellen beobachteten (Tang et al, 2015). Eine mögliche Erklärung für diese gegensätzlichen Beobachtungen könnte die unterschiedliche Morphologie der Mitochondrien und ihre unterschiedliche Positionierung in der Zelle in verschiedenen Zelltypen sein, was bereits Auswirkungen auf den Kalziumeinstrom haben kann (Schwindling et al, 2010). Auch beeinflussen diese Faktoren die relative Lokalisation der beiden Kanalproteine Orai und MCU zueinander, sowie den Anteil an Uniporter-Komplexen in der Nähe zu den Orai-Kanälen der Plasmamembran, wodurch sich Unterschiede in der SOCE-Regulation zwischen verschiedenen Zelltypen ergeben könnten. Einen anderen Erklärungsansatz dafür, dass in dieser Arbeit keine Effekte des MCU Knockdowns auf die SOCE-Aktivierung zu beobachten sind, liefert die Arbeit von Deak *et al.* Die Gruppe beschrieb eine reduzierte Oligomerisierung des Orai-Aktivators STIM1 und somit auch einen verringerten SOCE in Folge der MCU Herunterregulation. Allerdings war dieser Effekt nur nach direkter IP<sub>3</sub>-Rezeptor-Stimulation erkennbar, nicht aber nach der artifiziellen Induktion der Speicherentleerung durch die SERCA-Inhibitoren BHQ oder Thapsigargin (Deak et al, 2014). Deak *et al.* untersuchten neben einem MCU Knockdown auch einen UCP2 Knockdown. UCP2, das „*uncoupling protein 2*“, ist in der mitochondrialen Kalziumaufnahme involviert, wobei es hauptsächlich zur Aufnahme von intrazellulär freigesetztem Kalzium, nicht aber aus dem Extrazellulärraum einströmendem Kalzium, beiträgt (Waldeck-Weiermair et al, 2010). Die Arbeitsgruppe konnte nach Herunterregulation von UCP2 einen ähnlichen Effekt wie im MCU Knockdown auf die IP<sub>3</sub>-aktivierte STIM1-Oligomerisierung beobachten und schloss daraus, dass der Hauptmechanismus, durch den Mitochondrien an der SOCE-Regulation beteiligt sind, das Abpuffern von Kalzium aus dem ER an den IP<sub>3</sub>-Rezeptoren ist (Deak et al, 2014). Auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurde Thapsigargin zur SOCE-Aktivierung eingesetzt, da bisher keine physiologische Stimulation der IP<sub>3</sub>-Signalkaskade möglich ist (vgl. 5.3.1). Passend zu den Beobachtungen von Deak *et al.* konnte kein Einfluss von MCU nach SERCA-Inhibition durch Thapsigargin auf die SOCE-Aktivierung festgestellt werden, was die Schlussfolgerung der Arbeitsgruppe bestätigt. Dementsprechend wäre es allerdings denkbar, dass MCU auch in Melanomzellen einen Einfluss auf SOCE hat, dieser jedoch aufgrund fehlender physiologischer Stimulation nicht erkennbar ist.

Ein Effekt, der trotz Stimulation der Zellen mit Thapsigargin zu beobachten war, ist eine geringere Freisetzung von Ca<sup>2+</sup> in das Zytosol in MCU-Knockdown-Linien direkt nach Inhibition der SERCA-Pumpe durch Thapsigargin und nach Speicherentleerung durch Ionomycin, was auf eine geringere ER-Kalziumkonzentration oder eine geringere Kalziumfreisetzung aus dem ER rückschließen lässt. Können Mitochondrien das aus dem ER freigesetzte Kalzium aufgrund des fehlenden MCU nicht aufnehmen, entstehen Mikrodomänen mit hohem Kalzium an den IP<sub>3</sub>-Rezeptoren des ERs. Da IP<sub>3</sub>-Rezeptoren von hohen Kalziumkonzentrationen inhibiert werden, könnte es durch diese Mikrodomänen zu einer Inhibition des Kanals kommen und somit weniger Kalzium aus dem ER freigesetzt werden. Weiterhin könnten sich verringerte Kalziumkonzentrationen im ER durch den Beitrag der Mitochondrien zu dessen Befüllung erklären lassen. Mitochondrien sind über eine Bindung zwischen VDAC1 mit dem IP<sub>3</sub>-Rezeptor eng mit dem ER gekoppelt (Csordas et al, 2006; Szabadkai et al, 2006). So können lokale Ca<sup>2+</sup>-Mikrodomänen leicht erkannt und Ca<sup>2+</sup>-Ionen in die Mitochondrien aufgenommen werden (Rizzuto et al, 1993). Zusätzlich nehmen Mitochondrien auch Kalzium auf,

das aus dem Extrazellulärraum in die Zelle strömt. Das aufgenommene Kalzium kann über den mitochondrialen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher NCLX wieder abgegeben und durch die Nähe der Mitochondrien zum ER von der SERCA-Pumpe direkt in das ER transportiert werden (Arnaudeau et al, 2001; Malli et al, 2005; Poburko et al, 2009). Können Mitochondrien aufgrund des fehlenden MCU kein Kalzium aufnehmen, ist der mitochondriale Gehalt an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  geringer, weshalb weniger Kalzium über NCLX abgegeben und in das ER aufgenommen werden kann. Verringerte mitochondriale Kalziumlevel können auch eine Erklärung für die geringere Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus intrazellulären Speichern, zu denen auch die Mitochondrien gehören, durch Ionomycin sein.

Insgesamt sprechen die in dieser Arbeit gewonnenen Daten dafür, dass in Melanomzellen MCU nicht zwangsläufig für eine Regulation von SOCE benötigt wird. Allerdings beeinflusst eine verringerte mitochondriale Kalziumaufnahme den Füllungszustand bzw. die Kalziumabgabe des ERs und hat so Auswirkungen auf das zytosolische Kalzium.

### 5.3.3 MCU ist verantwortlich für mitochondriale Kalziumströme

Bereits bei der Identifizierung des mitochondrialen Kalziumuniporters beschrieben Baughman *et al.* und De Stefani *et al.* einen verringerten Einstrom von Kalzium in die Mitochondrien nach Herunterregulation von MCU in HeLa Zellen (Baughman et al, 2011; De Stefani et al, 2011). In Übereinstimmung damit führte eine Überexpression von MCU in HEK293T Zellen zu einer verstärkten Aufnahme nach Stimulation und einem erhöhten basalen mitochondrialen Kalziumlevel (Petrungaro et al, 2015) (Masterarbeit K. Zimmermann 2013). In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt auf das basale Kalzium auch in Melanomzellen demonstriert werden. Eine Überexpression von MICU1 führte dagegen nicht zu einer Veränderung der basalen Kalziumkonzentrationen (vgl. Abbildung 7). Da MICU1 in Kontrollzellen wahrscheinlich bereits in ausreichender Menge vorliegt um die vorhandenen MCU-Kanäle zu kontrollieren, ist diese Beobachtung nicht weiter verwunderlich. Interessanterweise zeigte jedoch auch die Überexpression von MICU1 gemeinsam mit MCU keinen Effekt auf die basalen Kalziumkonzentrationen. Im Gegensatz dazu führte in HEK293T Zellen die gemeinsame Überexpression zu noch stärkeren Effekten als die alleinige Überexpression von MCU (Petrungaro et al, 2015). Möglicherweise zeigt sich hier ein Zelltyp-spezifisches Verhalten über dessen Mechanismus nur spekuliert werden kann. In WM3734 Zellen wurden nur die basalen mitochondrialen Kalziumspiegel nach MCU-Überexpression, nicht aber der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom untersucht. So könnten diese basalen Level in Melanomzellen einer strikteren Regulation unterliegen als in HEK293T. Beispielsweise wäre es denkbar, dass der mitochondriale Kalziumaustauscher NCLX in den Zelltypen unterschiedlich stark exprimiert wird. Zudem liegt zwar mehr MCU vor, welches eine funktionale Pore bilden kann, jedoch kann diese durch die gleichzeitige Überexpression von MICU1 bei niedrigen intrazellulären Kalziumkonzentrationen auch inhibiert werden. Bei Stimulation des Kalziumeinstroms ist dementsprechend wie auch in HEK293T Zellen ein höherer Kalziumanstieg in den Mitochondrien zu erwarten.

Zu den Auswirkungen einer Herunterregulation oder eines Funktionsverlustes von MICU1 und MCU wurden bereits mehrere Publikationen veröffentlicht (zusammengefasst in (Mammucari et al, 2018)). MICU1-Mutationen, die zu einem Funktionsverlust des Proteins führen, konnten auch im

Menschen entdeckt werden. Dieser Verlust der MCU-Regulation durch MICU1 führt zu einem erhöhten basalen Kalziumspiegel in den Mitochondrien, geringeren zytosolischen Kalziumkonzentrationen und einer Fragmentierung der Mitochondrien. Als Folge machen sich in Patienten Funktionsstörungen in Muskeln und Gehirn bemerkbar (Lewis-Smith et al, 2016; Logan et al, 2014). Der völlige Verlust von MICU1 ist in Mäusen häufig letal, wobei in überlebenden Mäusen ähnliche Defekte wie bei Patienten mit *loss-of-function*-Mutationen auftreten. Der Verlust von MICU1 kann dementsprechend abhängig vom genetischen Hintergrund auch *in vivo* toleriert werden, führt allerdings zu erhöhten Mengen an Kalzium in den Mitochondrien (Antony et al, 2016; Liu et al, 2016). Auch in kultivierten Zellen kann nach Herunterregulation von MICU1 ein Anstieg des basalen Kalziums beobachtet werden (Mallilankaraman et al, 2012b; Patron et al, 2014). Dieses Verhalten konnte sowohl in Melanozyten als auch in Melanomzellen bestätigt werden (siehe Abbildung 7).

Auch der Knockout von MCU hat nicht zwangsläufig eine embryonale Letalität zur Folge. Wie auch bei MICU1-Verlust spielt der genetische Hintergrund eine entscheidende Rolle. Murphy *et al.* beschrieben nach MCU-Knockout in Mäusen mit C57BL/6 Hintergrund eine vollständige embryonale Letalität (Murphy et al, 2014), während Mäuse mit gemischtem genetischen Hintergrund in der Lage waren ohne MCU zu überleben (Murphy et al, 2014; Pan et al, 2013). Der hier hauptsächlich beobachtete Phänotyp äußerte sich in einer schlechteren Skelettmuskelaktivität (Pan et al, 2013). Sowohl in diesen Knockout-Mäusen als auch in verschiedenen Zelltypen führte das Fehlen von MCU zu einer verringerten bzw. vollständig fehlenden Aufnahme von Kalzium in die Mitochondrien (Baughman et al, 2011; Drago et al, 2012; Pan et al, 2013; Petrunaro et al, 2015; Tarasov et al, 2012). Dieser Effekt ist auch für Melanomzellen und Melanozyten zu beobachten. Sowohl die Kalziumspiegel in ruhenden Zellen waren im Vergleich zur Kontrolle reduziert, als auch die Kalziumaufnahme nach Stimulation deutlich verringert. Interessanterweise zeigten sich Unterschiede in der Ausprägung dieses Phänotyps zwischen den beiden stabilen Knockdown-Melanomlinien 1205Lu und WM3734. Während der Kalziumeinstrom in 1205Lu fast vollständig unterdrückt wurde, war in WM3734 noch ein Einstrom erkennbar. Obwohl auf Proteinebene in beiden Linien kaum noch MCU nachweisbar war, könnten WM3734 Zellen im Vergleich zu 1205Lu noch höhere, wenn auch kleine, Mengen an MCU enthalten, die ausreichend sind, um einen stärkeren Kalziumeinstrom zu gewährleisten. Denkbar ist auch, dass Lage, Morphologie oder auch Dynamik der Mitochondrien in der Zelle in WM3734 zu einer besseren Kalziumaufnahme führt als in 1205Lu. Dieser weniger ausgeprägte Effekt in WM3734 könnte auch dazu beitragen, dass keine Veränderungen in der SOCE-Regulation beobachtet werden konnten.

Gerade in stabilen Knockdown-Linien oder auch kompletten Knockouts ist es vorstellbar, dass die Aufnahme von Kalzium in die Mitochondrien nach einer Anpassungszeit durch andere Mechanismen zumindest teilweise kompensiert werden kann. Bondarenko *et al.* zeigten beispielsweise, dass es nach MCU Herunterregulation zu einem Anstieg eines kompensatorischen Kalziumstroms kommt, der unabhängig von MCU zu sein scheint (Bondarenko et al, 2014). Weiterhin wurden verschiedene andere mögliche Aufnahmemechanismen für  $\text{Ca}^{2+}$  in die Mitochondrien beschrieben. So sind Faktoren, wie Coenzym Q10 oder Polyhydroxybutyrat (PHB) in der Lage, in geringer Kapazität Kalziumionen durch Lipidmembranen zu transportieren (Bogeski et al, 2011; Smithen et al, 2013). Ein weiterer langsamer Aufnahmemechanismus könnte Letm1 sein, das  $\text{Ca}^{2+}$  bei niedrigen Konzentrationen unabhängig von MCU transportieren kann (Jiang et al, 2009; Waldeck-Weiermair et al,

2011). Neben diesen Mechanismen können auch andere Transporter und Kanäle eine Rolle in der mitochondrialen Kalziumaufnahme einnehmen, die unter physiologischen Bedingungen eine andere Funktion innehaben. Vor kurzem demonstrierten Samanta *et al.*, dass der mitochondriale  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher NCLX auch in der Lage ist, im reversen Modus zu agieren und damit Kalzium in die Matrix zu transportieren, statt es zu exportieren (Samanta et al, 2018). Zudem konnten in erregbaren Zellen Typ 1 Ryanodinrezeptoren (RyR1) identifiziert werden, die sich in der mitochondrialen Membran und nicht wie üblich in der Membran des ERs befinden, und in der Lage sind einen Kalziumeinstrom in die Mitochondrien zu vermitteln (Beutner et al, 2001; Jakob et al, 2014). Um diese Möglichkeiten der Aktivierung verschiedener Kompensationsmechanismen in den in dieser Arbeit verwendeten stabilen Knockdown-Linien zu überprüfen, könnte beispielsweise die Lokalisation von RyR1 oder der Transportmodus von NCLX untersucht werden.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass auch in Melanomzellen mitochondriale Kalziumströme der Kontrolle des Uniporter Komplexes unterliegen. Da sowohl das Fehlen von MCU als auch MICU1 toleriert werden können, scheinen Zellen in der Lage zu sein diesen Mangel durch andere Kalziumregulationsmechanismen zu kompensieren. Dementsprechend wurden die in dieser Arbeit generierten Zelllinien nur über einen begrenzten Zeitraum kultiviert, um eine Anpassung zu vermeiden.

## 5.4 Produktion von ROS

Reaktive Sauerstoffspezies sind in der Lage als sekundäre Botenstoffe (*second messenger*) mit Signalwegen zu interferieren und können somit Auswirkungen auf andere Zellfunktionen haben. Bereits während essentieller Prozesse wie der Zellatmung entstehen ROS an den Komplexen I und III der Elektronentransportkette. Dabei führt die Abgabe von Elektronen zur Produktion von Hydroperoxid aus Sauerstoff, welches an Komplex I und III an die Matrix und an Komplex III in den Intermembranraum abgegeben wird (Kudin et al, 2004; Kudin et al, 2005; St-Pierre et al, 2002). Hydroperoxid reagiert schnell weiter zu Wasserstoffperoxid, entweder spontan, in der Matrix durch SOD2 oder im Intermembranraum durch SOD1. Das entstehende Wasserstoffperoxid wurde in dieser Arbeit im Zytosol gemessen. Nach Überexpression von MCU konnten erhöhte basale Kalziumspiegel in den Mitochondrien detektiert werden (vgl. 4.4). Da die Aktivität des Citratzyklus durch Kalzium aktivierbar ist, entsteht dabei am  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase-Komplex ROS (Starkov et al, 2004; Tretter & Adam-Vizi, 2004; Wan et al, 1989). Dementsprechend konnten in WM3734 Zellen mit verstärkter MCU Expression auch höhere Wasserstoffperoxid-Level detektiert werden. Bei einer gleichzeitigen Überexpression von MCU und seinem Regulator MICU1 konnte kein Einfluss auf die basale Kalziumkonzentration beobachtet werden (vgl. 4.4). Damit konsistent zeigten sich auch in der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion keine Unterschiede zur Kontrolle. Interessanterweise konnte in MICU1 überexprimierenden Zellen ein ähnlich hoher  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Spiegel wie in MCU überexprimierenden Zellen beobachtet werden, obwohl diese keinen Effekt im basalen mitochondrialen Kalzium aufwiesen. Allerdings wurde in dieser Arbeit die Auswirkung einer MICU1 Überexpression auf den Kalziumeinstrom nach Stimulation nicht untersucht. Patron *et al.* zeigten in HeLa Zellen, dass diese bei Überexpression von MICU1, welches bei hohen Konzentrationen an Kalzium als Aktivator dient, einen höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom bei Histaminstimulation aufwiesen (Patron et al, 2014). Diese Beobachtung würde eine mögliche Erklärung für den beobachteten Effekt bieten. Zwar werden die Zellen im Versuch

nicht stimuliert, allerdings besteht die Möglichkeit, dass es während der Vorbereitung der Messungen zu einer Aktivierung der Zellen und einem kurzzeitigen Kalziumeinström in die Mitochondrien kommen könnte. Da der untersuchte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gehalt sich nur relativ langsam anpasst, könnte eine vor Beginn der Messung stimulierte ROS-Produktion auch noch zum Zeitpunkt der Messung detektiert werden. Weiterhin könnte eine kurzfristige Erhöhung der Kalzium- und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen auch längerfristige Auswirkungen haben, da ROS in der Lage ist die Aktivität von MCU beeinflussen. MCU besitzt ein konserviertes Cystein, das oxidiert werden kann, wodurch es zu einer Öffnung des Kanals und einer daraus resultierenden ständigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme kommt (Dong et al, 2017). Dieser erhöhte Kalziumeinström hätte wiederum eine verstärkte ROS-Produktion zur Folge.

Wie in der Überexpression korrelierten die gemessenen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Level auch bei einer Herunterregulation von MCU mit den zuvor beobachteten Kalziumphänotypen. Bei einer transienten Herunterregulation war die Menge an  $\text{H}_2\text{O}_2$  in der Zelle niedriger als in der Kontrolle (siehe Abbildung 8). Ein verringertes Gehalt an ROS nach MCU Herunterregulation deckt sich mit den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen. So beschrieben sowohl Hou *et al.* als auch Xu *et al.*, dass MCU essentiell für die Produktion von Hyperoxid bzw. ROS ist (Hou et al, 2013; Xu & Chisholm, 2014). Weiterhin konnte in einem Brustkrebsmodell gezeigt werden, dass die Inhibition der mitochondrialen Kalziumaufnahme zu einer geringeren Produktion an mitochondrialen ROS führt (Tosatto et al, 2016). Die kombinierte Herunterregulation von MCU und MICU1 führte bereits in Bezug auf die mitochondriale Kalziumkonzentration zu keiner Veränderung. Dementsprechend hatte die gemeinsame Herunterregulation auch keine Auswirkungen auf den  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Gehalt dieser Zellen. Auch bei einem transienten Knockdown von MICU1 konnte kein Effekt auf die zelluläre  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration festgestellt werden. Da eine MICU1 Herunterregulation zu einem erhöhten Kalziumspiegel in Melanomzellen führt, wäre jedoch zu erwarten gewesen, dass sich auch hier höhere Level an  $\text{H}_2\text{O}_2$  beobachten lassen. Dieser erwartete Effekt wurde auch bereits von Mallilankaraman *et al.* beschrieben (Mallilankaraman et al, 2012b). Warum in diesem Fall keine Auswirkung der MICU1 Reduktion auf  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu detektieren war, müsste in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Insgesamt zeigen die gewonnenen Daten dieser Arbeit in Übereinstimmung mit bisher veröffentlichten Daten anderer Gruppen, dass die zelluläre Produktion von Wasserstoffperoxid durch mitochondriales Kalzium in Abhängigkeit von MCU reguliert werden kann. Dabei korreliert die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Produktion mit dem mitochondrialen Kalziumeinström.

## **5.5 MCU zeigt *in vitro* keinen Einfluss auf Zellzyklus und Proliferation**

Kalziumsignale sind in vielen Zelltypen an der Regulation der Proliferation beteiligt (Pinto et al, 2015). Auch in Melanomzellen konnte bereits gezeigt werden, dass durch STIM2 und Orai1 regulierte zytosolische Kalziumsignale einen Einfluss auf die Proliferation haben (Stanisz et al, 2014). Zudem beschrieben Doonan *et al.*, dass eine Reduktion des mitochondrialen Kalziumeinströms durch die Herunterregulation von Letm1 einen Zellzyklusarrest in murinen B-Zellen und hämatopoetischen Zellen zur Folge hat (Doonan et al, 2014). Da noch nicht bekannt war, ob auch das durch MCU regulierte mitochondriale Kalzium Auswirkungen auf das Wachstum und die Zellteilung im Melanom hat, sollte dies in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Andere Arbeiten legten bereits

die Vermutung nahe, dass der Einfluss von MCU zelltypabhängig ist. In glatten Muskelzellen pulmonaler Arterien (*pulmonary artery smooth muscle cells*, PSMC) konnte eine inverse Regulation durch MCU beschrieben werden. Hier führt eine Herunterregulation von MCU zu einer Verstärkung der Proliferation, während eine Überexpression die Proliferation in PSMC verlangsamt (Hong et al, 2017). Im Gegensatz dazu führt sowohl in HeLa Zellen als auch in primären murinen Endothelzellen das Fehlen von MCU zu einer geringeren Proliferation der Zellen (Hall et al, 2014; Tomar et al, 2016). Jedoch zeigte sich in den in dieser Arbeit untersuchten Melanomzelllinien weder ein Einfluss eines MCU Knockdowns auf den Zellzyklus, noch auf die Proliferation (vgl. 4.6). Auch nach Ausschluss eines Einflusses des Metabolismus auf die Messungen konnte kein Effekt beobachtet werden. Dieses Ergebnis stimmt mit den berichteten Daten in Brustkrebszellen und in Darmkrebszellen überein. Mehrere Gruppen berichteten übereinstimmend miteinander, dass in der tripel-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 die Proliferation und Viabilität nach MCU Herunterregulation oder Inhibition durch RuR nicht beeinflusst wird (Curry et al, 2013; Hall et al, 2014; Tang et al, 2015; Tosatto et al, 2016). In Darmkrebszellen führte zwar eine MCU Überexpression zu einer höheren Proliferation, eine Herunterregulation hatte allerdings keinen signifikanten Effekt (Zeng et al, 2018). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Regulation der Proliferation durch MCU-gesteuerte mitochondriale Kalziumströme stark abhängig vom untersuchten Zelltyp ist. Möglicherweise könnte hier die Mikroumgebung der jeweiligen Gewebearten eine zusätzliche regulierende Funktion einnehmen. Beispielsweise in Darmkrebs kommt es in der Umgebung von Tumorzellen zur Entstehung von Tumor-assoziierten Fibroblasten (*cancer-associated fibroblasts*, CAF). Diese fördern die Proliferation der Krebszellen durch die Expression verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren, wie zum Beispiel HGF (*hepatocyte growth factor*), IGF (*insulin-like growth factor*), Epiregulin oder TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) (Mukaida & Sasaki, 2016).

## **5.6 Die Herunterregulation von MCU führt zu einem verstärkten Potential zur Metastasierung und verringertem Tumorwachstum**

Es ist bereits länger bekannt, dass intrazelluläre Kalziumsignale eine wichtige Rolle bei der Regulation der Zellmigration in verschiedenen Zelltypen einnehmen. So haben migrierende polarisierte Zellen, wie zum Beispiel eosinophile Granulozyten und Fibroblasten, einen stabilen Kalziumgradienten. In diesen Zellen konnte auch gezeigt werden, dass die Retraktion des hinteren Zellendes im Lauf der Migration durch unterschiedliche Kalziumkonzentrationen gesteuert wird (Brundage et al, 1991; Hahn et al, 1992). Auch während Änderungen der Morphologie und Adhärenz bei der Migration kommt es zu repetitiven Kalziumsignalen (Pettit & Fay, 1998). Einer der Hauptfaktoren für die Migration von Zellen sind fokale Adhäsionen, die die Verbindung des Zytoskeletts mit der extrazellulären Matrix darstellen und deren Neubildung und Abbau eine Auswirkung auf die Effizienz der Zellmigration hat. Dabei sind viele der Komponenten, die diese Umstrukturierung steuern, kalziumabhängig, wie z.B. die fokale Adhäsions-Kinase (FAK) oder Calcineurin (Prevarskaya et al, 2011). Für Melanomzellen beschrieben Stanisiz *et al.*, dass SOCE eine regulierende Wirkung auf die Migration hat (Stanisiz et al, 2014). Da Invasion und Migration zu den wichtigsten Charakteristika von Tumorzellen gehören, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwiefern auch mitochondriale Kalziumsignale im Melanom eine Rolle für diese Prozesse haben. Es konnte beobachtet werden, dass der

stabile Knockdown von MCU eine verstärkte Invasion in eine Kollagenmatrix und eine erhöhte Migration zur Folge hatte (vgl. Abbildung 12). Dies deutet darauf hin, dass die Migration nicht nur von zytosolischen, sondern auch von mitochondrialen Kalziumströmen abhängig ist. Die Gruppen um Tosatto *et al.* und Tang *et al.* beschrieben ein gegensätzliches Verhalten in Brustkrebszellen, in denen eine Herunterregulation von MCU zu einer verringerten Migration führte (Tang *et al.*, 2015; Tosatto *et al.*, 2016). Allerdings führten Tang *et al.* diesen Effekt auf die Beeinflussung von SOCE durch MCU zurück, der nach MCU Herunterregulation niedriger war (Tang *et al.*, 2015). Der Vergleich mit den Daten von Tosatto *et al.* weist darauf hin, dass SOCE nicht der alleinige Migrationsregulierende Faktor ist. Diese Gruppe stellte im Gegensatz zu Tang *et al.* einen verstärkten SOCE bzw. keine Veränderung von SOCE nach MCU Herunterregulation fest, während die Zellen trotzdem eine geringere Migration aufwiesen (Tosatto *et al.*, 2016). Da in den in dieser Arbeit untersuchten Melanomzellen auch keine Veränderung des SOCE beobachtet werden konnte, ist es wahrscheinlich, dass die Verstärkung der Migration spezifisch auf die Veränderungen des mitochondrialen Kalziums durch MCU und die hierdurch beeinflussten zellulären ROS-Konzentrationen zurückzuführen ist.

Zur Validierung der *in vitro* Ergebnisse zur Tumorformation und -progression wurde im Zuge dieser Arbeit ein *in vivo* Xenograft Modell untersucht. In einem vorherigen Schritt wurde die Proliferation zur Simulation physiologischerer Bedingungen in einem dreidimensionalen System anhand des Wachstums von Sphäroiden betrachtet. Nachdem zuvor in konventionellen *in vitro* Assays keine Auswirkung der MCU Herunterregulation auf die Proliferation beobachtet werden konnte, zeigten in diesem physiologischeren Ansatz stabile 1205Lu Knockdown-Zellen ein signifikant reduziertes Wachstum der Sphäroide (siehe Abbildung 13). Auch Zeng *et al.*, die keinen Effekt der MCU Herunterregulation auf die *in vitro* Proliferation von Darmkrebszellen detektieren konnten, sahen *in vivo* ein verringertes Tumorwachstum von Darmkrebszellen mit stabilem MCU Knockdown (Zeng *et al.*, 2018). Während in stabilen 1205Lu Zellen deutliche Effekte auf das Sphäroidwachstum zu beobachten waren, zeigten stabile WM3734 Zellen keinen Unterschied zwischen MCU Knockdown und Kontrolle. Dies trägt zu der Annahme bei, dass das mitochondriale Kalzium die ausschlaggebende Rolle bei der Proliferation spielt, da WM3734 einen deutlich schwächeren Kalziumphänotyp aufwiesen als 1205Lu Zellen. Da 1205Lu Zellen mit einer fast vollständigen Inhibition des mitochondrialen Kalziumeinstroms einen starken Phänotyp haben und zudem eine sehr aggressive, hochmetastatische Melanomlinie sind, wurden sie für die *in vivo* Xenograft Versuche ausgewählt. Dabei konnte die stabile Herunterregulation von MCU über die gesamte Dauer des Experiments erfolgreich validiert werden. In Übereinstimmung mit den *in vitro* Daten des Sphäroidwachstums war das Wachstum des Primärtumors aus MCU-Knockdown-Zellen im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Die entstandenen Tumore waren nach stabiler MCU Herunterregulation sowohl kleiner als auch leichter als Kontrolltumore, was darauf hindeutet, dass die Zellproliferation beeinflusst wurde.

Da ein Fehlen von MCU bereits *in vitro* eine stärkere Invasion und Migration zur Folge hatte, stellte sich die Frage, ob die MCU Herunterregulation *in vivo* zu einem erhöhten Potential zur Metastasierung der Melanomzellen führt. In den Versuchen zeigte sich, dass ein höherer Anteil an Tieren mit MCU-Knockdown-Tumoren Lungenmetastasen entwickelt hatte. Zudem konnte in diesen eine höhere Anzahl und eine größere Fläche der Einzelmetastasen gefunden werden (vgl. Abbildung 14). Auch diese Ergebnisse bestärken die Hypothese, dass die Migration und Invasion von Melanomzellen durch mitochondriale Kalziumsignale beeinflusst wird. Dabei liegt die Vermutung nahe, dass die

mitochondrialen Kalziumströme als *second messenger* keine direkte regulatorische Funktion ausüben, sondern über die Regulation weiter reichender Signalkaskaden wirken. Als eine Auswirkung der MCU Herunterregulation konnte eine Verringerung der zellulären Level an  $H_2O_2$  in den untersuchten Melanomzellen festgestellt werden (vgl. 4.5). Zwei verschiedene Gruppen beschrieben vor kurzem unabhängig voneinander einen Einfluss des zellulären Redox-Milieus auf die Metastasierung von Melanomen in Mausmodellen. Die Gruppe um Piskounova zeigte in metastasierenden Melanomzellen eine Veränderung des Metabolismus hin zu einer höheren Produktion von NADP, NADPH und GSH und damit zu einer höheren Resistenz gegenüber oxidativem Stress. Zudem konnte sie eine Verstärkung der Metastasierung bei Behandlung mit Antioxidantien feststellen (Piskounova et al, 2015). Auch Le Gal *et al.* konnten nach Verabreichung von Antioxidantien eine stärkere Metastasierung von Melanomen in Mäusen beobachten. Weiterhin zeigten sie höhere Mengen an GSH in Metastasen nach Antioxidantien-Behandlung (Le Gal et al, 2015). Die von beiden Gruppen festgestellte Erhöhung der Menge an GSH scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen. So konnte eine zusätzliche Behandlung mit prooxidativem BSO die GSH-Menge und Zellmigration wieder reduzieren. Zudem hatte die antioxidative Behandlung keinen Einfluss auf die basalen ROS-Level der Zellen (Le Gal et al, 2015). Auch eine andere Gruppe beschrieb bereits höhere Mengen an GSH in hoch metastatischen Melanomzell-Klonen im Vergleich zu niedrig metastatischen Zellklonen (Carretero et al, 1999). Da ROS durch Reaktion mit GSH zur Umwandlung zur oxidierten Form GSSG führt oder mit GSH-abhängigen Enzymen reagiert (van Haaften et al, 2003), ist es möglich, dass reduzierte zelluläre ROS-Level zu einem ähnlichen Effekt führen. Durch weniger ROS kommt es zu einem geringeren Verbrauch an GSH, dessen erhöhte Menge wiederum einen Einfluss auf die Migration und Invasion der Zellen ausübt. Interessanterweise berichteten die beiden Gruppen um Piskounova und Le Gal von keinen Auswirkungen der Behandlung von Antioxidantien auf das Wachstum des Primärtumors (Le Gal et al, 2015; Piskounova et al, 2015), während in dieser Arbeit ein geringeres Tumorstadium beobachtet werden konnte. Dies legt die Vermutung nahe, dass das Tumorstadium nicht durch die veränderten ROS-Level, sondern durch einen anderen durch mitochondriale Kalziumsignale regulierten Signalweg kontrolliert wird.

In dieser Arbeit konnte im Gegensatz zu den in Brustkrebszellen gezeigten Daten (Tosatto et al, 2016) eine erhöhte Migration nach MCU Herunterregulation festgestellt werden. Da es sich hier allerdings um verschiedene Zelltypen handelt, ist es wahrscheinlich, dass diese eine unterschiedliche Tumorbilologie besitzen und deshalb konträre Effekte vorliegen können. Dagegen konnte der beobachtete Effekt einer verstärkten Migration bzw. Metastasierung auch in Melanomzellen nach Behandlung mit Antioxidantien beschrieben werden (Le Gal et al, 2015; Piskounova et al, 2015) und könnte dementsprechend auch auf eine Verringerung der zellulären ROS-Konzentration zurückzuführen sein. Weiterhin konnte in Übereinstimmung mit den Daten von Zeng *et al.* eine Korrelation eines geringeren Tumorstadiums mit einem verringerten, durch MCU vermittelten, mitochondrialen Kalziumstrom festgestellt werden (Zeng et al, 2018).

## 5.7 Auswirkungen des Redox-Milieus auf die Migration

Nachdem in dieser Arbeit eine verstärkte Migration und Invasion nach MCU Herunterregulation beobachtet werden konnte, stellte sich die Frage, ob dieser Effekt durch die verringerte zelluläre

ROS-Konzentration vermittelt wird. Um dies näher zu untersuchen, wurden 1205Lu Zellen während der Migration mit den Antioxidantien NAC und Trolox oder mit dem prooxidativen Wirkstoff BSO behandelt. In Übereinstimmung mit den Daten von Piskounova und Le Gal wirkte sich die Zugabe von NAC und Trolox nicht signifikant auf die Proliferation der Zellen aus (Le Gal et al, 2015; Piskounova et al, 2015). Mit BSO behandelte Zellen wiesen nach 24 h keine Unterschiede auf, zeigten allerdings nach 48 h eine Tendenz zu einer geringeren Proliferation, die jedoch nicht signifikant war. Unter bestimmten Bedingungen wurde eine Wachstumsinhibition durch BSO bereits in NIH-3T3 Fibroblasten und A549 Adenokarzinomzellen beschrieben (Kang, 1995; Poot et al, 1995). Dementsprechend könnte BSO auch einen Effekt auf die Proliferation von Melanomzellen haben, der möglicherweise aber erst nach längerer Inkubationsdauer deutlich auftritt. Abhängig von der MCU Expression konnte wie zuvor bereits beschrieben (siehe 4.6.2) kein Unterschied im *in vitro* Wachstum beobachtet werden.

Theoretisch betrachtet sollten NAC und Trolox als antioxidativ wirkende Substanzen eine weitere Erhöhung der Migration von MCU-Knockdown-Zellen zur Folge haben, da sie die in den Zellen vorhandene Konzentration an ROS weiter reduzieren sollten. Die Behandlung mit BSO sollte durch eine Hemmung der Glutamatcysteinylase und daraus resultierender verringerter GSH-Mengen die ROS-Level wieder erhöhen und somit die Migration auf Kontrollniveau reduzieren. Im Versuch zeigte sich jedoch keine signifikante Auswirkung einer NAC/Trolox- bzw. BSO-Behandlung auf die Migration der 1205Lu Zellen. Es war allerdings eine Tendenz nach NAC/Trolox-Behandlung zu einer erhöhten bzw. nach BSO-Behandlung zu einer verringerten Migration sowohl in Kontrollzellen als auch in der stabilen MCU Herunterregulation festzustellen (siehe Abbildung 15). Le Gal *et al.* konnten bei Behandlung der Zellen sowohl mit NAC als auch mit Trolox eine signifikante Erhöhung der Migration und Invasion, sowie ein höheres GSH/GSSG Verhältnis erkennen. Im Unterschied zu den hier durchgeführten Messungen zur Migration verwendete die Gruppe ein xCELLigence System, das Änderungen der Impedanz aufzeichnet (Le Gal et al, 2015). Es ist anzunehmen, dass dieses System sensitiver ist und somit auch kleinere Unterschiede leichter feststellbar sind. Zudem zeichnete die Gruppe Migrationsdaten nur über einen kurzen Zeitraum von 10 h auf (Le Gal et al, 2015). Dies war mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode allerdings nicht möglich, da in diesem kurzen Zeitraum keine ausreichende Menge an Zellen migrierte, um ein detektierbares Calcein-Signal zu erhalten. Es könnte sein, dass die Wirkung der eingesetzten Substanzen in diesem Zeitraum am stärksten ist, da die Anfangskonzentrationen noch weitestgehend erhalten sind. NAC ist in saurem Milieu stabil, wird bei neutralem pH, der in Zellkulturmedium vorliegt, allerdings instabiler (SigmaAldrich, 2017). Auch die Stabilität von Trolox über den in dieser Arbeit untersuchten Zeitraum von 48 h ist möglicherweise nicht gegeben. Zwar liegen hierzu keine konkreten Daten vor, allerdings sollten Trolox-Lösungen zur Verwendung nicht länger als einen Tag aufbewahrt werden (CaymanChemical, 2014). Die eindeutiger feststellbaren Effekte von NAC und Trolox auf die Migration von Le Gal im Vergleich zu den hier gewonnenen Daten könnten demnach sowohl auf die Sensitivität der Messmethode als auch auf eine verringerte Konzentration der Substanzen durch den wesentlich längeren Zeitraum zurückzuführen sein. Um einen Abbau der Substanzen ausschließen zu können, müssten die Versuchsreihen erneut mit wiederholter Zugabe der Substanzen nach bestimmten Zeitintervallen durchgeführt werden. Weiterhin sollte die ROS-Konzentration mittels Sensor-basiertem Imaging überprüft werden, um eine ausreichende reduzierende Wirkung der Substanzen auf die verwendete Melanomlinie 1205Lu nachzuweisen. Ein weiterer Ansatzpunkt wäre der Einsatz einer MCU-

Überexpression in 1205Lu Zellen. Da diese zu höheren zellulären  $H_2O_2$ -Konzentrationen führt, sollten sich hier deutlichere Effekte durch eine dem entgegen wirkende, reduzierende Wirkung von NAC und Trolox zeigen. Im Unterschied zu der Versuchsanordnung in dieser Arbeit nutzten Le Gal *et al.* BSO hauptsächlich um NAC- und Trolox-Effekte auszugleichen. Im Gegensatz zu NAC und Trolox ist BSO in wässrigen Lösungen über einen ausreichenden Zeitraum stabil (PubChem, 2018). Trotzdem zeigte die Behandlung mit BSO alleine in Übereinstimmung mit den Daten dieser Arbeit nur eine leichte Reduktion der Migration der Zellen bzw. im Vergleich zu einer DMSO-Kontrolle sogar eine etwas höhere Migration (Le Gal *et al.*, 2015). Da BSO selber nicht als Oxidationsmittel wirkt, sondern nur durch Inhibition der Glutamatcysteinylase zu oxidativem Stress führt, könnte es in Melanomzellen zur Aktivierung von Regulationsmechanismen kommen, die oxidativen Stress vermeiden bzw. verringern können. Um eine klare Aussage treffen zu können, ob ein oxidatives Milieu eine gegenteilige Auswirkung zu Antioxidantien auf die Zellmigration hat, könnte die Zugabe direkter Oxidationsmittel, wie beispielsweise  $H_2O_2$  untersucht werden.

Insgesamt zeigte sich in den hier gewonnenen Daten nur ein tendenzieller, aber nicht signifikanter Anstieg der Migration unter Einfluss der Antioxidantien NAC und Trolox auf die Migration von Melanomzellen, während Le Gal *et al.* eine signifikante Erhöhung der Migration beobachten konnten (Le Gal *et al.*, 2015). Da die in dieser Arbeit verwendeten Versuchsbedingungen von denen der Gruppe um Le Gal abweichen, könnte dies den beobachteten Unterschied in der Stärke des Effektes erklären. Eine eindeutige Aussage zu der Wirkung antioxidativer Substanzen auf die Migration von Melanomzellen kann dementsprechend erst nach weiteren Untersuchungen getroffen werden.

## 5.8 Durch MCU beeinflusste Regulationsmechanismen

Die Herunterregulation von MCU wirkt sich nicht nur auf die mitochondrialen Kalziumsignale aus, sondern kann auch einen Einfluss auf die Expression anderer Proteine haben. So kann MCU stabilisierend auf andere Komponenten des Uniplex wirken: EMRE, MCUB, MICU1 und MICU2 (Petrungaro *et al.*, 2015; Plovanich *et al.*, 2013b; Sancak *et al.*, 2013). Dieser Einfluss scheint allerdings auch zelltypabhängig zu sein, da in dieser Arbeit keine Auswirkungen eines MCU Knockdowns auf die MICU1 Stabilität in Melanomzellen festgestellt werden konnte (vgl. 5.2). Bisher ist über weitere Interaktionspartner außerhalb des Uniplex nur wenig bekannt. Datenbankanalysen geben jedoch Grund zu der Annahme, dass MCU noch mit einer Vielzahl weiterer Proteine interagiert, wie beispielsweise Proteinen der SLC-Transporter-Familie (BioGRID3.4, 2018) (siehe Anhang) und somit auch deren Stabilität beeinflussen könnte. Zusätzlich kann durch Kalziumsignale die Expression unterschiedlicher Gene reguliert werden. Ausgehend von diesem Wissen stellte sich die Frage, wie sich das Fehlen von MCU und die veränderten mitochondrialen Kalziumsignale auf das Expressionsprofil von Melanomzellen auswirken. Um diese Frage zu beantworten, wurde ein RPPA-Screen zur Analyse der Proteinexpression einer ausgesuchten Gruppe an Proteinen durchgeführt. Die dabei gewonnenen Daten geben Hinweise auf Proteine, die direkt oder indirekt durch MCU reguliert werden können (siehe 4.10.1). Der Screen ist hauptsächlich auf eine Auswahl an Proteinen ausgerichtet, die in verschiedenen krebisrelevanten Signalwegen eine Rolle spielen, wie Proteine des PI3K/Akt-, MAPK- oder TGF- $\beta$ -Signalweges, Rezeptortyrosinkinasen und Proteinen, die für die Zellzyklusregulation, Apoptose oder DNA-Reparatur verantwortlich sind (MD\_Anderson\_RPPA\_Core\_Facility, 2017). Die

gewonnenen Ergebnisse dienen als Hinweise, die allerdings mittels weiterer Methoden, wie Western Blot, qRT-PCR oder Immunfluoreszenz, überprüft und validiert werden müssen, bevor definitive Aussagen gemacht werden können.

Ein sehr interessantes positives Ergebnis war VDAC1, das in der äußeren mitochondrialen Membran lokalisiert ist und dort sowohl eine Kontaktstelle zu  $IP_3$ -Rezeptoren darstellt, als auch eine vermittelnde Funktion bei der Öffnung der mPTP einnimmt. Zur Validierung der RPPA Daten wurden Western Blots für VDAC1 durchgeführt, welches im Screen in stabilen 1205Lu eine sehr starke und in WM3734 eine gemäßigte Herunterregulation seiner Expression aufwies. Im Western Blot konnte allerdings für keine der beiden stabilen Knockdown-Linien eine Reduktion des VDAC1-Proteins nachgewiesen werden (siehe Abbildung 19). Auch im transienten Knockdown von MCU mittels siRNA zeigte sich kein Unterschied in der Expression in WM3734 Zellen. Einzig bei transientser MCU Herunterregulation in 1205Lu konnte eine signifikante Reduktion festgestellt werden. Bereits in den RPPA Daten waren für alle positiven Ergebnisse wesentlich stärkerer Effekt in 1205Lu Zellen als im Vergleich zu WM3734 erkennbar. Zwar war die Herunterregulation von MCU auf RNA- und Proteinebene in WM3734 ähnlich effizient wie in 1205Lu, allerdings zeigten sich hier noch deutlich stärkere mitochondriale Kalziumeinströme als in 1205Lu. Dies deutet darauf hin, dass die Expression der meisten hier gefundenen positiven Ergebnisse hauptsächlich durch mitochondriale Kalziumsignale kontrolliert werden könnten. Allerdings wurde für VDAC1 bereits auch eine direkte physische Interaktion mit MCU beschrieben (Liao et al, 2015). Eine zusätzliche Regulation der Menge an VDAC1 durch eine Stabilisierung des Proteins über Interaktion mit MCU lässt sich demnach nicht ausschließen. Der beobachtete Unterschied zwischen der VDAC1 Expression im stabilen und transienten Knockdown in 1205Lu könnte infolge von Anpassungen der stabilen Zelllinien über längere Zeiträume entstanden sein. Bei der Herunterregulation mittels siRNA wurden die Zelllysate 72 h nach Transfektion gewonnen, d.h. zu einem Zeitpunkt, zu dem bereits eine effiziente Reduktion von MCU vorlag, die Zellen aber noch nicht ausreichend Zeit hatten, um kompensatorische Mechanismen für das Fehlen von MCU zu aktivieren. In den stabilen Knockdown-Linien wurden die Proben für die RPPA-Analyse und die Western Blots zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Kultivierung genommen. Während Proben für die RPPA-Analyse zu einem sehr frühen Zeitpunkt nach Herstellung der stabilen Zelllinien genommen wurden, wurden Proben für Western Blots aus späteren Passagen verwendet. Die Zelllinien wurden maximal bis zu einer Dauer von drei Monaten in Kultur gehalten, um mögliche Veränderungen zu vermeiden. Möglicherweise können allerdings schon in diesem Zeitraum Kompensationsmechanismen aktiviert werden. Um dies zu überprüfen, müsste die Messung der mitochondrialen Kalziumaufnahme in regelmäßigen Abständen über den Verlauf der Kultivierung kontrolliert werden. Weiterhin sollte eine niedrige Passagezahl der Zelllinien, in der noch keine kompensatorischen Veränderungen stattgefunden haben, auf ihre VDAC1 Expression getestet werden. Sollte sich auch in diesen Zellen eine Herunterregulation von VDAC1 bestätigen, wäre dies ein interessanter Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen. MCU wäre somit in der Lage nicht nur die Kalziumaufnahme in die Matrix zu regulieren, sondern durch Kontrolle der VDAC1 Expression auch den Austausch anderer Moleküle zwischen den Mitochondrien und dem Zytosol zu beeinflussen. Zudem wäre ein Nachweis einer Veränderung der VDAC1 Expression durch kompensatorische Mechanismen über die Dauer der Kultivierung ein weiterer Hinweis auf eine zugrunde liegende Regulation der Expression durch Kalziumsignale und weniger durch eine MCU-VDAC1-Interaktion.

Neben VDAC1 wurden weitere Proteine auf ihre Expression in Abhängigkeit der MCU Herunterregulation getestet, die nicht durch die RPPA-Analyse abgedeckt waren, allerdings aufgrund bekannter Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen interessant waren. Eines dieser untersuchten Proteine ist JARID1B, eine Histon-Demethylase, die in extrem langsam proliferierenden Melanomzellen exprimiert wird, in denen auch charakteristisch Enzyme der oxidativen Phosphorylierung verstärkt exprimiert werden (Roesch et al, 2010; Roesch et al, 2013). Stanisz *et al.* beschrieben bereits einen Einfluss zytosolischer Kalziumströme auf JARID1B. Sie beobachteten in Melanomzellen nach Herunterregulation der SOCE-Komponenten STIM1/2 und Orai1 eine verringerte Expression dieses Markers, einhergehend mit einer stärkeren Proliferation (Stanisz et al, 2014). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch kein Einfluss von MCU auf die JARID1B Expression festgestellt werden (vgl. Abbildung 17). Hierbei ist jedoch zu beachten, dass in Standard-*in vitro* Assays auch keine Auswirkungen einer MCU Herunterregulation auf die Proliferation nachgewiesen werden konnte. Da erst in einem physiologischeren System bzw. *in vivo* ein Effekt auf die Proliferation zu beobachten war, könnte es sein, dass unter diesen Bedingungen auch eine Erhöhung der JARID1B Expression stattfindet. Um dies zu untersuchen, sollten Proteinlysate der Primärtumore oder Proben aus geformten Sphäroiden im Western Blot auf JARID1B getestet werden.

Ein weiterer untersuchter Faktor, der mit der Regulation der Proliferation in Zusammenhang steht, ist MITF. Dieser kalziumabhängige Transkriptionsfaktor ist ein wichtiger Regulator der Proliferation im Melanom (Garraway et al, 2005; Levy et al, 2006; Wellbrock & Arozarena, 2015). Im Gegensatz zu JARID1B wäre für MCU depletierte Zellen mit verlangsamter Proliferation eine Verringerung der MITF Expression zu erwarten. Diese Regulation sollte über die veränderten Kalziumströme stattfinden, da eine Änderung des Redox-Milieus keine Auswirkungen auf die MITF Expression hat (Le Gal et al, 2015). In Übereinstimmung mit dieser Erwartung konnte für eine der beiden Knockdown-Linien eine signifikante Reduktion an MITF auf Proteinebene nachgewiesen werden (siehe Abbildung 17). Hier scheint bereits unter normalen *in vitro* Bedingungen eine Veränderung von Faktoren, wie beispielsweise eine verringerte Expression von Wachstumsfaktoren, stattzufinden, die für die Proliferation relevant sind. Möglicherweise müssen demnach mehrere Faktoren zusammenspielen, um messbar das Wachstum der Zellen zu beeinflussen. Da Proliferation durch verschiedene Signalwege reguliert werden kann, ist es wahrscheinlich, dass unter physiologischeren Bedingungen verschiedene regulatorische Mechanismen zusammenwirken, welche die Proliferation messbar beeinflussen. Dies könnte eine Erklärung für die beobachteten Unterschiede in den *in vitro* und *in vivo* Daten darstellen.

Ein durch MITF direkt reguliertes Protein ist PGC1 $\alpha$ , das eine essentielle Funktion in der Regulation der mitochondrialen Biogenese und des oxidativen Metabolismus einnimmt (Puigserver & Spiegelman, 2003; Scarpulla, 2011). Eine Überexpression von PGC1 $\alpha$  ist mit einer erhöhten Expression von Proteinen, die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind und einer Resistenz gegenüber oxidativem Stress assoziiert (Haq et al, 2013a; Vazquez et al, 2013). Da MITF durch Kalzium reguliert ist, wurde die Auswirkung der MCU Herunterregulation auf die Expression von PGC1 $\alpha$  untersucht. Nachdem eine Reduktion von MITF detektiert werden konnte, würde dies für eine entsprechende Verringerung der PGC1 $\alpha$ -Level sprechen. Anhand der durchgeführten Western Blots konnte jedoch aufgrund der starken Schwankungen der Bandenstärke zwischen den einzelnen Versuchen und der widersprüchlichen Ergebnisse der beiden Knockdown-Linien keine klare Aussage

über die Proteinmenge von PGC1 $\alpha$  getroffen werden (siehe Abbildung 18). Die hohen Standardabweichungen durch die starken Unterschiede der Bandenstärke der Einzelexperimente könnten durch einen unterschiedlichen Abbau des Proteins im Laufe der Proteinisolation zustande kommen. Auch wäre es möglich, dass das gewählte Referenzprotein GAPDH in diesem Fall nicht geeignet ist. Um ein aussagekräftigeres Ergebnis zu erhalten, könnten verschiedene Referenzproteine getestet werden.

## 5.9 Einfluss von MCU auf die Sensitivität von Melanomzellen gegenüber Inhibitoren

Verschiedene Studien deuten bereits seit längerem darauf hin, dass Mitochondrien an der Entstehung von Resistenzmechanismen im Melanom beteiligt sind. Sowohl Vazquez *et al.* als auch Roesch *et al.* beschrieben Subpopulationen in Melanomzellen, in denen Proteine der oxidativen Phosphorylierung verstärkt exprimiert sind. Diese weisen eine erhöhte Resistenz gegenüber oxidativem Stress bzw. gegenüber verschiedenen Wirkstoffen wie Cisplatin oder Vemurafenib auf (Roesch *et al.*, 2013; Vazquez *et al.*, 2013). Durch Inhibition der mitochondrialen Atmungskette ist es allerdings möglich, Melanomzellen wieder sensitiv gegenüber BRAF-Inhibitoren zu machen (Roesch *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2013). Um zu untersuchen, ob die Herunterregulation von MCU auch einen Einfluss auf die Sensitivität gegenüber verschiedenen Wirkstoffen hat, wurden die stabilen Knockdown-Zelllinien über mehrere Tage behandelt und ihre Viabilität gemessen. Dabei wurden Inhibitoren aus drei unterschiedlichen Gruppen betrachtet: Inhibitoren des PI3K/Akt-Signalweges, Inhibitoren des MAPK-Signalweges und ein Inhibitor des Ca<sup>2+</sup>-Import-Modus von NCX.

Die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges geschieht durch Bindung bestimmter aktivierender Liganden an ihre Rezeptoren, welche die Produktion von PIP3 durch die Proteinkinase PI3K induzieren. PIP3 ist in der Lage Akt zu binden, welches hierdurch durch PDK1 (Pyruvat-Dehydrogenase-Kinase 1) und mTOR2 phosphoryliert und somit aktiviert werden kann. Aktiviertes Akt phosphoryliert und aktiviert somit wiederum mTOR1, was die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren zur Folge hat. Durch die Regulation von mTOR und weiterer Proteine, wie p21 oder p27, spielt der PI3K/Akt-Signalweg eine wichtige Rolle für das Wachstum und die Proliferation von Zellen. Weiterhin kann der aktive Signalweg proapoptische Proteine wie Bad inhibieren und somit den Zelltod verhindern. Der PI3K/Akt-Signalweg ist in Tumorzellen durch Mutationen oft konstitutiv aktiv, was ihn zu einem attraktiven Ziel in der Krebstherapie macht (Davies, 2012). Alle drei in dieser Arbeit eingesetzten Inhibitoren sind spezifisch für ein Protein des Signalweges: Pictilisib inhibiert PI3K am Anfang der Signalkaskade, MK2206 ist ein Inhibitor von Akt, während AZD2014 spezifisch das durch Akt regulierte mTOR blockiert. Insgesamt betrachtet hatten niedrige Konzentrationen der jeweiligen Inhibitoren kaum Auswirkungen auf die Viabilität der Zellen. Meist war erst bei höheren Konzentrationen von 300 nM und 1  $\mu$ M ein Effekt zu beobachten. Nach einer Behandlung mit den Wirkstoffen über drei Tage war hier sowohl für Pictilisib als auch für AZD2014 eine Reduktion der Zellviabilität erkennbar, wobei shMCU-Zellen eine deutlich geringere Viabilität als Kontrollzellen zeigten (vgl. Abbildung 20). Dagegen hatte der Akt-Inhibitor MK2206 keine Wirkung innerhalb dieser kurzen Behandlungsdauer. Eine Verdopplung der Inkubationszeit führte in WM3734 zu einem unerwarteten Effekt in Form eines Anstiegs des Wachstums behandelter Zellen im Vergleich

zur Medium- bzw. DMSO-Kontrolle. Einzig bei der Behandlung mit AZD2014, das die stärksten Effekte hervorrief, war eine verringerte Viabilität bei der höchsten Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  festzustellen, während auch die niedrigeren Konzentrationen einen eher stimulierenden Effekt auf das Wachstum ausübten. WM3734 Zellen scheinen sich demnach innerhalb kurzer Zeit an die Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges anzupassen und diese sogar noch zur Verbesserung des Wachstums nutzen zu können. Hierbei machte sich ein Unterschied zwischen Kontrollzellen und shMCU-Zellen bemerkbar. Kontrollzellen erreichten eine stärkere Wachstumsstimulation, während MCU-Knockdown-Zellen eine signifikant stärkere Sensitivität auf die Inhibition durch AZD2014 aufwiesen.

Auch in 1205Lu Zellen ließen sich stärkere Auswirkungen der Inhibitoren auf shMCU-Zellen beobachten. Während die Behandlung eine stimulatorische Wirkung auf das Wachstum von WM3734 Zellen zeigte, war dieser Effekt in 1205Lu Zellen nicht erkennbar. Im Gegensatz zu WM3734 Zellen tragen 1205Lu eine hemizygoten Deletion von PTEN (*phosphatase and tensin homolog*). PTEN ist eine Phosphatase, die ihre Zielsubstrate, wie z.B. PIP3 und Akt1 dephosphoryliert und somit zu einer Deaktivierung des PI3K/Akt-Signalweges beiträgt. In vielen Tumoren führt eine Mutation oder Deletion von PTEN zu einem unkontrolliert aktivierten PI3K/Akt-Signalweg und damit zu ungehindertem Wachstum (Worby & Dixon, 2014). Auch in 1205Lu Zellen kann durch einen Mangel an PTEN dieser Signalweg nicht ausreichend kontrolliert werden, weshalb dieser vermutlich eine der Hauptantriebskräfte des unkontrollierten Zellwachstums darstellt. Im Unterschied dazu wird in WM3734 die Zellproliferation wahrscheinlich hauptsächlich durch andere Mutationen angetrieben. In Übereinstimmung mit den gewonnenen Daten hat demnach eine Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges eine stärkere Auswirkung auf das Wachstum der PTEN mutierten 1205Lu Zelllinie als auf PTEN wildtypische WM3734 Zellen. Hierbei ist anzumerken, dass eine Behandlung der WM3734 Zellen mit PI3K-/Akt-/mTOR-Inhibitoren sogar kontraproduktiv für eine Reduktion der Viabilität ist, da sich die Zellen sehr schnell anpassen und das Wachstum eher stimuliert als inhibiert wird.

Sowohl in WM3734 als auch in 1205Lu waren Zellen ohne MCU sensitiver gegenüber der Behandlung mit Inhibitoren. Hierfür bieten sich unterschiedliche Erklärungen. Zum einen könnte hier nur die bereits beschriebene Reduktion der Proliferation durch die Herunterregulation von MCU zum Tragen kommen (vgl. 5.5 und 5.6). In der hier eingesetzten Art des Assays konnte zuvor zwar kein Effekt auf die Proliferation beobachtet werden (vgl. 4.6.2), weitere Daten dieser Arbeit ließen allerdings darauf schließen, dass zusätzliche Faktoren nötig sind, um einen ausreichenden Einfluss auf die Proliferation zu haben (siehe 5.6). Die Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges könnte dementsprechend dazu beitragen, eine durch MCU vermittelte Reduktion der Proliferation zu verstärken. Um diese Theorie zu überprüfen, könnten das Wachstum von behandelten und unbehandelten Sphäroiden verglichen werden. Sollte die Inhibition des PI3K/Akt-Signalweges nur ein weiterer Faktor neben mehreren anderen Faktoren sein, der den Effekt des MCU Knockdowns verstärkt, wäre hier nur ein geringer Unterschied in den Größen der Sphäroide zu erwarten. Eine andere mögliche Erklärung für die erhöhte Sensitivität von shMCU-Zellen wäre, dass Kontrollzellen mit normalen MCU-Leveln den Auswirkungen der Inhibition des Signalweges durch Kalzium-gesteuerte Aktivierung anderer Mechanismen entgegensteuern können, während dies Zellen ohne MCU nicht möglich ist.

Vergleicht man die einzelnen Inhibitoren miteinander, fällt auf, dass sie sich in der Stärke ihrer Wirkung deutlich voneinander unterscheiden, obwohl alle den PI3K/Akt-Signalweg als Ziel haben. Inte-

ressanterweise zeigte der Akt-Inhibitor MK2206 kaum eine Wirkung auf die Viabilität der Zellen. Möglicherweise könnten die in dieser Arbeit eingesetzten Konzentrationen des Wirkstoffs zu gering gewählt worden sein. Obwohl für MK2206 in zellfreien Assays  $IC_{50}$ -Werte im nanomolaren Bereich mit 5 nM für Akt1, 12 nM für Akt2 und 65 nM für Akt3 ermittelt wurden (Yan, 2009), scheinen diese Werte für lebende Zellen wesentlich höher zu liegen, da sich Konzentrationen unter 1  $\mu$ M kaum auf Proliferation, Apoptose und Viabilität in Melanomzellen auswirken (Rebecca et al, 2014). Während eine Einzelbehandlung mit MK2206 oft nur eine geringe Wirkung hat, kommt es allerdings in Kombination mit anderen in der Krebstherapie eingesetzten Substanzen zu einem synergetischen Effekt (Cao et al, 2017; Hirai et al, 2010; Rebecca et al, 2014). Demnach sind die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse nachvollziehbar, wobei weitere Versuche mit Kombinationen anderer Wirkstoffe mit MK2206 einen aussagekräftigen Effekt haben könnten. Im Vergleich mit den anderen Wirkstoffen zeigte der mTOR-Inhibitor AZD2014 den stärksten Effekt. Ein möglicher Grund hierfür könnte die Position von mTOR am Ende der PI3K/Akt-Signalkaskade sein. Wird mTOR inhibiert, hat die Zelle nur wenige Möglichkeiten dies durch Aktivierung anderer Mechanismen zu umgehen. Bei einer Inhibierung von PI3K hingegen, das zu Beginn der Signalkaskade steht, könnten andere Faktoren im Verlauf des Signalwegs gegenreguliert werden. So kann beispielsweise mTOR auch unabhängig von Akt als Antwort auf verschiedene andere Faktoren, wie die Verfügbarkeit von Nährstoffen, Hypoxie oder durch den AMPK-Signalweg aktiviert werden (Memmott & Dennis, 2009).

In mehr als der Hälfte aller Melanome liegt eine Mutation in BRAF vor (Cancer Genome Atlas, 2015), wodurch es in diesen Zellen zu einer konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signalweges kommt. Dieser Signalweg ist durch seine häufige Aktivierung in Melanomzellen ein attraktives Ziel in der Therapie. Wie bereits beschrieben (siehe 1.1.2) werden in der Melanomtherapie die beiden Inhibitoren Vemurafenib und Trametinib eingesetzt. Vemurafenib ist ein direkter Inhibitor von BRAF, während Trametinib an der darauf folgenden Stelle der Signalkaskade durch Inhibition von MEK, welches durch BRAF aktiviert wird, ansetzt. Da sowohl WM3734 als auch 1205Lu Zellen eine V600E Mutation in BRAF tragen, war eine inhibitorische Wirkung auf das Wachstum der Zellen zu erwarten. In klinischen Studien hatten sowohl Vemurafenib als auch Trametinib ähnliche Auswirkungen auf das progressionsfreie sowie das gesamte Überleben der Patienten (Chapman et al, 2011; Flaherty et al, 2012). In den in dieser Arbeit *in vitro* durchgeführten Versuchen zeigten sich Melanomzellen allerdings wesentlich sensitiver gegenüber Trametinib im Vergleich zu Vemurafenib (siehe Abbildung 21). Vemurafenib hatte in 1205Lu Zellen kaum einen Effekt auf die Viabilität, wobei sich nach längerer Inkubation mit den höchsten eingesetzten Konzentrationen eine leichte Tendenz zur Wachstumsinhibition zeigte. Die Behandlung mit Trametinib zeigte dagegen deutlich stärkere Effekte, wobei bereits etwas niedrigere Konzentrationen eine inhibitorische Wirkung hatten. Im Vergleich zu 1205Lu wiesen WM3734 Zellen eine deutlich höhere Sensitivität gegenüber einer Inhibition des MAPK-Signalweges auf. Bei Behandlung mit höheren Konzentrationen Vemurafenib konnte die Viabilität bereits nach kürzerer Inkubationsdauer signifikant reduziert werden. Wie in 1205Lu Zellen hatte auch in WM3734 Trametinib eine wesentlich stärkere Wirkung. Hier führten bereits sehr niedrige Konzentrationen des Wirkstoffs zu einer starken Inhibition des Zellwachstums. Sowohl bei Behandlung mit Vemurafenib als auch mit Trametinib zeigten sich in WM3734 deutlich stärkere Effekte als in 1205Lu Zellen, obwohl beide Linien eine V600E Mutation in BRAF tragen. Melanomzellen können neben Mutationen in BRAF allerdings auch noch andere charakteristische Mutationen besitzen. Während dies in WM3734 nicht der Fall ist, weisen 1205Lu Zellen wie bereits beschrieben

noch eine PTEN-Mutation und eine Mutation in der Cyclin-abhängigen Kinase 4 (CDK4) auf. Während WM3734 erst über längere Zeiträume Resistenzmechanismen entwickeln müssen, sind 1205Lu vermutlich in der Lage bei Inhibition von BRAF ihre Proliferation direkt über den PI3K/Akt-Signalweg anzutreiben und somit die Blockade des MAPK-Signalweges zu kompensieren. Hierfür sprechen auch die Daten von Perna *et al.*, in denen eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweges bei BRAF-Inhibition beschrieben werden konnte (Perna et al, 2015).

In 1205Lu Zellen hatte die Expression von MCU keine erkennbare Auswirkung auf die Viabilität. Dagegen waren in den sensitiveren WM3734 Zellen klare Unterschiede in der Wirkung der Inhibitoren auf Kontroll- und shMCU-Zellen zu beobachten, wobei Zellen mit herunterreguliertem MCU sensitiver waren. Verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben bereits, dass in Melanomen die Behandlung mit BRAF-Inhibitoren zu einer erhöhten Aktivierung der oxidativen Phosphorylierung führt (Corazao-Rozas et al, 2016; Corazao-Rozas et al, 2013; Haq et al, 2013a). Auch in einer Subpopulation an Melanomzellen, die resistent gegenüber verschiedenen Wirkstoffen wie Cisplatin oder Vemurafenib ist, konnte eine erhöhte Expression von Proteinen der oxidativen Phosphorylierung als ein Resistenzmechanismus nachgewiesen werden (Roesch et al, 2013). Eine Inhibition der Komplexe der mitochondrialen Atmungskette ist dementsprechend in der Lage, die Sensitivität gegenüber diesen Wirkstoffen wieder herzustellen bzw. zu erhöhen (Roesch et al, 2013; Trotta et al, 2017; Yuan et al, 2013). Zudem beschrieben Corazao-Rozas *et al.* interessante Auswirkungen von Vemurafenib auf das mitochondriale Kalzium. Mit Vemurafenib behandelte Melanomzellen zeigten eine erhöhte Pufferkapazität der Mitochondrien und einen höheren mitochondrialen Kalziumeinstrom, welcher vermutlich auf eine größere Anzahl an Kontaktstellen zwischen dem ER und den Mitochondrien zurückzuführen ist. Eine zusätzliche Behandlung der Zellen mit Oligomycin konnte die mitochondriale Kalziumaufnahme verringern. Dabei induzierte Oligomycin eine Inhibition der mitochondrialen Atmungskette und sensitivierte Zellen gegenüber Vemurafenib (Corazao-Rozas et al, 2016). Demnach kann eine Herunterregulation von MCU ähnliche Auswirkungen wie Inhibitoren der oxidativen Phosphorylierung haben, indem sie die Aufnahme von Kalzium in die Mitochondrien und somit letztendlich die oxidative Phosphorylierung inhibiert, was eine höhere Sensitivität gegenüber den eingesetzten Wirkstoffen nach sich zieht.

Da die mitochondriale Kalziumaufnahme über MCU einen Einfluss auf die Viabilität von Melanomzellen gegenüber Signalweg-Inhibitoren hatte, stellte sich die Frage, ob sich auch eine Manipulation der zytosolischen Kalziumkonzentrationen auf die Viabilität der Melanomzellen auswirkt. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden die Zellen mit dem NCX-Inhibitor KB-R7943 behandelt, der den reversen Transportmodus, bei dem Kalziumionen in die Zelle transportiert werden, inhibiert (Iwamoto et al, 1996). Da KB-R7943 allerdings nicht spezifisch auf NCX wirkt, konnte zudem eine inhibitorische Wirkung auf Ryanodinrezeptoren (Barrientos et al, 2009), SOCE (Arakawa et al, 2000), spannungsgesteuerte L-Typ Kalziumkanäle (Ouardouz et al, 2005) und TRPC-Kanäle (Kraft, 2007) beschrieben werden. Aufgrund dieser vielfältigen Inhibition von Kalzium-Transportwegen sollte eine Behandlung mit dem Wirkstoff zu verringerten zytosolischen Kalziumeinströmen führen. Weiterhin könnte KB-R7943 Auswirkungen auf das mitochondriale Kalzium haben, da es auch ein Inhibitor der mitochondrialen Kalziumaufnahme (Santo-Domingo et al, 2007) und des Komplex I der mitochondrialen Atmungskette ist (Brustovetsky et al, 2011). In den durchgeführten Assays konnte kein Unterschied im Wachstum zwischen behandelten und unbehandelten Zellen, unabhän-

gig von ihrem MCU-Expressionsstatus festgestellt werden (siehe Abbildung 22). Obwohl gerade metastatische Melanomzellen vermehrt den reversen Modus von NCX nutzen (Sennoune et al, 2015), scheint dessen Inhibition und somit die Reduktion des zytosolischen Kalziums keine Konsequenzen für die Proliferation und Viabilität der Zellen zu haben. Allerdings konnte in dieser Art des Assays auch kein Effekt verringerter mitochondrialer Kalziumströme durch MCU Herunterregulation auf die Proliferation beobachtet werden (vgl. 4.6.2). Auch hier könnten weiterführende Experimente in einem dreidimensionalen Versuchsaufbau mit Sphäroiden möglicherweise weitere Informationen liefern. Zudem ist nicht bekannt, in welchem Maß die Kalziumströme in Melanomzellen wirklich durch eine Behandlung in den verwendeten Konzentrationen beeinflusst werden. Vor der Durchführung weiterer Experimente sollte dies anhand von zytosolischen und auch mitochondrialen Kalzium-Messungen überprüft werden.

## 5.10 Die Rolle von MCU in Krebs

Die Rolle von MCU für die Regulation mitochondrialer Kalziumströme, sowie weiterer zellulärer Mechanismen bei der Entstehung und Progression von Krebs, wird immer intensiver untersucht und scheint wesentlich komplexer zu sein als zunächst angenommen. Wiel *et al.* beschrieben eine Funktion von MCU und mitochondrialen Kalziumströmen für die Aufrechterhaltung der Seneszenz von Zellen und damit für ihren Verbleib in einem nicht proliferativen Zustand. Über den IP<sub>3</sub>-Rezeptor strömt dabei Kalzium aus dem ER und über MCU in die mitochondriale Matrix, was zu einer erhöhten ROS-Produktion und Seneszenz führt. Geht diese Signalweiterleitung durch das Fehlen des IP<sub>3</sub>-Rezeptors oder von MCU verloren, können Zellen aus der Seneszenz entkommen, was ein erster Schritt der Tumorentstehung ist (Wiel et al, 2014). Allerdings zeigen Daten anderer Arbeitsgruppen, dass die Rolle von MCU in verschiedenen Krebsarten sehr unterschiedlich sein kann. Marchi *et al.* fanden heraus, dass in Darm- und Prostatakrebs hohe Level der micro RNA miR-25 exprimiert sind, die unter anderem spezifisch die Expression von MCU und damit den Ca<sup>2+</sup>-Einstrom in die Mitochondrien herunterregulieren. Die Gruppe konnte sowohl in Darmkrebszelllinien als auch in Darmkrebs-Primärtumoren von Patienten eine verringerte Menge an MCU detektieren. Die hierdurch verringerten Kalziumströme tragen zur Desensibilisierung gegenüber apoptotischen Stimuli bei und erhöhen so die Viabilität der Tumorzellen (Marchi et al, 2013). Im Widerspruch zu den Daten von Marchi *et al.*, stellten Zeng *et al.* in Darmkrebs-Patientenproben höhere Level an MCU fest, die durch die „receptor-interacting protein kinase 1“ (RIPK1) reguliert werden und erhöhte mitochondriale Kalziumeinströme zur Folge haben. Auch hier führte eine Herunterregulation von RIPK1 oder MCU zu einem verringerten Tumorwachstum *in vivo* (Zeng et al, 2018). Ähnliche Ergebnisse konnten für Brustkrebs gezeigt werden, in dem der Einfluss von MCU auf Tumorwachstum und -progression bisher am stärksten untersucht wurde. In Brustkrebs ist MCU im Vergleich zu gesundem Gewebe höher exprimiert und korreliert mit der Stärke des Lymphknotenbefalls und der Größe des Tumors (Curry et al, 2013; Hall et al, 2014; Tang et al, 2015; Tosatto et al, 2016). Interessanterweise konnte jedoch kein Einfluss eines MCU Knockdowns auf die Induktion des Zelltods durch unterschiedliche Stresstimuli festgestellt werden (Curry et al, 2013; Hall et al, 2014). Trotzdem benötigen Brustkrebszellen MCU für Tumorbildung und -wachstum *in vivo* (Tosatto et al, 2016). Weiterhin spielt MCU auch in Brustkrebs eine essentielle Rolle für die Metastasierung, da verringerte MCU-Level zu einer verringerten Migration, Invasion und metastatischen Ausbreitung

führen (Tang et al, 2015; Tosatto et al, 2016). Der dabei wirkende Mechanismus ist jedoch noch umstritten. Während Tang *et al.* vermuten, dass ein MCU Knockdown SOCE und damit auch die Migration verringert (Tang et al, 2015), führen Tosatto *et al.* diese Effekte auf einen anderen Signalweg zurück. Sie beobachteten, dass die Reduktion des Kalziumeinstroms in die Mitochondrien eine geringere ROS-Produktion und eine niedrigere HIF-1 $\alpha$  Expression zur Folge hat (Tosatto et al, 2016). Im Gegensatz zu den Daten in Brustkrebs konnte in der vorliegenden Arbeit eine Verstärkung der Migration und Invasion nach MCU Knockdown beobachtet werden. Allerdings konnte wie auch in Darmkrebszellen ein geringeres Tumorwachstum nach Herunterregulation von MCU festgestellt werden. Die Rolle von MCU bei der Tumorentstehung und -progression ist in Anbetracht der unterschiedlichen Ergebnisse der Arbeitsgruppen stark abhängig von der Krebsart und dem Stadium der Progression. Hierbei wirken sich vermutlich die Heterogenität in der Tumorentstehung, wie spezifische Mutationen und damit einhergehende Aktivierung von Signalwegen, unterschiedliche Stressstimuli sowie die gewebetypische Mikroumgebung aus.

## 5.11 Abschließende Bemerkungen

In dieser Arbeit sollte die Rolle von MCU für das Melanom näher untersucht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass MCU die Proliferation von Melanomzellen *in vivo* und unter bestimmten Bedingungen *in vitro* reguliert und geringere Mengen an MCU das Wachstum reduzieren können. Gleichzeitig ist MCU ein Regulator der Metastasierung, wobei eine Herunterregulation eine verstärkte Migration und Invasion nach sich zieht, die vermutlich durch Änderungen in der zellulären ROS-Produktion bedingt sind. Zudem kann MCU Auswirkungen auf die Expression weiterer Proteine wie VDAC1 und MITF haben und hierdurch möglicherweise weitere regulatorische Funktionen einnehmen. Interessanterweise konnten in Melanomzelllinien primärer Tumore höhere Mengen an MCU-mRNA detektiert werden als in Zelllinien metastasierter Xenograft-Tumore, was auf eine Regulation des mitochondrialen Kalziums abhängig vom Tumorstadium hindeutet. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten sprechen dafür, dass MCU für das Tumorwachstum im Melanom benötigt wird. In späteren Stadien könnte es zu einem Phänotypwechsel mit geringeren Mengen an MCU kommen, der die Proliferation der Zellen wieder verringert, dabei jedoch die Metastasierung antreibt. Weiterhin konnte ein Einfluss von MCU auf die Sensitivität gegenüber Signalweg-Inhibitoren gezeigt werden.

MCU ist trotz seines Einflusses auf das Melanom nicht als Onkogen zu betrachten, da bisher nicht bekannt ist, inwiefern MCU-Mutationen zu der Entstehung eines Primärtumors aus gesunden Melanozyten beitragen. Vielmehr könnte MCU eine Rolle als sogenannter „Passenger“ einnehmen, der Auswirkungen auf die Kinetik von Proliferation, Zellwachstum, Migration und Metastasierung hat (Hoth, 2016). Da dies wichtige Faktoren für die beim Melanom sehr kritische Tumormetastasierung und -progression sind, ist deren Einflussnahme allerdings nicht zu unterschätzen. Eine Aufklärung der zugrunde liegenden Mechanismen kann somit das Verständnis der Metastasierung des Melanoms erweitern und Hinweise auf neue Möglichkeiten einer erfolgreichen Melanomtherapie geben.

## Literaturverzeichnis

Antony AN, Paillard M, Moffat C, Juskeviciute E, Correnti J, Bolon B, Rubin E, Csordas G, Seifert EL, Hoek JB, Hajnoczky G (2016) MICU1 regulation of mitochondrial Ca(2+) uptake dictates survival and tissue regeneration. *Nature communications* **7**: 10955

Arakawa N, Sakaue M, Yokoyama I, Hashimoto H, Koyama Y, Baba A, Matsuda T (2000) KB-R7943 inhibits store-operated Ca(2+) entry in cultured neurons and astrocytes. *Biochemical and biophysical research communications* **279**: 354-357

Arnaudeau S, Kelley WL, Walsh JV, Jr., Demaurex N (2001) Mitochondria recycle Ca(2+) to the endoplasmic reticulum and prevent the depletion of neighboring endoplasmic reticulum regions. *The Journal of biological chemistry* **276**: 29430-29439

Babcock DF, Herrington J, Goodwin PC, Park YB, Hille B (1997) Mitochondrial participation in the intracellular Ca2+ network. *The Journal of cell biology* **136**: 833-844

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC, Jr., Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK (2009) Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**: 6199-6206

Barrientos G, Bose DD, Feng W, Padilla I, Pessah IN (2009) The Na+/Ca2+ exchange inhibitor 2-(2-(4-(4-nitrobenzyloxy)phenyl)ethyl)isothiurea methanesulfonate (KB-R7943) also blocks ryanodine receptors type 1 (RyR1) and type 2 (RyR2) channels. *Molecular pharmacology* **76**: 560-568

Basso E, Fante L, Fowlkes J, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P (2005) Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of Cyclophilin D. *The Journal of biological chemistry* **280**: 18558-18561

Bauer J, Garbe C (2003) Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment cell research* **16**: 297-306

Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Kotliansky V, Mootha VK (2011) Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**: 341-345

Bernardi P (1999) Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiological reviews* **79**: 1127-1155

Beutner G, Sharma VK, Giovannucci DR, Yule DI, Sheu SS (2001) Identification of a ryanodine receptor in rat heart mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **276**: 21482-21488

Bilan DS, Pase L, Joosen L, Gorokhovatsky AY, Ermakova YG, Gadella TW, Grabher C, Schultz C, Lukyanov S, Belousov VV (2013) HyPer-3: a genetically encoded H(2)O(2) probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging. *ACS chemical biology* **8**: 535-542

BioGRID3.4 (2018) <https://thebiogrid.org/124733/summary/homo-sapiens/mcuhtml>, abgerufen am 06042018

Bogeski I, Gulaboski R, Kappl R, Mirceski V, Stefova M, Petreska J, Hoth M (2011) Calcium binding and transport by coenzyme Q. *Journal of the American Chemical Society* **133**: 9293-9303

Bondarenko AI, Jean-Quartier C, Parichatikanond W, Alam MR, Waldeck-Weiermair M, Malli R, Graier WF (2014) Mitochondrial Ca(2+) uniporter (MCU)-dependent and MCU-independent Ca(2+) channels coexist in the inner mitochondrial membrane. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **466**: 1411-1420

Brundage RA, Fogarty KE, Tuft RA, Fay FS (1991) Calcium gradients underlying polarization and chemotaxis of eosinophils. *Science* **254**: 703-706

Brustovetsky T, Brittain MK, Sheets PL, Cummins TR, Pinelis V, Brustovetsky N (2011) KB-R7943, an inhibitor of the reverse Na<sup>+</sup> /Ca<sup>2+</sup> exchanger, blocks N-methyl-D-aspartate receptor and inhibits mitochondrial complex I. *British journal of pharmacology* **162**: 255-270

Buntinas L, Gunter KK, Sparagna GC, Gunter TE (2001) The rapid mode of calcium uptake into heart mitochondria (RaM): comparison to RaM in liver mitochondria. *Biochimica et biophysica acta* **1504**: 248-261

Camello C, Lomax R, Petersen OH, Tepikin AV (2002) Calcium leak from intracellular stores--the enigma of calcium signalling. *Cell calcium* **32**: 355-361

Cancer Genome Atlas N (2015) Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* **161**: 1681-1696

Cao J, Heijkants RC, Jochemsen AG, Dogrusoz M, de Lange MJ, van der Velden PA, van der Burg SH, Jager MJ, Verdijk RM (2017) Targeting of the MAPK and AKT pathways in conjunctival melanoma shows potential synergy. *Oncotarget* **8**: 58021-58036

Carafoli E, Tiozzo R, Lugli G, Crovetti F, Kratzing C (1974) The release of calcium from heart mitochondria by sodium. *Journal of molecular and cellular cardiology* **6**: 361-371

Carretero J, Obrador E, Anasagasti MJ, Martin JJ, Vidal-Vanaclocha F, Estrela JM (1999) Growth-associated changes in glutathione content correlate with liver metastatic activity of B16 melanoma cells. *Clinical & experimental metastasis* **17**: 567-574

CaymanChemical (2014) Produktdatenblatt Trolox, Item No. 10011659. <https://www.caymanchem.com/pdfs/10011659pdf>

Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA, Group B-S (2011) Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *The New England journal of medicine* **364**: 2507-2516

Chaudhuri D, Sancak Y, Mootha VK, Clapham DE (2013) MCU encodes the pore conducting mitochondrial calcium currents. *eLife* **2**: e00704

Chen H, Chan DC (2005) Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Human molecular genetics* **14 Spec No. 2**: R283-289

Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *The Journal of cell biology* **160**: 189-200

Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2007) Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* **130**: 548-562

Chen KG, Valencia JC, Gillet JP, Hearing VJ, Gottesman MM (2009) Involvement of ABC transporters in melanogenesis and the development of multidrug resistance of melanoma. *Pigment cell & melanoma research* **22**: 740-749

Comito G, Calvani M, Giannoni E, Bianchini F, Calorini L, Torre E, Migliore C, Giordano S, Chiarugi P (2011) HIF-1 $\alpha$  stabilization by mitochondrial ROS promotes Met-dependent invasive growth and vasculogenic mimicry in melanoma cells. *Free radical biology & medicine* **51**: 893-904

Corazao-Rozas P, Guerreschi P, Andre F, Gabert PE, Lancel S, Dekioux S, Fontaine D, Tardivel M, Savina A, Quesnel B, Mortier L, Marchetti P, Kluza J (2016) Mitochondrial oxidative phosphorylation controls cancer cell's life and death decisions upon exposure to MAPK inhibitors. *Oncotarget* **7**: 39473-39485

Corazao-Rozas P, Guerreschi P, Jendoubi M, Andre F, Jonneaux A, Scalbert C, Garcon G, Malet-Martino M, Balayssac S, Rocchi S, Savina A, Formstecher P, Mortier L, Kluza J, Marchetti P (2013) Mitochondrial oxidative stress is the Achille's heel of melanoma cells resistant to Braf-mutant inhibitor. *Oncotarget* **4**: 1986-1998

Cort WM, Scott JW, Araujo M, Mergens WJ, Cannalunga MA, Osadca M, Harley H, Parrish DR, Pool WR (1975) Antioxidant activity and stability of 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid. *Journal of the American Oil Chemists' Society* **52**: 174-n/a

Cruz-Munoz W, Jaramillo ML, Man S, Xu P, Banville M, Collins C, Nantel A, Francia G, Morgan SS, Cranmer LD, O'Connor-McCourt MD, Kerbel RS (2012) Roles for endothelin receptor B and BCL2A1 in spontaneous CNS metastasis of melanoma. *Cancer research* **72**: 4909-4919

Csordas G, Golenar T, Seifert EL, Kamer KJ, Sancak Y, Perocchi F, Moffat C, Weaver D, de la Fuente Perez S, Bogorad R, Koteliansky V, Adjianto J, Mootha VK, Hajnoczky G (2013) MICU1 controls both the threshold and cooperative activation of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup>(+) uniporter. *Cell metabolism* **17**: 976-987

Csordas G, Renken C, Varnai P, Walter L, Weaver D, Buttle KF, Balla T, Mannella CA, Hajnoczky G (2006) Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *The Journal of cell biology* **174**: 915-921

Csordas G, Varnai P, Golenar T, Roy S, Purkins G, Schneider TG, Balla T, Hajnoczky G (2010) Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Molecular cell* **39**: 121-132

Curry MC, Peters AA, Kenny PA, Roberts-Thomson SJ, Monteith GR (2013) Mitochondrial calcium uniporter silencing potentiates caspase-independent cell death in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Biochemical and biophysical research communications* **434**: 695-700

Das A, Pushparaj C, Bahi N, Sorolla A, Herreros J, Pamplona R, Vilella R, Matias-Guiu X, Marti RM, Canti C (2012) Functional expression of voltage-gated calcium channels in human melanoma. *Pigment cell & melanoma research* **25**: 200-212

Das A, Pushparaj C, Herreros J, Nager M, Vilella R, Portero M, Pamplona R, Matias-Guiu X, Marti RM, Canti C (2013) T-type calcium channel blockers inhibit autophagy and promote apoptosis of malignant melanoma cells. *Pigment cell & melanoma research* **26**: 874-885

Davies MA (2012) The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. *Cancer journal* **18**: 142-147

Davis HE, Morgan JR, Yarmush ML (2002) Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes. *Biophysical chemistry* **97**: 159-172

de la Fuente S, Matesanz-Isabel J, Fonteriz RI, Montero M, Alvarez J (2014) Dynamics of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake in MICU1-knockdown cells. *The Biochemical journal* **458**: 33-40

De Marchi U, Santo-Domingo J, Castelbou C, Sekler I, Wiederkehr A, Demaurex N (2014) NCLX protein, but not LETM1, mediates mitochondrial Ca<sup>2+</sup> extrusion, thereby limiting Ca<sup>2+</sup>-induced NAD(P)H production and modulating matrix redox state. *The Journal of biological chemistry* **289**: 20377-20385

De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabo I, Rizzuto R (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**: 336-340

De Stefani D, Rizzuto R, Pozzan T (2016) Enjoy the Trip: Calcium in Mitochondria Back and Forth. *Annual review of biochemistry* **85**: 161-192

Deak AT, Blass S, Khan MJ, Groschner LN, Waldeck-Weiermair M, Hallstrom S, Graier WF, Malli R (2014) IP<sub>3</sub>-mediated STIM1 oligomerization requires intact mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake. *Journal of cell science* **127**: 2944-2955

Deeds J, Cronin F, Duncan LM (2000) Patterns of melastatin mRNA expression in melanocytic tumors. *Human pathology* **31**: 1346-1356

Deliot N, Constantin B (2015) Plasma membrane calcium channels in cancer: Alterations and consequences for cell proliferation and migration. *Biochimica et biophysica acta* **1848**: 2512-2522

Deluca HF, Engstrom GW (1961) Calcium uptake by rat kidney mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **47**: 1744-1750

Demunter A, De Wolf-Peeters C, Degreef H, Stas M, van den Oord JJ (2001) Expression of the endothelin-B receptor in pigment cell lesions of the skin. Evidence for its role as tumor progression marker in malignant melanoma. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **438**: 485-491

Denton RM (2009) Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et biophysica acta* **1787**: 1309-1316

Denton RM, McCormack JG (1980) On the role of the calcium transport cycle in heart and other mammalian mitochondria. *FEBS letters* **119**: 1-8

Dimitriou F, Braun RP, Mangana J (2018) Update on adjuvant melanoma therapy. *Current opinion in oncology* **30**: 118-124

Dong Z, Shanmughapriya S, Tomar D, Siddiqui N, Lynch S, Nemani N, Breves SL, Zhang X, Tripathi A, Palaniappan P, Riitano MF, Worth AM, Seelam A, Carvalho E, Subbiah R, Jana F, Soboloff J, Peng Y, Cheung JY, Joseph SK, Caplan J, Rajan S, Stathopoulos PB, Madesh M (2017) Mitochondrial Ca(2+) Uniporter Is a Mitochondrial Luminal Redox Sensor that Augments MCU Channel Activity. *Molecular cell* **65**: 1014-1028 e1017

Doonan PJ, Chandramoorthy HC, Hoffman NE, Zhang X, Cardenas C, Shanmughapriya S, Rajan S, Vallem S, Chen X, Foskett JK, Cheung JY, Houser SR, Madesh M (2014) LETM1-dependent mitochondrial Ca<sup>2+</sup> flux modulates cellular bioenergetics and proliferation. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **28**: 4936-4949

Dore JF, Chignol MC (2012) Tanning salons and skin cancer. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology* **11**: 30-37

Drago I, De Stefani D, Rizzuto R, Pozzan T (2012) Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake contributes to buffering cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> peaks in cardiomyocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 12986-12991

Duncan LM, Deeds J, Cronin FE, Donovan M, Sober AJ, Kauffman M, McCarthy JJ (2001) Melastatin expression and prognosis in cutaneous malignant melanoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **19**: 568-576

Duncan LM, Deeds J, Hunter J, Shao J, Holmgren LM, Woolf EA, Tepper RI, Shyjan AW (1998) Down-regulation of the novel gene melastatin correlates with potential for melanoma metastasis. *Cancer research* **58**: 1515-1520

Eberle J, Weitmann S, Thieck O, Pech H, Paul M, Orfanos CE (1999) Downregulation of endothelin B receptor in human melanoma cell lines parallel to differentiation genes. *The Journal of investigative dermatology* **112**: 925-932

Fang D, Setaluri V (2000) Expression and Up-regulation of alternatively spliced transcripts of melastatin, a melanoma metastasis-related gene, in human melanoma cells. *Biochemical and biophysical research communications* **279**: 53-61

Feissner RF, Skalska J, Gaum WE, Sheu SS (2009) Crosstalk signaling between mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and ROS. *Frontiers in bioscience* **14**: 1197-1218

Feldman B, Fedida-Metula S, Nita J, Sekler I, Fishman D (2010) Coupling of mitochondria to store-operated Ca<sup>2+</sup>-signaling sustains constitutive activation of protein kinase B/Akt and augments survival of malignant melanoma cells. *Cell calcium* **47**: 525-537

Filipp FV, Ratnikov B, De Ingeniis J, Smith JW, Osterman AL, Scott DA (2012) Glutamine-fueled mitochondrial metabolism is decoupled from glycolysis in melanoma. *Pigment cell & melanoma research* **25**: 732-739

Flaherty KT, Robert C, Hersey P, Nathan P, Garbe C, Milhem M, Demidov LV, Hassel JC, Rutkowski P, Mohr P, Dummer R, Trefzer U, Larkin JM, Utikal J, Dreno B, Nyakas M, Middleton MR, Becker JC, Casey M, Sherman LJ, Wu FS, Ouellet D, Martin AM, Patel K, Schadendorf D, Group MS (2012) Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *The New England journal of medicine* **367**: 107-114

Förster T (1946) Energiewanderung und Fluoreszenz. *Die Naturwissenschaften* **33**: 166-175

Frey TG, Mannella CA (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends in biochemical sciences* **25**: 319-324

Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK (2011) ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* **334**: 358-362

Friel DD, Tsien RW (1994) An FCCP-sensitive Ca<sup>2+</sup> store in bullfrog sympathetic neurons and its participation in stimulus-evoked changes in [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **14**: 4007-4024

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Abeni D, Boyle P, Melchi CF (2005a) Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *European journal of cancer* **41**: 28-44

Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS, Pasquini P, Picconi O, Boyle P, Melchi CF (2005b) Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *European journal of cancer* **41**: 45-60

Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, Beroukhi R, Milner DA, Granter SR, Du J, Lee C, Wagner SN, Li C, Golub TR, Rimm DL, Meyerson ML, Fisher DE, Sellers WR (2005) Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature* **436**: 117-122

Giacomello M, Drago I, Bortolozzi M, Scorzeto M, Gianelle A, Pizzo P, Pozzan T (2010) Ca<sup>2+</sup> hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca<sup>2+</sup> mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca<sup>2+</sup> channels. *Molecular cell* **38**: 280-290

Giatromanolaki A, Sivridis E, Kouskoukis C, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis MI (2003) Hypoxia-inducible factors 1 $\alpha$  and 2 $\alpha$  are related to vascular endothelial growth factor expression and a poorer prognosis in nodular malignant melanomas of the skin. *Melanoma research* **13**: 493-501

Gilibert JA, Parekh AB (2000) Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca<sup>2+</sup> current I(CRAC). *The EMBO journal* **19**: 6401-6407

Gillissen A, Nowak D (1998) Characterization of N-acetylcysteine and ambroxol in anti-oxidant therapy. *Respiratory medicine* **92**: 609-623

Giorgi C, Bonora M, Missiroli S, Poletti F, Ramirez FG, Morciano G, Morganti C, Pandolfi PP, Mammano F, Pinton P (2015a) Intravital imaging reveals p53-dependent cancer cell death induced by phototherapy via calcium signaling. *Oncotarget* **6**: 1435-1445

Giorgi C, Bonora M, Sorrentino G, Missiroli S, Poletti F, Suski JM, Galindo Ramirez F, Rizzuto R, Di Virgilio F, Zito E, Pandolfi PP, Wieckowski MR, Mammano F, Del Sal G, Pinton P (2015b) p53 at the endoplasmic reticulum regulates apoptosis in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 1779-1784

Glancy B, Balaban RS (2012) Role of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> in the regulation of cellular energetics. *Biochemistry* **51**: 2959-2973

Glitsch MD, Bakowski D, Parekh AB (2002) Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry depends on mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake. *The EMBO journal* **21**: 6744-6754

Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* **305**: 626-629

Greenawalt JW, Rossi CS, Lehninger AL (1964) Effect of Active Accumulation of Calcium and Phosphate Ions on the Structure of Rat Liver Mitochondria. *The Journal of cell biology* **23**: 21-38

Griffiths EJ, Rutter GA (2009) Mitochondrial calcium as a key regulator of mitochondrial ATP production in mammalian cells. *Biochimica et biophysica acta* **1787**: 1324-1333

Grob JJ, Gouvernet J, Aymar D, Mostaque A, Romano MH, Collet AM, Noe MC, Diconstanzo MP, Bonerandi JJ (1990) Count of benign melanocytic nevi as a major indicator of risk for nonfamilial nodular and superficial spreading melanoma. *Cancer* **66**: 387-395

Gunter TE, Sheu SS (2009) Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport mechanisms. *Biochimica et biophysica acta* **1787**: 1291-1308

Guo H, Carlson JA, Slominski A (2012) Role of TRPM in melanocytes and melanoma. *Experimental dermatology* **21**: 650-654

Hahn K, DeBiasio R, Taylor DL (1992) Patterns of elevated free calcium and calmodulin activation in living cells. *Nature* **359**: 736-738

Hajnoczky G, Robb-Gaspers LD, Seitz MB, Thomas AP (1995) Decoding of cytosolic calcium oscillations in the mitochondria. *Cell* **82**: 415-424

Hall DD, Wu Y, Domann FE, Spitz DR, Anderson ME (2014) Mitochondrial calcium uniporter activity is dispensable for MDA-MB-231 breast carcinoma cell survival. *PloS one* **9**: e96866

Handschin C, Chin S, Li P, Liu F, Maratos-Flier E, Lebrasseur NK, Yan Z, Spiegelman BM (2007) Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. *The Journal of biological chemistry* **282**: 30014-30021

Haq R, Shoag J, Andreu-Perez P, Yokoyama S, Edelman H, Rowe GC, Frederick DT, Hurley AD, Nellore A, Kung AL, Wargo JA, Song JS, Fisher DE, Arany Z, Widlund HR (2013a) Oncogenic BRAF regulates oxidative metabolism via PGC1alpha and MITF. *Cancer cell* **23**: 302-315

Haq R, Yokoyama S, Hawryluk EB, Jonsson GB, Frederick DT, McHenry K, Porter D, Tran TN, Love KT, Langer R, Anderson DG, Garraway LA, Duncan LM, Morton DL, Hoon DS, Wargo JA, Song JS, Fisher DE (2013b) BCL2A1 is a lineage-specific antiapoptotic melanoma oncogene that confers resistance to BRAF inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 4321-4326

Harner M, Korner C, Walther D, Mokranjac D, Kaesmacher J, Welsch U, Griffith J, Mann M, Reggiori F, Neupert W (2011) The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *The EMBO journal* **30**: 4356-4370

Harrington JL, Murphy E (2015) The mitochondrial calcium uniporter: mice can live and die without it. *Journal of molecular and cellular cardiology* **78**: 46-53

Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M, Rutkowski P, Blank CU, Miller WH, Jr., Kaempgen E, Martin-Algarra S, Karaszewska B, Mauch C, Chiarion-Sileni V, Martin AM, Swann S, Haney P, Mirakhur B, Guckert ME, Goodman V, Chapman PB (2012) Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet* **380**: 358-365

Hedgepeth SC, Garcia MI, Wagner LE, 2nd, Rodriguez AM, Chintapalli SV, Snyder RR, Hankins GD, Henderson BR, Brodie KM, Yule DI, van Rossum DB, Boehning D (2015) The BRCA1 tumor suppressor binds to inositol 1,4,5-trisphosphate receptors to stimulate apoptotic calcium release. *The Journal of biological chemistry* **290**: 7304-7313

Herrington J, Park YB, Babcock DF, Hille B (1996) Dominant role of mitochondria in clearance of large Ca<sup>2+</sup> loads from rat adrenal chromaffin cells. *Neuron* **16**: 219-228

Hirai H, Sootome H, Nakatsuru Y, Miyama K, Taguchi S, Tsujioka K, Ueno Y, Hatch H, Majumder PK, Pan BS, Kotani H (2010) MK-2206, an allosteric Akt inhibitor, enhances antitumor efficacy by standard chemotherapeutic agents or molecular targeted drugs in vitro and in vivo. *Molecular cancer therapeutics* **9**: 1956-1967

Holly EA, Kelly JW, Shpall SN, Chiu SH (1987) Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *Journal of the American Academy of Dermatology* **17**: 459-468

Holmstrom KM, Pan X, Liu JC, Menazza S, Liu J, Nguyen TT, Pan H, Parks RJ, Anderson S, Noguchi A, Springer D, Murphy E, Finkel T (2015) Assessment of cardiac function in mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Journal of molecular and cellular cardiology* **85**: 178-182

Hong Z, Chen KH, DasGupta A, Potus F, Dunham-Snary K, Bonnet S, Tian L, Fu J, Breuils-Bonnet S, Provencher S, Wu D, Mewburn J, Ormiston ML, Archer SL (2017) MicroRNA-138 and MicroRNA-25 Down-regulate Mitochondrial Calcium Uniporter, Causing the Pulmonary Arterial Hypertension Cancer Phenotype. *American journal of respiratory and critical care medicine* **195**: 515-529

Hooper R, Zhang X, Webster M, Go C, Kedra J, Marchbank K, Gill DL, Weeraratna AT, Trebak M, Soboloff J (2015) Novel Protein Kinase C-Mediated Control of Orai1 Function in Invasive Melanoma. *Molecular and cellular biology* **35**: 2790-2798

Hoppins S, Collins SR, Cassidy-Stone A, Hummel E, Devay RM, Lackner LL, Westermann B, Schuldiner M, Weissman JS, Nunnari J (2011) A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *The Journal of cell biology* **195**: 323-340

Hoth M (2016) CRAC channels, calcium, and cancer in light of the driver and passenger concept. *Biochimica et biophysica acta* **1863**: 1408-1417

Hoth M, Button DC, Lewis RS (2000) Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 10607-10612

Hoth M, Fanger CM, Lewis RS (1997) Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *The Journal of cell biology* **137**: 633-648

Hou T, Zhang X, Xu J, Jian C, Huang Z, Ye T, Hu K, Zheng M, Gao F, Wang X, Cheng H (2013) Synergistic triggering of superoxide flashes by mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniport and basal reactive oxygen species elevation. *The Journal of biological chemistry* **288**: 4602-4612

Huang H, Shah K, Bradbury NA, Li C, White C (2014) Mcl-1 promotes lung cancer cell migration by directly interacting with VDAC to increase mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake and reactive oxygen species generation. *Cell death & disease* **5**: e1482

HumanProteinAtlas (2017) <https://www.proteinatlas.org/>

Imokawa G, Yada Y, Kimura M (1996) Signalling mechanisms of endothelin-induced mitogenesis and melanogenesis in human melanocytes. *The Biochemical journal* **314 ( Pt 1)**: 305-312

Imokawa G, Yada Y, Miyagishi M (1992) Endothelins secreted from human keratinocytes are intrinsic mitogens for human melanocytes. *The Journal of biological chemistry* **267**: 24675-24680

Iwamoto T, Watano T, Shigekawa M (1996) A novel isothioureia derivative selectively inhibits the reverse mode of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange in cells expressing NCX1. *The Journal of biological chemistry* **271**: 22391-22397

Jager S, Handschin C, St-Pierre J, Spiegelman BM (2007) AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1alpha. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 12017-12022

Jakob R, Beutner G, Sharma VK, Duan Y, Gross RA, Hurst S, Jhun BS, J OU, Sheu SS (2014) Molecular and functional identification of a mitochondrial ryanodine receptor in neurons. *Neuroscience letters* **575**: 7-12

Jiang D, Zhao L, Clapham DE (2009) Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Science* **326**: 144-147

Johannessen CM, Boehm JS, Kim SY, Thomas SR, Wardwell L, Johnson LA, Emery CM, Stransky N, Cogdill AP, Barretina J, Caponigro G, Hieronymus H, Murray RR, Salehi-Ashtiani K, Hill DE, Vidal M, Zhao JJ, Yang X, Alkan O, Kim S, Harris JL, Wilson CJ, Myer VE, Finan PM, Root DE, Roberts TM, Golub T, Flaherty KT, Dummer R, Weber BL, Sellers WR, Schlegel R, Wargo JA, Hahn WC, Garraway LA (2010) COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* **468**: 968-972

Kamer KJ, Grabarek Z, Mootha VK (2017) High-affinity cooperative Ca<sup>2+</sup> binding by MICU1-MICU2 serves as an on-off switch for the uniporter. *EMBO reports* **18**: 1397-1411

Kamer KJ, Mootha VK (2014) MICU1 and MICU2 play nonredundant roles in the regulation of the mitochondrial calcium uniporter. *EMBO reports* **15**: 299-307

Kanavy HE, Gerstenblith MR (2011) Ultraviolet radiation and melanoma. *Seminars in cutaneous medicine and surgery* **30**: 222-228

Kang HY, Kang WH, Lee C (1998) Endothelin-B receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling in human melanocytes. *Pflugers Archiv : European journal of physiology* **435**: 350-356

Kang YJ (1995) Buthionine sulfoximine enhances glutathione-but attenuates glutamate-stimulated cell proliferation. *Cellular & molecular biology research* **41**: 131-136

Kikuchi K, Nakagawa H, Kadono T, Etoh T, Byers HR, Mihm MC, Tamaki K (1996) Decreased ET(B) receptor expression in human metastatic melanoma cells. *Biochemical and biophysical research communications* **219**: 734-739

Kirichok Y, Krapivinsky G, Clapham DE (2004) The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* **427**: 360-364

Kluza J, Corazao-Rozas P, Touil Y, Jendoubi M, Maire C, Guerreschi P, Jonneaux A, Ballot C, Balayssac S, Valable S, Corroyer-Dulmont A, Bernaudin M, Malet-Martino M, de Lassalle EM, Maboudou P, Formstecher P, Polakowska R, Mortier L, Marchetti P (2012) Inactivation of the HIF-1alpha/PDK3 signaling axis drives melanoma toward mitochondrial oxidative metabolism and potentiates the therapeutic activity of pro-oxidants. *Cancer research* **72**: 5035-5047

Kraft R (2007) The Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange inhibitor KB-R7943 potently blocks TRPC channels. *Biochemical and biophysical research communications* **361**: 230-236

Kudin AP, Bimpong-Buta NY, Vielhaber S, Elger CE, Kunz WS (2004) Characterization of superoxide-producing sites in isolated brain mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **279**: 4127-4135

Kudin AP, Debska-Vielhaber G, Kunz WS (2005) Characterization of superoxide production sites in isolated rat brain and skeletal muscle mitochondria. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* **59**: 163-168

Kulichova D, Danova J, Kunte C, Ruzicka T, Celko AM (2014) Risk factors for malignant melanoma and preventive methods. *Cutis* **94**: 241-248

Labrousse AM, Zappaterra MD, Rube DA, van der Bliek AM (1999) C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Molecular cell* **4**: 815-826

Lackner LL, Nunnari JM (2009) The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division. *Biochimica et biophysica acta* **1792**: 1138-1144

Lam SS, Martell JD, Kamer KJ, Deerinck TJ, Ellisman MH, Mootha VK, Ting AY (2015) Directed evolution of APEX2 for electron microscopy and proximity labeling. *Nature methods* **12**: 51-54

Le Gal K, Ibrahim MX, Wiel C, Sayin VI, Akula MK, Karlsson C, Dalin MG, Akyurek LM, Lindahl P, Nilsson J, Bergo MO (2015) Antioxidants can increase melanoma metastasis in mice. *Science translational medicine* **7**: 308re308

Lee Y, Min CK, Kim TG, Song HK, Lim Y, Kim D, Shin K, Kang M, Kang JY, Youn HS, Lee JG, An JY, Park KR, Lim JJ, Kim JH, Kim JH, Park ZY, Kim YS, Wang J, Kim DH, Eom SH (2015) Structure and function of the N-terminal domain of the human mitochondrial calcium uniporter. *EMBO reports* **16**: 1318-1333

Levy C, Khaled M, Fisher DE (2006) MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends in molecular medicine* **12**: 406-414

Lewis-Smith D, Kamer KJ, Griffin H, Childs AM, Pysden K, Titov D, Duff J, Pyle A, Taylor RW, Yu-Wai-Man P, Ramesh V, Horvath R, Mootha VK, Chinnery PF (2016) Homozygous deletion in MICU1 presenting with fatigue and lethargy in childhood. *Neurology Genetics* **2**: e59

Li YN, Xi MM, Guo Y, Hai CX, Yang WL, Qin XJ (2014) NADPH oxidase-mitochondria axis-derived ROS mediate arsenite-induced HIF-1 $\alpha$  stabilization by inhibiting prolyl hydroxylases activity. *Toxicology letters* **224**: 165-174

Liao Y, Hao Y, Chen H, He Q, Yuan Z, Cheng J (2015) Mitochondrial calcium uniporter protein MCU is involved in oxidative stress-induced cell death. *Protein & cell* **6**: 434-442

Lin J, Wu H, Tarr PT, Zhang CY, Wu Z, Boss O, Michael LF, Puigserver P, Isotani E, Olson EN, Lowell BB, Bassel-Duby R, Spiegelman BM (2002) Transcriptional co-activator PGC-1  $\alpha$  drives the formation of slow-twitch muscle fibres. *Nature* **418**: 797-801

Liu JC, Liu J, Holmstrom KM, Menazza S, Parks RJ, Fergusson MM, Yu ZX, Springer DA, Halsey C, Liu C, Murphy E, Finkel T (2016) MICU1 Serves as a Molecular Gatekeeper to Prevent In Vivo Mitochondrial Calcium Overload. *Cell reports* **16**: 1561-1573

Logan CV, Szabadkai G, Sharpe JA, Parry DA, Torelli S, Childs AM, Kriek M, Phadke R, Johnson CA, Roberts NY, Bonthron DT, Pysden KA, Whyte T, Munteanu I, Foley AR, Wheway G, Szymanska K, Natarajan S, Abdelhamed ZA, Morgan JE, Roper H, Santen GW, Niks EH, van der Pol WL, Lindhout D, Raffaello A, De Stefani D, den Dunnen JT, Sun Y, Ginjaar I, Sewry CA, Hurles M, Rizzuto R, Consortium UK, Duchen MR, Muntoni F, Sheridan E (2014) Loss-of-function mutations in MICU1 cause a brain and muscle disorder linked to primary alterations in mitochondrial calcium signaling. *Nature genetics* **46**: 188-193

Macia A, Herreros J, Marti RM, Canti C (2015) Calcium channel expression and applicability as targeted therapies in melanoma. *BioMed research international* **2015**: 587135

Malli R, Frieden M, Trenker M, Graier WF (2005) The role of mitochondria for Ca<sup>2+</sup> refilling of the endoplasmic reticulum. *The Journal of biological chemistry* **280**: 12114-12122

Mallilankaraman K, Cardenas C, Doonan PJ, Chandramoorthy HC, Irrinki KM, Golenar T, Csordas G, Madireddi P, Yang J, Muller M, Miller R, Kolesar JE, Molgo J, Kaufman B, Hajnoczky G, Foskett JK, Madesh M (2012a) MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake that regulates cellular metabolism. *Nature cell biology* **14**: 1336-1343

Mallilankaraman K, Doonan P, Cardenas C, Chandramoorthy HC, Muller M, Miller R, Hoffman NE, Gandhirajan RK, Molgo J, Birnbaum MJ, Rothberg BS, Mak DO, Foskett JK, Madesh M (2012b) MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake that regulates cell survival. *Cell* **151**: 630-644

Mammucari C, Raffaello A, Vecellio Reane D, Gherardi G, De Mario A, Rizzuto R (2018) Mitochondrial calcium uptake in organ physiology: from molecular mechanism to animal models. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*

Marchi S, Lupini L, Patergnani S, Rimessi A, Missiroli S, Bonora M, Bononi A, Corra F, Giorgi C, De Marchi E, Poletti F, Gafa R, Lanza G, Negrini M, Rizzuto R, Pinton P (2013) Downregulation of the mitochondrial calcium uniporter by cancer-related miR-25. *Current biology : CB* **23**: 58-63

Marchi S, Pinton P (2014) The mitochondrial calcium uniporter complex: molecular components, structure and physiopathological implications. *The Journal of physiology* **592**: 829-839

Marchi S, Pinton P (2016) Alterations of calcium homeostasis in cancer cells. *Current opinion in pharmacology* **29**: 1-6

Markus NM, Hasel P, Qiu J, Bell KF, Heron S, Kind PC, Dando O, Simpson TI, Hardingham GE (2016) Expression of mRNA Encoding Mcu and Other Mitochondrial Calcium Regulatory Genes Depends on Cell Type, Neuronal Subtype, and Ca<sup>2+</sup> Signaling. *PloS one* **11**: e0148164

Martell JD, Deerinck TJ, Sancak Y, Poulos TL, Mootha VK, Sosinsky GE, Ellisman MH, Ting AY (2012) Engineered ascorbate peroxidase as a genetically encoded reporter for electron microscopy. *Nature biotechnology* **30**: 1143-1148

Martinus RD, Garth GP, Webster TL, Cartwright P, Naylor DJ, Hoj PB, Hoogenraad NJ (1996) Selective induction of mitochondrial chaperones in response to loss of the mitochondrial genome. *European journal of biochemistry* **240**: 98-103

Masterarbeit KZ (2013) Die Funktion der Mitochondrien in Krebszellen.

Matesanz-Isabel J, Arias-del-Val J, Alvarez-Illera P, Fonteriz RI, Montero M, Alvarez J (2016) Functional roles of MICU1 and MICU2 in mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake. *Biochimica et biophysica acta* **1858**: 1110-1117

Matlib MA, Zhou Z, Knight S, Ahmed S, Choi KM, Krause-Bauer J, Phillips R, Altschuld R, Katsube Y, Sperelakis N, Bers DM (1998) Oxygen-bridged dinuclear ruthenium amine complex specifically inhibits Ca<sup>2+</sup> uptake into mitochondria in vitro and in situ in single cardiac myocytes. *The Journal of biological chemistry* **273**: 10223-10231

MD\_Anderson\_RPPA\_Core\_Facility. (2017) <https://www.mdanderson.org/research/research-resources/core-facilities/functional-proteomics-rppa-core.html>, information downloaded on Dec 21st 2017.

Meeusen S, McCaffery JM, Nunnari J (2004) Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* **305**: 1747-1752

Meierjohann S (2014) Oxidative stress in melanocyte senescence and melanoma transformation. *European journal of cell biology* **93**: 36-41

Memmott RM, Dennis PA (2009) Akt-dependent and -independent mechanisms of mTOR regulation in cancer. *Cellular signalling* **21**: 656-664

Miller AJ, Du J, Rowan S, Hershey CL, Widlund HR, Fisher DE (2004) Transcriptional regulation of the melanoma prognostic marker melastatin (TRPM1) by MITF in melanocytes and melanoma. *Cancer research* **64**: 509-516

Miyawaki A, Griesbeck O, Heim R, Tsien RY (1999) Dynamic and quantitative Ca<sup>2+</sup> measurements using improved cameleons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 2135-2140

Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY (1997) Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin. *Nature* **388**: 882-887

Miyawaki A, Nagai T, Mizuno H (2013) Imaging intracellular free Ca<sup>2+</sup> concentration using yellow cameleons. *Cold Spring Harbor protocols* **2013**

Mizuno H, Sawano A, Eli P, Hama H, Miyawaki A (2001) Red fluorescent protein from *Discosoma* as a fusion tag and a partner for fluorescence resonance energy transfer. *Biochemistry* **40**: 2502-2510

Mohr FC, Fewtrell C (1990) The effect of mitochondrial inhibitors on calcium homeostasis in tumor mast cells. *The American journal of physiology* **258**: C217-226

Montagut C, Sharma SV, Shioda T, McDermott U, Ulman M, Ulkus LE, Dias-Santagata D, Stubbs H, Lee DY, Singh A, Drew L, Haber DA, Settleman J (2008) Elevated CRAF as a potential mechanism of acquired resistance to BRAF inhibition in melanoma. *Cancer research* **68**: 4853-4861

Mukaida N, Sasaki S (2016) Fibroblasts, an inconspicuous but essential player in colon cancer development and progression. *World journal of gastroenterology* **22**: 5301-5316

Murphy E, Pan X, Nguyen T, Liu J, Holmstrom KM, Finkel T (2014) Unresolved questions from the analysis of mice lacking MCU expression. *Biochemical and biophysical research communications* **449**: 384-385

Nagai T, Sawano A, Park ES, Miyawaki A (2001) Circularly permuted green fluorescent proteins engineered to sense Ca<sup>2+</sup>. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 3197-3202

Nagai T, Yamada S, Tominaga T, Ichikawa M, Miyawaki A (2004) Expanded dynamic range of fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> by circularly permuted yellow fluorescent proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 10554-10559

Nazarian R, Shi H, Wang Q, Kong X, Koya RC, Lee H, Chen Z, Lee MK, Attar N, Sazegar H, Chodon T, Nelson SF, McArthur G, Sosman JA, Ribas A, Lo RS (2010) Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation. *Nature* **468**: 973-977

Naziroglu M (2011) TRPM2 cation channels, oxidative stress and neurological diseases: where are we now? *Neurochemical research* **36**: 355-366

Nowikovsky K, Froschauer EM, Zsurka G, Samaj J, Reipert S, Kolisek M, Wiesenberger G, Schweyen RJ (2004) The LETM1/YOL027 gene family encodes a factor of the mitochondrial K<sup>+</sup> homeostasis with a potential role in the Wolf-Hirschhorn syndrome. *The Journal of biological chemistry* **279**: 30307-30315

Orfanelli U, Wenke AK, Doglioni C, Russo V, Bosserhoff AK, Lavorgna G (2008) Identification of novel sense and antisense transcription at the TRPM2 locus in cancer. *Cell research* **18**: 1128-1140

Ouardouz M, Zamponi GW, Barr W, Kiedrowski L, Stys PK (2005) Protection of ischemic rat spinal cord white matter: Dual action of KB-R7943 on Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange and L-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuropharmacology* **48**: 566-575

OW Griffith AM (1979) Potent and specific inhibition of glutathione synthesis by buthionine sulfoximine (S-n-butyl homocysteine sulfoximine). *The Journal of biological chemistry* **254**: 7558-7560

Oxenoid K, Dong Y, Cao C, Cui T, Sancak Y, Markhard AL, Grabarek Z, Kong L, Liu Z, Ouyang B, Cong Y, Mootha VK, Chou JJ (2016) Architecture of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **533**: 269-273

Paillard M, Csordas G, Szanda G, Golenar T, Debattisti V, Bartok A, Wang N, Moffat C, Seifert EL, Spat A, Hajnoczky G (2017) Tissue-Specific Mitochondrial Decoding of Cytoplasmic Ca<sup>2+</sup> Signals Is Controlled by the Stoichiometry of MICU1/2 and MCU. *Cell reports* **18**: 2291-2300

Palmer AE, Giacomello M, Kortemme T, Hires SA, Lev-Ram V, Baker D, Tsien RY (2006) Ca<sup>2+</sup> indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chemistry & biology* **13**: 521-530

Palmer AE, Jin C, Reed JC, Tsien RY (2004) Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 17404-17409

Palmer AE, Tsien RY (2006) Measuring calcium signaling using genetically targetable fluorescent indicators. *Nature protocols* **1**: 1057-1065

Palty R, Silverman WF, Hershinkel M, Caporale T, Sensi SL, Parnis J, Nolte C, Fishman D, Shoshan-Barmatz V, Herrmann S, Khananashvili D, Sekler I (2010) NCLX is an essential component of mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 436-441

Pan X, Liu J, Nguyen T, Liu C, Sun J, Teng Y, Fergusson MM, Rovira, II, Allen M, Springer DA, Aponte AM, Gucek M, Balaban RS, Murphy E, Finkel T (2013) The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nature cell biology* **15**: 1464-1472

Park YB, Herrington J, Babcock DF, Hille B (1996) Ca<sup>2+</sup> clearance mechanisms in isolated rat adrenal chromaffin cells. *The Journal of physiology* **492 ( Pt 2)**: 329-346

Parsons PG, Musk P, Goss PD, Leah J (1983) Effects of calcium depletion on human cells in vitro and the anomalous behavior of the human melanoma cell line MM170. *Cancer research* **43**: 2081-2087

Pasquali S, Hadjinicolaou AV, Chiarion Sileni V, Rossi CR, Mocellin S (2018) Systemic treatments for metastatic cutaneous melanoma. *The Cochrane database of systematic reviews* **2**: CD011123

Patron M, Checchetto V, Raffaello A, Teardo E, Vecellio Reane D, Mantoan M, Granatiero V, Szabo I, De Stefani D, Rizzuto R (2014) MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter by exerting opposite effects on MCU activity. *Molecular cell* **53**: 726-737

Paupé V, Prudent J, Dassa EP, Rendon OZ, Shoubridge EA (2015) CCDC90A (MCUR1) is a cytochrome c oxidase assembly factor and not a regulator of the mitochondrial calcium uniporter. *Cell metabolism* **21**: 109-116

Pawelczak CP, Charboneau L, Bichsel VE, Simone NL, Chen T, Gillespie JW, Emmert-Buck MR, Roth MJ, Petricoin III EF, Liotta LA (2001) Reverse phase protein microarrays which capture disease progression show activation of pro-survival pathways at the cancer invasion front. *Oncogene* **20**: 1981

Payne R, Hoff H, Roskowski A, Foskett JK (2017) MICU2 Restricts Spatial Crosstalk between InsP3R and MCU Channels by Regulating Threshold and Gain of MICU1-Mediated Inhibition and Activation of MCU. *Cell reports* **21**: 3141-3154

PDQ\_Cancer\_Information\_Summaries (2018) Melanoma Treatment (PDQ(R)): Health Professional Version. Bethesda (MD)

Perna D, Karreth FA, Rust AG, Perez-Mancera PA, Rashid M, Iorio F, Alifrangis C, Arends MJ, Bosenberg MW, Bollag G, Tuveson DA, Adams DJ (2015) BRAF inhibitor resistance mediated by the AKT pathway in an oncogenic BRAF mouse melanoma model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: E536-545

Perocchi F, Gohil VM, Girgis HS, Bao XR, McCombs JE, Palmer AE, Mootha VK (2010) MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca(2+) uptake. *Nature* **467**: 291-296

Petrungaro C, Zimmermann KM, Kuttner V, Fischer M, Dengjel J, Bogeski I, Riemer J (2015) The Ca(2+)-Dependent Release of the Mia40-Induced MICU1-MICU2 Dimer from MCU Regulates Mitochondrial Ca(2+) Uptake. *Cell metabolism* **22**: 721-733

Pettit EJ, Fay FS (1998) Cytosolic free calcium and the cytoskeleton in the control of leukocyte chemotaxis. *Physiological reviews* **78**: 949-967

Pinto MC, Kihara AH, Goulart VA, Tonelli FM, Gomes KN, Ulrich H, Resende RR (2015) Calcium signaling and cell proliferation. *Cellular signalling* **27**: 2139-2149

Pinton P, Ferrari D, Magalhaes P, Schulze-Osthoff K, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R (2000) Reduced loading of intracellular Ca(2+) stores and downregulation of capacitative Ca(2+) influx in Bcl-2-overexpressing cells. *The Journal of cell biology* **148**: 857-862

Piskounova E, Agathocleous M, Murphy MM, Hu Z, Huddleston SE, Zhao Z, Leitch AM, Johnson TM, DeBerardinis RJ, Morrison SJ (2015) Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature* **527**: 186-191

Plovanich M, Bogorad RL, Sancak Y, Kamer KJ, Strittmatter L, Li AA, Girgis HS, Kuchimanchi S, De Groot J, Speciner L, Taneja N, Oshea J, Koteliansky V, Mootha VK (2013a) MICU2, a Paralog of MICU1, Resides within the Mitochondrial Uniporter Complex to Regulate Calcium Handling. *PLoS one* **8**

Plovanich M, Bogorad RL, Sancak Y, Kamer KJ, Strittmatter L, Li AA, Girgis HS, Kuchimanchi S, De Groot J, Speciner L, Taneja N, Oshea J, Koteliansky V, Mootha VK (2013b) MICU2, a paralog of MICU1, resides within the mitochondrial uniporter complex to regulate calcium handling. *PLoS one* **8**: e55785

Poburko D, Liao CH, van Breemen C, Demaurex N (2009) Mitochondrial regulation of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> content in vascular smooth muscle cells. *Circulation research* **104**: 104-112

Poot M, Teubert H, Rabinovitch PS, Kavanagh TJ (1995) De novo synthesis of glutathione is required for both entry into and progression through the cell cycle. *Journal of cellular physiology* **163**: 555-560

Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y (2011) Calcium in tumour metastasis: new roles for known actors. *Nature reviews Cancer* **11**: 609-618

PubChem (2018) Eintrag zu L-Buthionine sulfoximine. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-Buthionine-sulfoximine#section=Top>

Puigserver P, Spiegelman BM (2003) Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine reviews* **24**: 78-90

Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM (1998) A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* **92**: 829-839

Qiu J, Tan YW, Hagenston AM, Martel MA, Kneisel N, Skehel PA, Wyllie DJ, Bading H, Hardingham GE (2013) Mitochondrial calcium uniporter Mcu controls excitotoxicity and is transcriptionally repressed by neuroprotective nuclear calcium signals. *Nature communications* **4**: 2034

Quast SA, Berger A, Eberle J (2013) ROS-dependent phosphorylation of Bax by wortmannin sensitizes melanoma cells for TRAIL-induced apoptosis. *Cell death & disease* **4**: e839

Quintana A, Pasche M, Junker C, Al-Ansary D, Rieger H, Kummerow C, Nunez L, Villalobos C, Meraner P, Becherer U, Rettig J, Niemeyer BA, Hoth M (2011) Calcium microdomains at the immunological synapse: how ORAI channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation. *The EMBO journal* **30**: 3895-3912

Quintana A, Schwarz EC, Schwindling C, Lipp P, Kaestner L, Hoth M (2006) Sustained activity of calcium release-activated calcium channels requires translocation of mitochondria to the plasma membrane. *The Journal of biological chemistry* **281**: 40302-40309

Raffaello A, De Stefani D, Sabbadin D, Teardo E, Merli G, Picard A, Checchetto V, Moro S, Szabo I, Rizzuto R (2013) The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative pore-forming subunit. *The EMBO journal* **32**: 2362-2376

Rambold AS, Kostecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J (2011) Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 10190-10195

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

Rebecca VW, Massaro RR, Fedorenko IV, Sondak VK, Anderson AR, Kim E, Amaravadi RK, Maria-Engler SS, Messina JL, Gibney GT, Kudchadkar RR, Smalley KS (2014) Inhibition of autophagy enhances the effects of the AKT inhibitor MK-2206 when combined with paclitaxel and carboplatin in BRAF wild-type melanoma. *Pigment cell & melanoma research* **27**: 465-478

Reichert AS, Neupert W (2002) Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. *Biochimica et biophysica acta* **1592**: 41-49

Rhee J, Inoue Y, Yoon JC, Puigserver P, Fan M, Gonzalez FJ, Spiegelman BM (2003) Regulation of hepatic fasting response by PPARgamma coactivator-1alpha (PGC-1): requirement for hepatocyte nuclear factor 4alpha in gluconeogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 4012-4017

Ribatti D (2017) A revisited concept: Contact inhibition of growth. From cell biology to malignancy. *Experimental cell research* **359**: 17-19

Rimessi A, Marchi S, Fotino C, Romagnoli A, Huebner K, Croce CM, Pinton P, Rizzuto R (2009) Intramitochondrial calcium regulation by the FHIT gene product sensitizes to apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 12753-12758

Rizzuto R, Bastianutto C, Brini M, Murgia M, Pozzan T (1994) Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> homeostasis in intact cells. *The Journal of cell biology* **126**: 1183-1194

Rizzuto R, Brini M, Murgia M, Pozzan T (1993) Microdomains with high Ca<sup>2+</sup> close to IP<sub>3</sub>-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science* **262**: 744-747

Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> responses. *Science* **280**: 1763-1766

Rizzuto R, Pozzan T (2006) Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiological reviews* **86**: 369-408

Rodriguez-Garcia A, Rojo-Ruiz J, Navas-Navarro P, Aulestia FJ, Gallego-Sandin S, Garcia-Sancho J, Alonso MT (2014) GAP, an aequorin-based fluorescent indicator for imaging Ca<sup>2+</sup> in organelles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 2584-2589

Roesch A, Fukunaga-Kalabis M, Schmidt EC, Zabierowski SE, Brafford PA, Vultur A, Basu D, Gimotty P, Vogt T, Herlyn M (2010) A temporarily distinct subpopulation of slow-cycling melanoma cells is required for continuous tumor growth. *Cell* **141**: 583-594

Roesch A, Vultur A, Bogeski I, Wang H, Zimmermann KM, Speicher D, Korbel C, Laschke MW, Gimotty PA, Philipp SE, Krause E, Patzold S, Villanueva J, Krepler C, Fukunaga-Kalabis M, Hoth M, Bastian BC, Vogt T, Herlyn M (2013) Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells. *Cancer cell* **23**: 811-825

Rolland SG, Motori E, Memar N, Hench J, Frank S, Winklhofer KF, Conradt B (2013) Impaired complex IV activity in response to loss of LRPPRC function can be compensated by mitochondrial hyperfusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: E2967-2976

Ryu SY, Beutner G, Dirksen RT, Kinnally KW, Sheu SS (2010) Mitochondrial ryanodine receptors and other mitochondrial Ca<sup>2+</sup> permeable channels. *FEBS letters* **584**: 1948-1955

Salem AF, Whitaker-Menezes D, Howell A, Sotgia F, Lisanti MP (2012) Mitochondrial biogenesis in epithelial cancer cells promotes breast cancer tumor growth and confers autophagy resistance. *Cell cycle* **11**: 4174-4180

Samanta K, Mirams GR, Parekh AB (2018) Sequential forward and reverse transport of the Na<sup>(+)</sup> Ca<sup>(2+)</sup> exchanger generates Ca<sup>(2+)</sup> oscillations within mitochondria. *Nature communications* **9**: 156

Sancak Y, Markhard AL, Kitami T, Kovacs-Bogdan E, Kamer KJ, Udeshi ND, Carr SA, Chaudhuri D, Clapham DE, Li AA, Calvo SE, Goldberger O, Mootha VK (2013) EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Science* **342**: 1379-1382

Santo-Domingo J, Vay L, Hernandez-Sanmiguel E, Lobaton CD, Moreno A, Montero M, Alvarez J (2007) The plasma membrane Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange inhibitor KB-R7943 is also a potent inhibitor of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter. *British journal of pharmacology* **151**: 647-654

Scarpulla RC (2011) Metabolic control of mitochondrial biogenesis through the PGC-1 family regulatory network. *Biochimica et biophysica acta* **1813**: 1269-1278

Schwindling C, Quintana A, Krause E, Hoth M (2010) Mitochondria positioning controls local calcium influx in T cells. *Journal of immunology* **184**: 184-190

Scorrano L, Penzo D, Petronilli V, Pagano F, Bernardi P (2001) Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition. Implications for tumor necrosis factor- $\alpha$  apoptotic signaling. *The Journal of biological chemistry* **276**: 12035-12040

Scott DA, Richardson AD, Filipp FV, Knutzen CA, Chiang GG, Ronai ZA, Osterman AL, Smith JW (2011) Comparative metabolic flux profiling of melanoma cell lines: beyond the Warburg effect. *The Journal of biological chemistry* **286**: 42626-42634

Sennoune SR, Santos JM, Hussain F, Martinez-Zaguilan R (2015) Sodium calcium exchanger operates in the reverse mode in metastatic human melanoma cells. *Cellular and molecular biology* **61**: 40-49

Shao J, Fu Z, Ji Y, Guan X, Guo S, Ding Z, Yang X, Cong Y, Shen Y (2016) Leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 (LETM1) forms a Ca(2+)/H(+) antiporter. *Scientific reports* **6**: 34174

Sharif GM, Wellstein A (2015) Cell density regulates cancer metastasis via the Hippo pathway. *Future oncology* **11**: 3253-3260

SigmaAldrich (2017) Produktbeschreibung N-Acetyl-L-cysteine.  
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/a9165?lang=de&region=DE>

Slater EC, Cleland KW (1953) The calcium content of isolated heart-muscle sarcosomes. *The Biochemical journal* **54**: xxii

Smithen M, Elustondo PA, Winkfein R, Zakharian E, Abramov AY, Pavlov E (2013) Role of polyhydroxybutyrate in mitochondrial calcium uptake. *Cell calcium* **54**: 86-94

Sparagna GC, Gunter KK, Sheu SS, Gunter TE (1995) Mitochondrial calcium uptake from physiological-type pulses of calcium. A description of the rapid uptake mode. *The Journal of biological chemistry* **270**: 27510-27515

St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *The Journal of biological chemistry* **277**: 44784-44790

Stanisz H, Saul S, Muller CS, Kappl R, Niemeyer BA, Vogt T, Hoth M, Roesch A, Bogeski I (2014) Inverse regulation of melanoma growth and migration by Orai1/STIM2-dependent calcium entry. *Pigment cell & melanoma research* **27**: 442-453

Stanisz H, Stark A, Kilch T, Schwarz EC, Muller CS, Peinelt C, Hoth M, Niemeyer BA, Vogt T, Bogeski I (2012) ORAI1 Ca(2+) channels control endothelin-1-induced mitogenesis and melanogenesis in primary human melanocytes. *The Journal of investigative dermatology* **132**: 1443-1451

Stanisz H, Vultur A, Herlyn M, Roesch A, Bogeski I (2016) The role of Orai-STIM calcium channels in melanocytes and melanoma. *The Journal of physiology* **594**: 2825-2835

Starkov AA, Fiskum G, Chinopoulos C, Lorenzo BJ, Browne SE, Patel MS, Beal MF (2004) Mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex generates reactive oxygen species. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**: 7779-7788

Sun J, Lu F, He H, Shen J, Messina J, Mathew R, Wang D, Sarnaik AA, Chang WC, Kim M, Cheng H, Yang S (2014) STIM1- and Orai1-mediated Ca(2+) oscillation orchestrates invadopodium formation and melanoma invasion. *The Journal of cell biology* **207**: 535-548

Suzuki J, Kanemaru K, Iino M (2016) Genetically Encoded Fluorescent Indicators for Organellar Calcium Imaging. *Biophysical journal* **111**: 1119-1131

Syed Arshad Hussain DD, Sekhar Chakraborty, Jaba Saha, Arpan Datta Roy, Santanu Chakraborty, Pintu Debnath, D Bhattacharjee (2015) Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) sensor. *Sci Lett J* **4**

Szabadkai G, Bianchi K, Varnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, Nagy AI, Balla T, Rizzuto R (2006) Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> channels. *The Journal of cell biology* **175**: 901-911

Szalai G, Csordas G, Hantash BM, Thomas AP, Hajnoczky G (2000) Calcium signal transmission between ryanodine receptors and mitochondria. *The Journal of biological chemistry* **275**: 15305-15313

Tamborero D, Gonzalez-Perez A, Perez-Llamas C, Deu-Pons J, Kandath C, Reimand J, Lawrence MS, Getz G, Bader GD, Ding L, Lopez-Bigas N (2013) Comprehensive identification of mutational cancer driver genes across 12 tumor types. *Scientific reports* **3**: 2650

Tang S, Wang X, Shen Q, Yang X, Yu C, Cai C, Cai G, Meng X, Zou F (2015) Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter is critical for store-operated Ca<sup>2+</sup> entry-dependent breast cancer cell migration. *Biochemical and biophysical research communications* **458**: 186-193

Tarasov AI, Semplici F, Ravier MA, Bellomo EA, Pullen TJ, Gilon P, Sekler I, Rizzuto R, Rutter GA (2012) The mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uniporter MCU is essential for glucose-induced ATP increases in pancreatic beta-cells. *PLoS one* **7**: e39722

Territo PR, Mootha VK, French SA, Balaban RS (2000) Ca<sup>2+</sup> activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub>-ATPase. *American journal of physiology Cell physiology* **278**: C423-435

Tomar D, Dong Z, Shanmughapriya S, Koch DA, Thomas T, Hoffman NE, Timbalia SA, Goldman SJ, Breves SL, Corbally DP, Nemani N, Fairweather JP, Cutri AR, Zhang X, Song J, Jana F, Huang J, Barrero C, Rabinowitz JE, Luongo TS, Schumacher SM, Rockman ME, Dietrich A, Merali S, Caplan J, Stathopoulos P, Ahima RS, Cheung JY, Houser SR, Koch WJ, Patel V, Gohil VM, Elrod JW, Rajan S, Madesh M (2016) MCUR1 Is a Scaffold Factor for the MCU Complex Function and Promotes Mitochondrial Bioenergetics. *Cell reports* **15**: 1673-1685

Tosatto A, Sommaggio R, Kummerow C, Bentham RB, Blacker TS, Berecz T, Duchon MR, Rosato A, Bogeski I, Szabadkai G, Rizzuto R, Mammucari C (2016) The mitochondrial calcium uniporter regulates breast cancer progression via HIF-1 $\alpha$ . *EMBO molecular medicine* **8**: 569-585

Tretter L, Adam-Vizi V (2004) Generation of reactive oxygen species in the reaction catalyzed by alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **24**: 7771-7778

Trotta AP, Gelles JD, Serasinghe MN, Loi P, Arbiser JL, Chipuk JE (2017) Disruption of mitochondrial electron transport chain function potentiates the pro-apoptotic effects of MAPK inhibition. *The Journal of biological chemistry* **292**: 11727-11739

Tsai MF, Jiang D, Zhao L, Clapham D, Miller C (2014) Functional reconstitution of the mitochondrial Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter Letm1. *The Journal of general physiology* **143**: 67-73

Tsai MF, Phillips CB, Ranaghan M, Tsai CW, Wu Y, Williams C, Miller C (2016) Dual functions of a small regulatory subunit in the mitochondrial calcium uniporter complex. *eLife* **5**

Umemura M, Baljinnyam E, Feske S, De Lorenzo MS, Xie LH, Feng X, Oda K, Makino A, Fujita T, Yokoyama U, Iwatsubo M, Chen S, Goydos JS, Ishikawa Y, Iwatsubo K (2014) Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry (SOCE) regulates melanoma proliferation and cell migration. *PLoS one* **9**: e89292

Vafai SB, Mootha VK (2012) Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* **491**: 374-383

Vais H, Tanis JE, Muller M, Payne R, Mallilankaraman K, Foskett JK (2015) MCUR1, CCDC90A, Is a Regulator of the Mitochondrial Calcium Uniporter. *Cell metabolism* **22**: 533-535

van der Laan M, Bohnert M, Wiedemann N, Pfanner N (2012) Role of MINOS in mitochondrial membrane architecture and biogenesis. *Trends in cell biology* **22**: 185-192

van Haften RI, Haenen GR, Evelo CT, Bast A (2003) Effect of vitamin E on glutathione-dependent enzymes. *Drug metabolism reviews* **35**: 215-253

Vazquez F, Lim JH, Chim H, Bhalla K, Girnun G, Pierce K, Clish CB, Granter SR, Widlund HR, Spiegelman BM, Puigserver P (2013) PGC1alpha expression defines a subset of human melanoma tumors with increased mitochondrial capacity and resistance to oxidative stress. *Cancer cell* **23**: 287-301

Veierod MB, Adami HO, Lund E, Armstrong BK, Weiderpass E (2010) Sun and solarium exposure and melanoma risk: effects of age, pigmentary characteristics, and nevi. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **19**: 111-120

Villanueva J, Vultur A, Lee JT, Somasundaram R, Fukunaga-Kalabis M, Cipolla AK, Wubbenhorst B, Xu X, Gimotty PA, Kee D, Santiago-Walker AE, Letrero R, D'Andrea K, Pushparajan A, Hayden JE, Brown KD, Laquerre S, McArthur GA, Sosman JA, Nathanson KL, Herlyn M (2010) Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K. *Cancer cell* **18**: 683-695

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW (2013) Cancer genome landscapes. *Science* **339**: 1546-1558

Waldeck-Weiermair M, Alam MR, Khan MJ, Deak AT, Vishnu N, Karsten F, Imamura H, Graier WF, Malli R (2012) Spatiotemporal correlations between cytosolic and mitochondrial Ca<sup>2+</sup> signals using a novel red-shifted mitochondrial targeted cameleon. *PLoS one* **7**: e45917

Waldeck-Weiermair M, Bischof H, Blass S, Deak AT, Klec C, Graier T, Roller C, Rost R, Eroglu E, Gottschalk B, Hofmann NA, Graier WF, Malli R (2015) Generation of Red-Shifted Cameleons for Imaging Ca(2+)(+) Dynamics of the Endoplasmic Reticulum. *Sensors* **15**: 13052-13068

Waldeck-Weiermair M, Jean-Quartier C, Rost R, Khan MJ, Vishnu N, Bondarenko AI, Imamura H, Malli R, Graier WF (2011) Leucine zipper EF hand-containing transmembrane protein 1 (Letm1) and uncoupling proteins 2 and 3 (UCP2/3) contribute to two distinct mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake pathways. *The Journal of biological chemistry* **286**: 28444-28455

Waldeck-Weiermair M, Malli R, Naghdi S, Trenker M, Kahn MJ, Graier WF (2010) The contribution of UCP2 and UCP3 to mitochondrial Ca(2+) uptake is differentially determined by the source of supplied Ca(2+). *Cell calcium* **47**: 433-440

Wan B, LaNoue KF, Cheung JY, Scaduto RC, Jr. (1989) Regulation of citric acid cycle by calcium. *The Journal of biological chemistry* **264**: 13430-13439

Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* **123**: 309-314

Wehage E, Eisfeld J, Heiner I, Jungling E, Zitt C, Luckhoff A (2002) Activation of the cation channel long transient receptor potential channel 2 (LTRPC2) by hydrogen peroxide. A splice variant reveals a mode of activation independent of ADP-ribose. *The Journal of biological chemistry* **277**: 23150-23156

Wellbrock C, Arozarena I (2015) Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. *Pigment cell & melanoma research* **28**: 390-406

Werth JL, Thayer SA (1994) Mitochondria buffer physiological calcium loads in cultured rat dorsal root ganglion neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **14**: 348-356

Whiteman DC, Whiteman CA, Green AC (2001) Childhood sun exposure as a risk factor for melanoma: a systematic review of epidemiologic studies. *Cancer causes & control : CCC* **12**: 69-82

Wiczler BM, Marcu R, Hawkins BJ (2014) KB-R7943, a plasma membrane Na(+)/Ca(2+) exchanger inhibitor, blocks opening of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochemical and biophysical research communications* **444**: 44-49

Wiel C, Lallet-Daher H, Gitenay D, Gras B, Le Calve B, Augert A, Ferrand M, Prevarskaya N, Simonnet H, Vindrieux D, Bernard D (2014) Endoplasmic reticulum calcium release through ITPR2 channels leads to mitochondrial calcium accumulation and senescence. *Nature communications* **5**: 3792

Worby CA, Dixon JE (2014) Pten. *Annual review of biochemistry* **83**: 641-669

Wu J, Abdelfattah AS, Miraucourt LS, Kutsarova E, Ruangkittisakul A, Zhou H, Ballanyi K, Wicks G, Drobizhev M, Rebane A, Ruthazer ES, Campbell RE (2014) A long Stokes shift red fluorescent Ca<sup>2+</sup> indicator protein for two-photon and ratiometric imaging. *Nature communications* **5**: 5262

Wu J, Liu L, Matsuda T, Zhao Y, Rebane A, Drobizhev M, Chang YF, Araki S, Arai Y, March K, Hughes TE, Sagou K, Miyata T, Nagai T, Li WH, Campbell RE (2013) Improved orange and red Ca<sup>2+</sup>/- indicators and photophysical considerations for optogenetic applications. *ACS chemical neuroscience* **4**: 963-972

Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla RC, Spiegelman BM (1999) Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**: 115-124

Xu S, Chisholm AD (2014) C. elegans epidermal wounding induces a mitochondrial ROS burst that promotes wound repair. *Developmental cell* **31**: 48-60

Yada Y, Higuchi K, Imokawa G (1991) Effects of endothelins on signal transduction and proliferation in human melanocytes. *The Journal of biological chemistry* **266**: 18352-18357

Yamamoto T, Yamagoshi R, Harada K, Kawano M, Minami N, Ido Y, Kuwahara K, Fujita A, Ozono M, Watanabe A, Yamada A, Terada H, Shinohara Y (2016) Analysis of the structure and function of EMRE in a yeast expression system. *Biochimica et biophysica acta* **1857**: 831-839

Yamamura H, Ugawa S, Ueda T, Morita A, Shimada S (2008) TRPM8 activation suppresses cellular viability in human melanoma. *American journal of physiology Cell physiology* **295**: C296-301

Yamaura M, Mitsushita J, Furuta S, Kiniwa Y, Ashida A, Goto Y, Shang WH, Kubodera M, Kato M, Takata M, Saida T, Kamata T (2009) NADPH oxidase 4 contributes to transformation phenotype of melanoma cells by regulating G2-M cell cycle progression. *Cancer research* **69**: 2647-2654

Yan L (2009) Abstract #DDT01-1: MK-2206: A potent oral allosteric AKT inhibitor. *Cancer research* **69**: DDT01-01-DDT01-01

Yi M, Weaver D, Hajnoczky G (2004) Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. *The Journal of cell biology* **167**: 661-672

Yohn JJ, Smith C, Stevens T, Hoffman TA, Morelli JG, Hurt DL, Yanagisawa M, Kane MA, Zamora MR (1994) Human melanoma cells express functional endothelin-1 receptors. *Biochemical and biophysical research communications* **201**: 449-457

Yu SP, Choi DW (1997) Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange currents in cortical neurons: concomitant forward and reverse operation and effect of glutamate. *The European journal of neuroscience* **9**: 1273-1281

Yuan P, Ito K, Perez-Lorenzo R, Del Guzzo C, Lee JH, Shen CH, Bosenberg MW, McMahon M, Cantley LC, Zheng B (2013) Phenformin enhances the therapeutic benefit of BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 18226-18231

Zeng F, Chen X, Cui W, Wen W, Lu F, Sun X, Ma D, Yuan Y, Li Z, Hou N, Zhao H, Bi X, Zhao J, Zhou J, Zhang Y, Xiao RP, Cai J, Zhang X (2018) RIPK1 binds MCU to mediate induction of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake and promote colorectal oncogenesis. *Cancer research*

Zentrum für Krebsregisterdaten GdeKiDEV (2017) Krebs in Deutschland für 2013/2014. **11.Ausgabe**

Zhao Q, Wang J, Levichkin IV, Stasinopoulos S, Ryan MT, Hoogenraad NJ (2002) A mitochondrial specific stress response in mammalian cells. *The EMBO journal* **21**: 4411-4419

Zhao Y, Araki S, Wu J, Teramoto T, Chang YF, Nakano M, Abdelfattah AS, Fujiwara M, Ishihara T, Nagai T, Campbell RE (2011) An expanded palette of genetically encoded Ca<sup>2+</sup> indicators. *Science* **333**: 1888-1891

Zhiqi S, Soltani MH, Bhat KM, Sangha N, Fang D, Hunter JJ, Setaluri V (2004) Human melastatin 1 (TRPM1) is regulated by MITF and produces multiple polypeptide isoforms in melanocytes and melanoma. *Melanoma research* **14**: 509-516



## Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Einstromwege für Kalzium in Melanomzellen und ihre physiologische Wirkung.....</i>	<i>14</i>
<i>Abbildung 2: Aufbau und Regulation des mitochondrialen Kalzium Uniporter Komplexes.....</i>	<i>25</i>
<i>Abbildung 3: Expression von MCU und seinen Regulatoren in Melanomzelllinien und primären Melanozyten.....</i>	<i>54</i>
<i>Abbildung 4: Transiente Herunterregulation von MCU und MICU1 durch siRNA.....</i>	<i>55</i>
<i>Abbildung 5: Stabile Herunterregulation in WM3734 und 1205Lu Knockdown-Linien durch shRNA....</i>	<i>57</i>
<i>Abbildung 6: Stimulation des Kalziueinstroms und Auswirkung der MCU Herunterregulation auf SOCE.....</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 7: Einfluss von MCU und MICU1 auf das mitochondriale Kalzium.....</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 8: Die Auswirkungen von MCU und MICU auf die ROS-Produktion in WM3734.....</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 9: MCU hat keinen Effekt auf den Zellzyklus in WM3734 Zellen.....</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 10: MCU zeigt keine Auswirkung auf die Proliferation verschiedener Melanomzellen nach transienter Herunterregulation.....</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 11: MCU zeigt keine Auswirkung auf die Proliferation verschiedener Melanomzellen bei stabiler Herunterregulation.....</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 12: Potential zur Invasion und Migration stabiler MCU-Knockdown-Zelllinien.....</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 13: MCU hat einen Einfluss auf das Tumorwachstum.....</i>	<i>69</i>
<i>Abbildung 14: Metastasierung von 1205Lu Melanomzellen in vivo.....</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 15: Einfluss von Anti- und Prooxidantien auf die Migration und Proliferation.....</i>	<i>71</i>
<i>Abbildung 16: Im RPPA Screen identifizierte Proteine, deren Expression durch die Herunterregulation von MCU beeinflusst werden könnte.....</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 17: Expression der Marker MITF und JARID1B auf Proteinebene unter dem Einfluss der Herunterregulation von MCU.....</i>	<i>74</i>
<i>Abbildung 18: Expression von PGC1<math>\alpha</math> auf Proteinebene unter dem Einfluss der Herunterregulation von MCU.....</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 19: Expression von VDAC1 auf Proteinebene unter dem Einfluss der Herunterregulation von MCU.....</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 20: Viabilität von WM3734 und 1205Lu Zellen nach Behandlung mit Inhibitoren des PI3K/Akt-Signalweges.....</i>	<i>78</i>
<i>Abbildung 21: Viabilität von WM3734 und 1205Lu Zellen nach Behandlung mit Inhibitoren des MAPK-Signalweges.....</i>	<i>80</i>
<i>Abbildung 22: Viabilität von WM3734 und 1205Lu Zellen nach Behandlung mit KB-R7943.....</i>	<i>81</i>

# Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 2: Verwendete Sekundärantikörper.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 3: Verwendete Chemikalien .....</i>	<i>27</i>
<i>Tabelle 4: Verwendete Größenstandards für Gelelektrophorese oder SDS-PAGE.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 5: Verwendete Laborgeräte mit Angabe des Herstellers.....</i>	<i>29</i>
<i>Tabelle 6: Komponenten des Imaging Setups für Sensor-basiertes Imaging.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 7: Komponenten des Kalzium-Imaging-Setups für Fura-2 Messungen.....</i>	<i>32</i>
<i>Tabelle 8: Verwendete qRT-PCR Primer.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 9: Verwendete siRNAs.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 10: Verwendete Kits.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabelle 11: Verwendete Konstrukte und ihre Bezugsquelle.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 12: Verwendete Verbrauchsmaterialien.....</i>	<i>34</i>
<i>Tabelle 13: Verwendete Kulturmedien und Zusätze.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 14: Transfektionsreagenzien.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 15: Verwendete Zelllinien und Primärzellen und ihre Bezugsquelle.....</i>	<i>35</i>
<i>Tabelle 16: Eingesetzte Wirkstoffe und Konzentrationen für Viabilitäts- und Proliferationsassays .....</i>	<i>39</i>
<i>Tabelle 17: Temperatur- und Zyklus-Bedingungen für die qRT-PCR Reaktion.....</i>	<i>41</i>
<i>Tabelle 18: In der Arbeit verwendete genetisch kodierte Imaging-Sensoren.....</i>	<i>45</i>
<i>Tabelle 19: Eingesetzte Stimulanzen mit ihrer Endkonzentration im Well.....</i>	<i>47</i>

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	englisch	deutsch
ATP	Adenosine triphosphate	Adenosintriphosphat
BCA	bicinchoninic acid	Bicinchoninsäure
BHQ	DI-Tert-butylhydroquinone	DI-Tert-butylhydroquinon
BSO	Buthionine sulfoximine	Buthioninsulfoximin
CAF	Cancer-associated fibroblast	Krebs-assoziierte Fibroblasten
Ca <sub>v</sub>	Voltage gated calcium channel	Spannungsgesteuerter Ca <sup>2+</sup> -Kanal
CTRL	control	Kontrolle
DMSO	Dimethyl sulfoxide	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid	Desoxyribonukleinsäure
ER / SR	Endoplasmic / sarcoplasmic reticulum	Endoplasmatisches / sarkoplas- matisches Retikulum
ET-1	Endothelin-1	Endothelin-1
ET <sub>A</sub> / ET <sub>B</sub>	Endothelin receptor A/B	Endothelinrezeptor A / B
FCS	Fetal calf serum	Fötales Kälberserum
FRET	Fluorescence/ Förster resonance energy transfer	Fluoreszenz- / Förster-Resonanz- Energietransfer
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	Glycerinaldehyd-3-phosphat- Dehydrogenase
GSH	Glutathione	Glutathion
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-trisphosphate	Inositol-1,4,5-trisphosphat
kDa	kilodalton	Kilodalton
MAM	mitochondrial associated membranes	Mitochondrial assoziierte Membranen
mRNA	Messenger RNA	Boten-RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5- diphenyltetrazoliumbromid
NAC	N-acetylcysteine	N-Acetylcystein
NAD	Nicotinamide adenine dinucleotide	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NHEM	Normal Human Epidermal Melanocytes	Gesunde humane epidermale Melanozy- ten
OMM	Outer mitochondrial membrane	Äußere mitochondriale Membran
PASMC	Pulmonary artery smooth muscle cells	glatte Muskelzellen pulmonaler Arte- rien
PCR	Polymerase chain reaction	Polymerasekettenreaktion
PHB	Polyhydroxybutyrate	Polyhydroxybutyrat
PI	Propidium iodide	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositide 3-kinase	Phosphatidylinositid 3-Kinase
PIP3	Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate	Phosphatidylinositol-(3,4,5)- triphosphat
PKC	Protein kinase c	Proteinkinase C

PLC	Phospholipase c	Phospholipase C
Pol	DNA polymerase	DNA-Polymerase
PVDF	Polyvinylidene fluoride	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	Quantitative real time polymerase chain reaction	Quantitative Echtzeit Polymerasekettenreaktion
RaM	rapid mode of Ca <sup>2+</sup> uptake	Schnelle Art des Kalziumeinstroms
RISC	RNA-induced silencing complex	RNA-induzierter silencing-Komplex
RNA	ribonucleic acid	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive oxygen species	Reaktive Sauerstoffspezies
RPPA	Reverse phase protein array	Reverse Phase Protein-Array
RuR	Ruthenium red	Rutheniumrot
RyR	Ryanodine receptor	Ryanodinrezeptor
SDS	sodium dodecyl sulfate	Natriumlaurylsulfat
SERCA	sarco/endoplasmic reticulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase	sarko-/endoplasmatische Retikulum Ca <sup>2+</sup> -ATPase
shRNA	Small/Short hairpin-RNA	Kurze RNA, die Haarnadelstruktur bildet
siRNA	Small interfering RNA	Kleine interferierende RNA
SOCE	Store-operated calcium entry	Speichergesteuerter Kalziumeinstrom
TBS	Tris-buffered saline	Tris-gepufferte Salzlösung
TBST	Tris-buffered saline with Tween20	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
Tg	Thapsigargin	Thapsigargin
UPRmt	mitochondrial unfolded protein response	-
VGM	vertical growth melanoma	Melanom mit vertikalem Wachstum
ZNS	Central nervous system	Zentrales Nervensystem

---

**Abkürzung eines Gens/Proteins**

---

Bak	bcl-2 antagonist/killer
Bax	bcl-2-like protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BRAF	Rapidly accelerated fibrosarcoma
BRCA1	breast cancer 1
CCDC109A	coiled-coil domain-containing protein 109A
CDKN2A	cyclin dependent kinase inhibitor 2A
COL6A	Collagen type 6
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
DRP1	dynamin-related protein 1
EEF2K	calmodulin-dependent protein kinase 3
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMRE	Essential MCU regulator
ERK	extracellular-signal-regulated kinase
FAK	Focal adhesion kinase
FHIT	fragile histidine triad
FIS1	mitochondrial fission 1
GAB2	GRB2-associated-binding protein 2
Gag	group-specific antigen
HGF	Hepatocyte growth factor
HIF-1 $\alpha$	hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$
IGF	insulin-like growth factor
IGFBP2	insulin-like growth factor-binding protein 2
JARID1B	jumonji AT rich interactive domain 1B
LETM1	leucine zipper-EF-hand-containing transmembrane protein 1
MAPK	mitogen-activated protein kinase
Mcl-1	myeloid cell leukemia 1
MCU	Mitochondrial calcium uniporter
MCUb	Mitochondrial calcium uniporter b
MCUR1	Mitochondrial calcium uniporter regulator 1
MEK	MAPK/ERK kinase
MFN1/2	Mitofusin 1/2
MICU1/2/3	Mitochondrial calcium uptake 1/2/3
MITF	microphthalmia-associated transcription factor
MT1-MMP	Membrane type 1-matrix metalloproteinase
mTOR	mechanistic target of rapamycin
NCLX	Mitochondrial Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -exchanger
NCX	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> -exchanger
NF1	Neurofibromin 1
NOX4	NADPH oxidase 4
OPA1	Optic Atrophy 1
PD-1	Programmed cell death protein 1

---

---

PDK1	Pyruvate dehydrogenase kinase 1
PGC1 $\alpha$	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform
PIK3CB	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform
Pol	DNA polymerase
PTEN	phosphatase and tensin homolog
PTP	Permeability transition pore
RAS	Rat sarcoma
RB1	retinoblastoma-associated protein 1
Rev	regulator of expression of virion proteins
RIPK1	receptor-interacting protein kinase 1
SRC Kinase	Sarcoma kinase
STIM	stromal interaction molecule
Tat	transactivator protein
TBP	TATA-binding protein
TGF- $\beta$	transforming growth factor $\beta$
TRPM1	Transient receptor potential melastatin 1
UCP2	Uncoupling protein 2
VDAC1	voltage-dependent anion channel 1
VSV-G	vesicular stomatitis virus glycoprotein

---

## Anhang

Nachfolgend sind die möglichen Interaktionspartner von MCU nach der Datenbankanalyse Bio-GRID3.4 aufgelistet:

<b>Abkürzung</b>	<b>Volle Proteinbezeichnung</b>
ABCC1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1
APLNR	apelin receptor
ARMC6	armadillo repeat containing 6
ASPH	aspartate beta-hydroxylase
CMKLR1	chemokine-like receptor 1
CMTM8	CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 8
COLEC10	collectin sub-family member 10 (C-type lectin)
EDEM2	ER degradation enhancer, mannosidase alpha-like 2
EIF2B1	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 1 alpha
EIF2B2	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 2 beta
EIF2B4	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 4 delta
ELAVL1	ELAV like RNA binding protein 1
ERLIN2	ER lipid raft associated 2
GNAI2	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2
GOLT1B	golgi transport 1B
HSD17B1	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 1
ICT1	immature colon carcinoma transcript 1
IL13RA2	interleukin 13 receptor, alpha 2
IRGC	immunity-related GTPase family, cinema
MGARP	mitochondria-localized glutamic acid-rich protein
MYC	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NDUFA4	mitochondrial complex associated
NDUFA9	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 9
NYX	nyctalopin
PDCD1 (PD-1)	programmed cell death 1
RAB7A	member RAS oncogene family
SLC15A1	solute carrier family 15 (oligopeptide transporter), member 1
SLC1A5	solute carrier family 1 (neutral amino acid transporter), member 5
SLC22A2	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2
SLC22A6	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 6
SLC38A2	solute carrier family 38, member 2
SLC5A8	solute carrier family 5 (sodium/monocarboxylate cotransporter), member 8
SMDT1 (EMRE)	single-pass membrane protein with aspartate-rich tail 1

---

SYPL1	synaptophysin-like 1
TOR1AIP2	torsin A interacting protein 2
TRIM25	tripartite motif containing 25
VAPA	VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein A
ZNF526	zinc finger protein 526

---

# Eidesstattliche Erklärung

Erklärung gemäß § 7 Abs. 1 Nr. 4

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Folgende Daten wurden am Wistar Institut Philadelphia (USA) in der Arbeitsgruppe von Dr. Meenhard Herlyn generiert:

- Western Blots der Abbildung 3 und Abbildung 5
- Die MTT-Proliferationsassays der Abbildung 11
- Die Bestimmung der Phase des Zellzyklus mittels FACS der Abbildung 9 wurde in der Einrichtung für Durchflusszytometrie mit Hilfe von Michaela Perego durchgeführt
- Die mikroskopische Bestimmung der Transwell-Migration der Abbildung 12 wurde in der Einrichtung für Mikroskopie mit Hilfe von James Hayden durchgeführt.
- Die Durchführung und Analyse der in vivo Mausexperimente und die Entnahme der Organe erfolgte durch Adina Vultur und Andrea Waters

Die Durchführung des RPPA-Screens und die erste vorläufige Datenanalyse erfolgte in der RPPA-Einrichtung des MD Anderson Krebszentrums in Houston, Texas (USA) durch G.B. Mills und Y. Lu. Der Probenversand wurde von Gao Zhang organisiert.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir die nachstehend aufgeführten Personen in der jeweils beschriebenen Weise unentgeltlich geholfen:

- Die regelmäßig Passage der Zelllinien Sk-Mel-5, MelJuso, WM3734 und 1205Lu wurde von Cora Hoxha, Sandra Janku, Susanne Renno, Gertrud Schwär und Nadine Schönwies übernommen
- Alle verwendeten  $Ca^{2+}$ -Ringerpuffer wurden von Gertrud Schwär und Petra Fries hergestellt
- Alexandra Stark führte die Western Blots der Abbildung 18 durch
- Die Western Blots der Abbildungen 3, 5, 17 und 19 wurden in Zusammenarbeit mit Alexandra Stark durchgeführt
- Die experimentelle Durchführung der qRT-PCRs der Abbildung 3 und Abbildung 4 erfolgte durch Alexandra Stark
- Die experimentelle Durchführung der qRT-PCRs der Abbildung 5 erfolgte unter Mithilfe von Sandra Janku
- Die experimentelle Durchführung der MTT-Assays der Abbildung 10 erfolgte durch Alexandra Stark
- Versuche zur Invasion der Abbildung 12 wurden von Batoool Shannan durchgeführt und ausgewertet
- Gewebeschnitte und Färbungen der Mausorgane wurden von Alexandra Stark durchgeführt, die bioinformatische Analyse der mikroskopischen Bilder erfolgte durch Anna Höwner
- Die experimentelle Durchführung der MTT-Assays der Abbildungen 20, 21 und 22 erfolgte mit Hilfe von Alexandra Stark und Sandra Janku

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater/innen oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Außer den Angegebenen hat niemand von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem anderen Verfahren zur Erlangung des Doktorgrades einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Vor Aufnahme der vorstehenden Versicherung an Eides Statt wurde ich über die Bedeutung einer eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung belehrt.

.....  
Ort, Datum

.....  
Unterschrift des Promovierenden

.....  
Unterschrift der die Versicherung an Eides statt  
aufnehmenden Beamtin bzw. des aufnehmenden  
Beamten

## Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei Markus Hoth bedanken. Danke, dass du mich (vor mittlerweile doch einigen Jahren) überzeugt hast, zur Masterarbeit zu euch zu kommen und danach auch noch für die Doktorarbeit bei euch zu bleiben! Die Atmosphäre, die du in der Arbeitsgruppe geschaffen hast, war einer der Gründe, warum ich immer gerne da war. Auch einen Dank für die ständige Unterstützung in allen Bereichen und das Vertrauen in meine Arbeit. Deine Überzeugungsversuche zur Unikarriere werde ich nicht vergessen :)

Ein großer Dank geht an meinen Betreuer Ivan Bogeski – ohne dich wäre ich nicht an dem Punkt, an dem ich jetzt bin. Du hast mir immer alle Freiheiten gelassen, mir die Möglichkeit zur beruflichen und persönlichen Weiterentwicklung gegeben und mir gezeigt wie gutes Networking aussieht. Dank dir durfte ich ein Teil vieler unterschiedlicher, spannender Projekte sein und sogar Erfahrung im Ausland sammeln. Danke auch für deine vielen Anregungen, Vorschläge, dein umfangreiches Wissen und die lebhaften Diskussionen.

Ein besonderer Dank geht auch an Eva Schwarz, durch die ich überhaupt erst in der Arbeitsgruppe gelandet bin. In den letzten Jahren hattest du immer ein offenes Ohr für alle Sorgen und Probleme, sei es beruflich oder privat. Danke für deine unglaubliche siRNA-Organisation und vor allem für die Vorbereitung des MCU-Projektes.

Auch Adina Vultur gilt mein herzlicher Dank. Du hast mir die Zeit in Philadelphia so viel einfacher gemacht und mich nicht nur im Labor betreut, sondern mir auch die Möglichkeit gegeben das Land außerhalb des Labors zu genießen. Danke für dein unfassbares Wissen über Melanome, Signalwege, Zelllinien und Methoden, das du immer gerne geteilt hast.

Ein Dankeschön auch an Meenhard Herlyn, der dazu bereit war mich in sein Labor aufzunehmen und mir damit eine unvergessliche Erfahrung ermöglicht hat.

Danke auch an Reinhard Kappl, der mich in die Geheimnisse des EPR-Geräts eingewiesen und jede noch so unsinnige Frage geduldig beantwortet hat.

Ein ganz großes Dankeschön an Alexandra Stark, die phasenweise schon fast meine „persönliche“ TA war. Du hast maßgeblich zum Gelingen des Projektes beigetragen. Danke auch an Sandra Janku für die Hilfe bei so vielen Versuchen, deine Flexibilität und das allgemeine Entertainment in unseren Gruppenmeetings :) Auch bei den vielen anderen helfenden Händen, die im Hintergrund immer dafür sorgen, dass das Labor läuft, möchte ich mich bedanken: Cora Hoxha, Gertrud Schwär, Susanne Renno, Andrea Armbrüster und Carmen Hässig.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Lieblingskolleginnen und „Leidensgenossinnen“ Anna, Steph, Sarah, Kim, Sabrina und Hélène bedanken. Durch euch war Arbeit nicht einfach nur Arbeit, sondern viel Spaß, Klatsch und Tratsch, ewige Diskussionen, kreative Basteleien, sinnvolle Ratschläge, Trost, Motivation und vor allem Freundschaft.

Danke an meine hilfreichen Korrekturleser Steph, Thomas, Michi, Sabrina und Kim, die mich beim Auffinden der gefühlt 100000 verschiedenen Fehler dieser Arbeit unterstützt haben. Ohne euch hätte ich wahrscheinlich noch nicht einmal die Hälfte gefunden.

Ein großer Dank geht auch an meine „Wahlfamilie“ im Saarland, meine Mädels Anna und Anna, Laura, Steph und Anke. Ihr seid mit mir schon durch so viele Hochs und Tiefs gegangen. Durch euch habe ich mich auch hier immer zuhause gefühlt.

Ein ganz besonderes Dankeschön geht an meine wunderbare Familie: meine Geschwister Lena und Michi, meine Eltern Manfred und Rosalinde und meine Großeltern Helmut und Katharina. Danke für eure bedingungslose Unterstützung über all die Jahre und euren unerschütterlichen Glauben an mich. Danke, dass ihr mir schon immer mehr zugetraut habt, als ich mir selber.

Zuletzt möchte ich mich noch bei meinen besonderen Herzensmenschen bedanken, die sich hier bereits in den Zeilen verstecken. Danke, dass ihr mir immer meine Laune schon an der Nasenspitze ansehen könnt, mich motiviert, meine Tränen trocknet, mich zum Lachen bringt und an mich glaubt! Ohne euch hätte ich das nicht geschafft.

## Publikationen

Overcoming intrinsic multidrug resistance in melanoma by blocking the mitochondrial respiratory chain of slow-cycling JARID1B(high) cells.

Roesch A, Vultur A, Bogeski I, Wang H, **Zimmermann KM**, Speicher D, Körbel C, Laschke MW, Gimotty PA, Philipp SE, Krause E, Pätzold S, Villanueva J, Krepler C, Fukunaga-Kalabis M, Hoth M, Bastian BC, Vogt T, Herlyn M

Cancer Cell, Juni 2013; 23(6):811-25. doi: 10.1016/j.ccr.2013.05.003

The Ca<sup>(2+)</sup>-Dependent Release of the Mia40-Induced MICU1-MICU2 Dimer from MCU Regulates Mitochondrial Ca<sup>(2+)</sup> Uptake.

Petruנגaro C, **Zimmermann KM**, Küttner V, Fischer M, Dengjel J, Bogeski I, Riemer J

Cell Metabolism, Oktober 2015; 22(4):721-33. doi: 10.1016/j.cmet.2015.08.019.

Imaging calcium and redox signals using genetically encoded fluorescent indicators.

Gibhardt CS, **Zimmermann KM**, Zhang X, Belousov VV, Bogeski I

Cell Calcium, August 2016; 60(2):55-64. doi: 10.1016/j.ceca.2016.04.008.

Measuring Mitochondrial ROS in Mammalian Cells with a Genetically Encoded Protein Sensor.

Zhang X, Gibhardt CS, Cappello S, **Zimmermann KM**, Vultur A, Bogeski I

Bio-Protocol, Januar 2018; doi:10.21769/BioProtoc.2705

ACER is the ATP/ADP carrier in the ER membrane and part of a novel regulatory circuit.

Klein MC, **Zimmermann KM**, Schorr S, Landini M, Klemens P, Jung M, Krause E, Nguyen D, Helms V, Rettig J, Cavalié A, Hoth M, Bogeski I, Neuhaus HE, Zimmermann R, Lang S, Haferkamp I

Under review