



MASTERARBEIT | MASTER'S THESIS

Titel | Title

Prolin-Effekte auf humane Melanomzellen und deren
pharmakologische Regulation

verfasst von | submitted by

Hannah Marie Welzel BSc

angestrebter akademischer Grad | in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Magistra pharmaciae (Mag. pharm.)

Wien | Vienna, 2026

Studienkennzahl lt. Studienblatt | Degree
programme code as it appears on the
student record sheet:

UA 066 605

Studienrichtung lt. Studienblatt | Degree
programme as it appears on the student
record sheet:

Masterstudium Pharmazie

Betreut von | Supervisor:

ao. Univ.-Prof. Dr. Dr. Martin Hohenegger

Danksagung

Ich möchte mich herzlichst bei Ao. Univ.-Prof. Dr. Martin Hohenegger bedanken, der mir die Möglichkeit gegeben hat, an diesem spannenden Thema zu arbeiten. Ich bedanke mich für die Geduld meine Fragen zu beantworten, wertvollen Ratschläge und kompetente Betreuung.

Außerdem möchte ich meinen Eltern danken, die mir die Chance gegeben haben, meinem Traum nachzugehen und mich dabei immer unterstützt und motiviert haben. Abschließend möchte ich mich noch bei meinem Mann Abdelkader bedanken , der mich in schweren Zeiten immer aufgemuntert hat.

Inhaltsverzeichnis

1.	Abstract.....	5
2.	Zusammenfassung	6
3.	Einleitung	7
3.1	Aufbau der Haut	7
3.2	Der Hautkrebs	8
3.2.1	Nicht-melanozytärer Hautkrebs	9
3.2.2	Das Melanom	9
3.3	Epidemiologie	10
3.4	Risikofaktoren.....	11
3.5	Diagnostik.....	12
3.6	Mutationen.....	13
3.6.1	BRAF-Mutation	13
3.6.2	NRAS-Mutation.....	13
3.6.3	Tumorsuppressor NF1	13
3.7	Signalwege.....	14
3.7.1	ERK/MAPK-Signalweg	14
3.8	Therapie.....	15
3.8.1	Dabrafenib	16
3.8.2	Trametinib	16
3.8.3	SOS1 – Inhibitor (BAY293)	16
3.9	Prolin	17
3.9.1	Prolinbiosynthese.....	17
3.9.2	Funktionen und Aufgaben von Prolin	17
4.	Ziel der Arbeit	19
5.	Material und Methoden.....	20
5.1	Verwendete Zelllinien.....	20
5.2	Nährmedien	20
5.3	Substanzen	21
5.4	Geräte.....	21

5.5	Zellkultur	21
5.5.1	Zellen auftauen	21
5.5.2	Zellen splitten.....	22
5.5.3	Zellen zählen	22
5.5.4	Zellen einfrieren	22
5.6	Koloniebildungsexperiment (Colony Formation Assay).....	23
5.6.1	Vorbereitungen.....	23
5.6.2	Untere Agarschicht.....	23
5.6.3	Zellen sammeln.....	23
5.6.4	Obere Agarschicht.....	23
5.6.5	Behandlungen	24
5.6.6	Auswertung	25
5.6.6.1	Tote Zellen färben	25
5.6.6.2	Dokumentation der Koloniebildung	25
5.6.6.3	Auswertung	25
5.7	Fluoreszenzmikroskopie	25
5.7.1	Lyso- und Mitotracker.....	25
5.7.2	Dansylprolin	26
5.8	Statistische Auswertung.....	26
6.	Ergebnisse.....	27
6.1	Colony Formation Assay	27
6.1.1	Behandlung mit Prolin	27
6.1.1.1	WM35 Zelllinie.....	28
6.1.1.2	WM278 Zelllinie.....	31
6.1.1.3	WM793b Zelllinie.....	33
6.1.1.4	A375 Zelllinie.....	35
6.1.1.5	518a2 Zelllinie	37
6.1.2	Behandlung mit BAY293 und BAY293 kombiniert mit Prolin	39
6.1.2.1	WM35 Zelllinie.....	40
6.1.2.2	WM278 Zelllinie.....	43
6.1.2.3	WM793b Zelllinie.....	46
6.1.2.4	A375 Zelllinie.....	49
6.1.2.5	518a2 Zelllinie	52
6.2	Fluoreszenzmikroskopie	56
6.2.1	Morphologie von Melanomzellen	56
6.2.2	Aufnahme von Dansylprolin.....	57

7.	<i>Diskussion</i>	59
7.1	Auswirkungen von Prolin auf humane Melanomzellen	59
7.1.1	Auswirkung auf die Anzahl der Kolonien	59
7.1.2	Auswirkung auf die Größe der Kolonien	60
7.2	Auswirkungen von BAY293 auf humane Melanomzellen	60
7.2.1	Auswirkung auf die Anzahl der Kolonien	61
7.2.2	Auswirkung auf die Größe der Kolonien	61
7.3	Auswirkungen von BAY293 in Kombination mit Prolin auf humane Melanomzellen	
	62	
7.3.1	Auswirkung auf die Anzahl der Kolonien	62
7.3.2	Auswirkung auf die Größe der Kolonien	62
7.4	Aufnahme von Dansylprolin in humane Melanomzellen	63
7.5	Konklusion	63
8.	<i>Abkürzungen</i>	64
9.	<i>Abbildungsverzeichnis</i>	65
10.	<i>Tabellenverzeichnis</i>	68
11.	<i>Quellenverzeichnis</i>	69

1. Abstract

In 2024 the malignant melanoma was the 17th most common cancer worldwide and with approximately 60.000 deaths the 22nd leading cause of cancer-related mortality, with men being affected more frequently than women. The major risk is UV radiation, which can induce DNA damage. This affects the ERK/MAPK-pathway, where mutations in BRAF and NRAS lead to a higher rate of cell differentiation and proliferation. The current therapy is a combination of the BRAF inhibitor Dabrafenib and the MEK inhibitor Trametinib. Currently there is a new drug called BAY293, which inhibits the interaction of SOS1 and RAS within the same pathway. Moreover, recent experiments have shown that the proline concentration is correlated to the melanoma cell growth. It was therefore the aim of this thesis to demonstrate a possible concentration-dependent effect of proline and BAY293 and to examine the differences between the various growth phases.

Experiments were performed with non-metastatic human melanoma cells (WM35, WM278 and WM793b) and metastatic human melanoma cells (A375 and 518a2). The colony formation assay was used to examine the ability of the different cell lines to form colonies in an anchorage independent manner in the presence and absence of different BAY293 and proline. Furthermore, fluorescent dansylproline was employed to detect cellular uptake and compartmentalisation.

The results show that proline has no concentration-dependent effect on the number and size of colonies from non-metastatic and metastatic melanoma cells. In 518a2 cells only, an increase in colonies was observed after two weeks in a concentration dependent manner. Treatment with BAY293 showed a concentration dependent decrease in the number of colonies and in the size of colonies of the category over $400\mu\text{m}^2$. Furthermore, these effects were enhanced after a four week incubation period. The combination of BAY293 and proline amplified the reduction in colony number in the non-metastatic cell lines. Finally, the uptake of proline into the 518a2 cells was confirmed using the fluorescent analogue dansylproline. Counterstaining of lysosomes revealed an accumulation of proline in perinuclear lysosomal network.

Taken together it was shown that BAY293 has the ability to reduce colony formation melanoma cells of all stages and also in the presence of proline. However, proline alone had no apparent effect on anchorage independent growth.

2.Zusammenfassung

Das maligne Melanom war 2024 weltweit die 17.häufigste Krebserkrankung und mit circa 60.000 Todesfällen die 22.häufigste Todesursache innerhalb aller Krebserkrankungen, wobei Männer häufiger betroffen waren als Frauen. Den größten Risikofaktor stellt die UV-Strahlung dar, die DNA-Schäden hervorrufen kann. Dabei ist der ERK/MAPK-Signalweg betroffen, der durch Mutationen in BRAF und NRAS zu einer übermäßigen Zelldifferenzierung und Proliferation führt. Der aktuelle Therapieplan sieht eine zielgerichtete Kombinationstherapie aus einem BRAF-Inhibitor (zB.: Dabrafenib) und einem MEK-Inhibitor (zB.: Trametinib) vor. Mit BAY293 gibt es einen neuen Wirkstoff, der die Interaktion von SOS1 mit RAS im gleichen Signalweg inhibiert. Außerdem zeigen neue Experimente, dass das Wachstum von Melanomzellen im Zusammenhang mit der Prolinkonzentration steht. Aus diesem Grund war es das Ziel dieser Arbeit, einen möglichen konzentrationsabhängigen Effekt von Prolin und BAY293 nachzuweisen und die Unterschiede der verschiedenen Wachstumsphasen zu begutachten.

In diesem Experiment wurden fünf verschiedene Melanomzelllinien verwendet. Auf der einen Seite die nicht metastasierenden Zellen (WM35, WM278 und WM793b) und auf der anderen Seite die metastasierenden Melanomzellen (A375 und 518a2). Mit dem Colony Formation Assay wurde die Fähigkeit der Koloniebildung der verschiedenen Zellen in und ohne Anwesenheit von verschiedenen Konzentrationen von BAY293 und Prolin überprüft. Des Weiteren wurde mit der Hilfe von fluoreszierendem Dansylprolin versucht herauszufinden, in welche Zellorganellen das Prolin aufgenommen wird.

Die Ergebnisse zeigen, dass Prolin keinen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Anzahl und einen leichten auf die Größe der Kolonien hat. Nur bei den metastatischen 518a2 Zellen wurde nach zwei Wochen eine konzentrationsabhängige Abnahme der Anzahl der Kolonien und der Größe der Kolonien $\geq 400\mu\text{m}^2$ festgestellt. Darüber hinaus wurden diese Effekte nach einer vierwöchigen Inkubationszeit verstärkt. Die Kombination von BAY293 und Prolin verstärkt die Reduktion der Kolonienanzahl in den nicht-metastatischen Zelllinien. Abschließend wurde die Aufnahme von Prolin in die 518a2 Zellen unter Verwendung des fluoreszierenden Dansylprolin bestätigt. Die Gegenfärbung von Lysosomen zeigte eine Anreicherung von Prolin im perinukleären lysosomalen Netzwerk.

Zusammenfassend wurde demonstriert, dass BAY293 die Fähigkeit besitzt, die Koloniebildung von Melanomzellen aller Stadien und auch in Gegenwart von Prolin zu reduzieren. Prolin alleine hatte jedoch keinen erkennbaren Einfluss auf das ankerunabhängige Wachstum.

3. Einleitung

3.1 Aufbau der Haut

Die Haut ist das größte Organ des Menschen, welche mehrere wichtige Funktionen hat (Yousef et al., 2025). Zum einen dient sie als Schutz der inneren Organe vor chemischen und mechanischen Verletzungen, Austrocknung, Mikroorganismen und UV-Licht. Zum anderen ist das Organ für die Schweiß- und Talksekretion verantwortlich und sorgt dafür, dass die Körpertemperatur aufrechterhalten bleibt (Baker, 2019; Kolarsick et al., 2011; Pullar et al., 2017).

Die Haut kann in drei primäre Schichten aufgeteilt werden (siehe Abbildung 1). Die erste und äußerste Schicht ist die Epidermis und beinhaltet Keratinozyten, Langerhans-Zellen, Melanozyten und Merkel-Zellen. Die Keratinozyten produzieren Keratin, ein wichtiges Strukturprotein, das in den Hautanhangsgebilden wie Haaren und Nägeln für Festigkeit und Elastizität sorgt. (Kolarsick et al., 2011). Die Epidermis setzt sich aus fünf Schichten zusammen: Stratum corneum, Stratum lucidum, Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale (Yousef et al., 2025). Auf der Höhe der Basalmembran (Stratum basale) findet sich der Übergang zur papillären und retikulären Bindegewebsschicht der Dermis. Diese Schicht verbindet die Epidermis mit der Hypodermis. Sie stützt die Epidermis und verleiht der Haut Festigkeit und Elastizität. In der Dermis finden sich die Ausläufer des Nerven-, Kreislauf- und Lymphsystems, sowie die Schweißdrüsen und Haarfollikel (Arda et al., 2014; Pérez-Sánchez et al., 2018; Yousef et al., 2025). Die innerste und tiefste Schicht ist die Hypodermis, die hauptsächlich durch Fettgewebe gebildet wird (s. Abb.1). Wie die Dermis, ist diese Schicht gut durchblutet und durch die vorhandenen sensorischen Nerven auch schmerzempfindlich (Arda et al., 2014; Yousef et al., 2025).

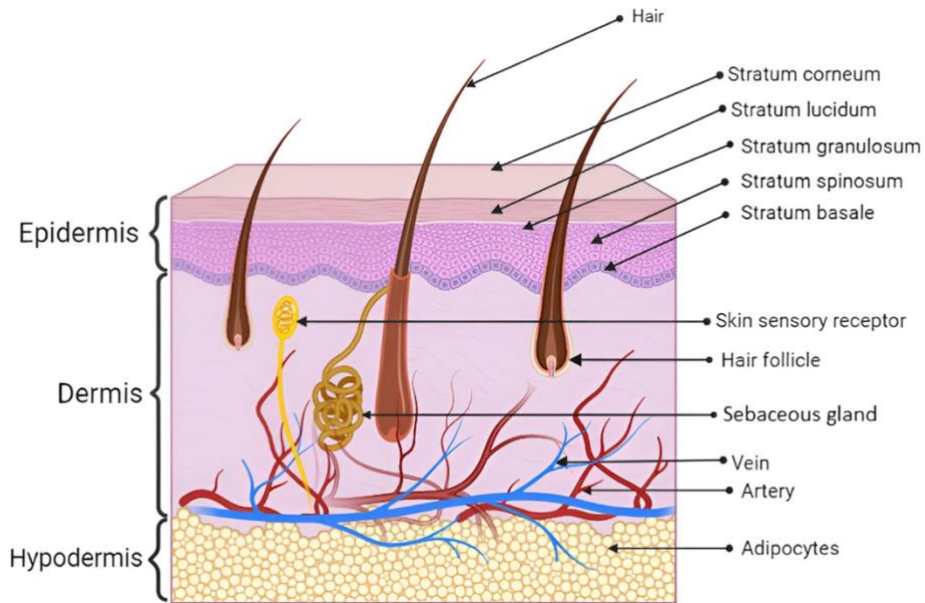


Abbildung 1 - Aufbau der Haut (Roky et al., 2025).

3.2 Der Hautkrebs

Der Hautkrebs wird in zwei Gruppen unterteilt. Auf der einen Seite gibt es den nicht-melanozytären Hautkrebs (englisch: non-melanoma skin cancer; NMSC) und auf der anderen Seite den melanozytären Hautkrebs bzw. das Melanom (Abb.2).

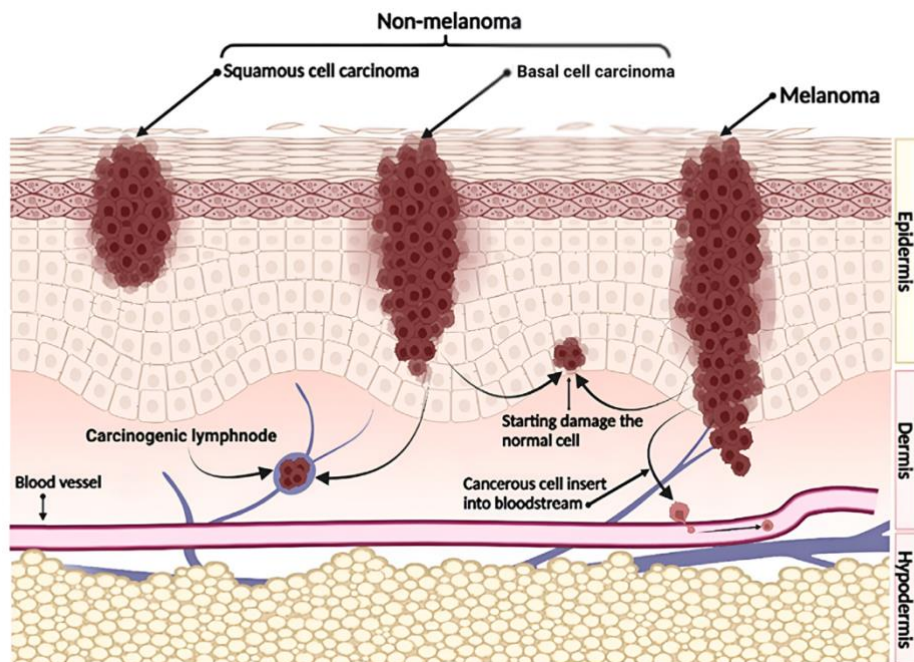


Abbildung 2 - Verschiedene Arten von Hautkrebs (Roky et al., 2025).

3.2.1 Nicht-melanozytärer Hautkrebs

NMSC ist einer der häufigsten bösartigen Tumoren bei Menschen und entwickelt sich in den epidermalen Keratinozyten. Der nicht-melanozytärer Hautkrebs wird noch einmal in zwei große Gruppen aufgeteilt (Ciężyńska et al., 2021; Griffin et al., 2016). Zum einen gibt es das Basalzellkarzinom (englisch: Basal cell carcinoma; BCC), welches mit einer Häufigkeit von rund 70% die am häufigsten vorkommende Variante von NMSC ist (Leiter et al., 2014). Diese Art entsteht in der Basalzellschicht aus nicht keratinisierenden Zellen (Lewin & Carucci, 2015). Oft ist es eine kleine Papel, die sich langsam über Monate und Jahre hinweg vergrößert. BCC wird oft mit einem Pickel verwechselt und ist schwer von gutartigen Neoplasien zu unterscheiden. Obwohl Metastasen selten vorkommen, kann das lokale Wachstum ästhetische und funktionelle Auswirkungen haben (Madan et al., 2010). Zum anderen macht das Plattenepithelkarzinom (englisch: Squamous cell carcinoma; SCC) 25% aller NMSC-Fälle aus (Leiter et al., 2014). In diesem Fall entsteht der Tumor aus epidermalen Keratinozyten oder adnexalen Hautgebilden, wie Talgdrüsen, Haarfollikeln oder ekkrine Drüsen (Firnhaber, 2012). Diese Art dringt in die Dermis ein und es kann in fortgeschrittenen Stadien, je nach Lokalisation und Größe, zur Ausbreitung von Metastasen über hämatogene oder lymphatische Wege kommen. Die Gesamtmetastasierung liegt zwischen drei und zehn Prozent (Gordon, 2013).

3.2.2 Das Melanom

Obwohl das Melanom im Vergleich zu den nicht-melanozytären Hautkrebsformen deutlich seltener auftritt (3% aller Hautkrebsfälle), ist es für circa 65% aller hautkrebsbedingten Todesfälle verantwortlich (Cummins et al., 2006). Der Tumor entwickelt sich aus epidermalen Melanozyten und kann in jedem Gewebe auftreten, die diese Zellen enthalten. Neben der Haut sind auch nicht-kutane Lokalisationen wie dem Nasenrachenraum, den Nasennebenhöhlen, der Mundschleimhaut, dem Tracheobronchialbaum, der Retina, dem Zentralnervensystem, dem Anus, der Vulva, der Vagina und den Harnwegen möglich (Chang et al., 1998).

Das Melanom wird in vier Gruppen unterteilt (siehe Abbildung 3). Erstens gibt es das „Superfiziell spreitendes Melanom“ (englisch: superficial spreading melanoma; SSM), welches überall am Körper entstehen kann und radial wächst. Diesen Typen haben 60-70% aller Melanompatienten. An zweiter Stelle kommt mit einer Häufigkeit von 15-30% das „Nodulare Melanom“ (englisch: nodular melanoma; NM), welches durch sein vertikales Wachstum gekennzeichnet ist. Des Weiteren gibt es das „Lentigo maligna Melanom“ (englisch: lentigo maligna melanoma; LMM), welches acht Prozent der Patienten betrifft. Die Besonderheit dieses Typen liegt darin, dass der Krebs nicht braun/schwarz erscheint, sondern rot oder hautfarben, da kein Melanin enthalten ist (Lens, n.d.; Situm et al., 2014). Mit einem Vorkommen von zwei bis drei Prozent macht das „Akral lentiginöses Melanom“ (englisch: acral

lentiginous melanoma; ALM) die seltenste Gruppe aus. Bei dunkelhäutigen Menschen ist dieser Typ mit 58% jedoch der Häufigste (Huang et al., 2020).

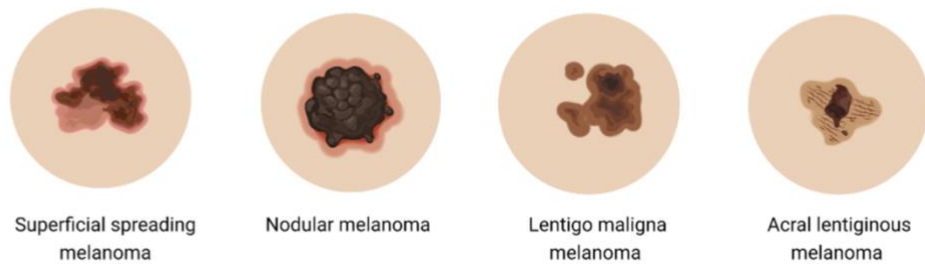


Abbildung 3 - Aussehen der verschiedenen Melanomtypen (Roky et al., 2025).

Der schwarze Hautkrebs wird in fünf Entwicklungsschritte eingeteilt (siehe Abbildung 4). In Phase 0 beginnt die Entwicklung in der Epidermis. Danach folgen Phase 1 und 2 in der der Tumor lokal immer dicker wird. In Phase 3 erreicht das Melanom die Lymphgefäße und Lymphknoten und im letzten Stadium, der 4. Phase, metastasiert der Tumor über die Blutgefäße im ganzen Körper (Papageorgiou et al., 2021).

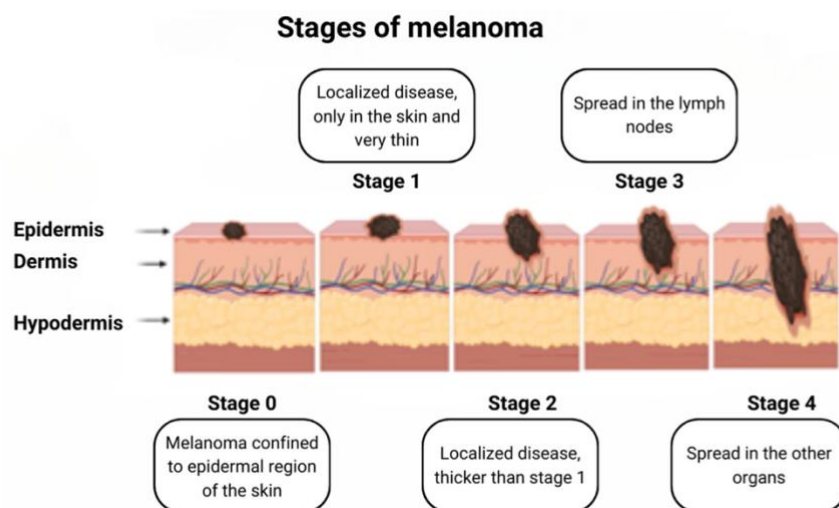


Abbildung 4 - Stadien des Melanoms (Roky et al., 2025).

3.3 Epidemiologie

Nach „Global Cancer Observatory“ (Globocan) gab es im Jahr 2022 331.722 neue Melanomfälle weltweit und somit war diese Krebsart die 17. häufigste in diesem Jahr. Mit 58.667 Todesfällen im gleichen Jahr belegte das Melanom den 22. Platz (International Agency for Research on Cancer, 2024).

Die weltweiten Inzidenzen (altersstandardisiert) bei Männern lag bei 3,8 pro 100.000 Einwohner (EW), wobei es bei den Frauen 3,0 pro 100.000 EW waren. Auch im Bereich der

Mortalität (altersstandardisiert) haben Männer ein höheres Risiko (0,7 pro 100.000 EW) als Frauen (0,4 pro 100.000 EW) an einem Melanom zu versterben (Roky et al., 2025).

Die Länder mit den höchsten Fallzahlen sind Australien und Neuseeland. Die Inzidenzrate in Australien betrug 2024 69 pro 100.000 EW (1.896 neue Fälle), wobei die Mortalitätsrate bei 4,9 pro 100.000 EW lag (Australian Government - Cancer Australia, 2025). In Neuseeland betrug die Anzahl der Neuerkrankungen im Jahr 2022 3.116 (Inzidenzrate von 60,5 pro 100.000 EW). 2020 ergab die Mortalitätsrate einen Wert von 5,7 pro 100.000 EW für diesen Tumor (Environmental Health Intelligence New Zealand, n.d.).

2023 gab es in Österreich 2.015 neue Melanomfälle, davon waren 1.080 Männer und 935 Frauen betroffen. Circa 20%, nämlich 410 Menschen (250 Männer und 160 Frauen) starben an dieser Krebsart. Das entspricht einer Inzidenzrate von 22,4 pro 100.000 EW und einer Mortalitätsrate von 4,6 pro 100.000 EW (Österreichische Krebshilfe, 2025).

3.4 Risikofaktoren

Der größte Risikofaktor für das Melanom ist die Ultraviolette Strahlung (UV-Strahlung) des Sonnenlichts. Es gibt zwei Arten von UV-Strahlung. Einerseits die UVA-Strahlung und andererseits die UVB-Strahlung, wobei die UVA-Strahlung tiefer in die Haut eindringt (Brenner & Hearing, 2008). Während die UVB-Strahlung die DNA direkt schädigen kann und für Sonnenbrände und Erytheme verantwortlich ist, bildet die UVA-Strahlung freie Radikale und schädigt somit die DNA (Brenner & Hearing, 2008; Madan et al., 2010).

Das p53-Tumorsuppressorgen wird von der UV-Strahlung beschädigt und dadurch kann dieses Gen die DNA-Schäden nicht mehr reparieren oder die Zelle in die Apoptose schicken. Das führt dazu, dass sich die Keratinozyten unkontrolliert teilen können und somit löst diese Mutation den Prozess des Tumorwachstums aus (Benjamin & Ananthaswamy, 2007; Brenner & Hearing, 2008).

Personen, die in ihrem Leben mehr als fünf schwerwiegende Sonnenbrände hatten, weisen ein doppelt so hohes Risiko auf, ein Melanom zu entwickeln, im Vergleich zu Personen, die keine schweren oder weniger Sonnenbrände hatten (Candido et al., 2014).

Ebenfalls im Zusammenhang mit der UV-Strahlung sind regelmäßige Solarienbesuche. Besonders im Alter vor 35 Jahren hat dies eine große Auswirkung (Boniol et al., 2012). Des Weiteren haben Menschen mit verminderter Pigmentierung ein höheres Risiko, da sie gegenüber UV-Strahlen empfindlicher sind. Helle Augen, helle Haut und rote Haare sind phänotypische Merkmale, die auf ein erhöhtes Risiko hinweisen (Dessinioti et al., 2011). Außerdem ist das Vorhandensein von dysplastischen und melanozytären Nävi ein erhöhter Risikofaktor, denn 25% der Melanome entwickeln sich aus bereits vorhandenen Muttermalen

(Berwick et al., 2009; Olsen et al., 2009). Abschließend lässt sich noch sagen, dass sowohl eine persönliche oder familiäre Vorgeschichte, sowie ein hoher sozioökonomischer Status im Zusammenhang mit einem erhöhten Risiko für Melanom steht (Berwick et al., 2009; Jiang et al., 2015; van der Leest et al., 2015).

3.5 Diagnostik

Eine frühe Diagnose des Melanoms ist sehr entscheidend für den weiteren Verlauf. Deshalb sollte die Selbstkontrolle der Muttermale, deren rasche Veränderung, Größe und Symptome, wie zB. Blutungen beinhalten. Eine Hilfe dafür stellt die die ABCDE-Regel dar. Das A steht für Asymmetrie (englisch: asymmetry), das B für unregelmäßige Ränder (englisch: border), das C für eine nicht einheitliche Farbe (englisch: colour), das D für einen Durchmesser von mehr als 6mm (englisch: diameter) und abschließend das E für die Entwicklung, Erhebung und Vergrößerung von Läsionen (englisch: evolving). Es ist wichtig zu erwähnen, dass nicht jedes Melanom alle fünf Merkmale aufweisen muss. In den meisten Fällen sind es nur zwei bis drei Merkmale (Cummins et al., 2006).

Erfahrene Ärzte können die meisten Melanome durch eine visuelle Untersuchung erkennen. Da es allerdings auch amelanotische und dünne Tumore gibt, wird in vielen Fällen auf die Unterstützung eines bildgebenden Verfahrens zurückgegriffen. Das Dermatoskop, auch Epilumineszenzmikroskop genannt, wird am häufigsten eingesetzt. Dieses vergrößernde Gerät untersucht die Hautoberfläche und nutzt eine Lichtquelle um ohne Störung der Reflexionen die Oberfläche nach Hautveränderungen abzusuchen (Vestergaard et al., 2008). Um unnötige Eingriffe zu vermeiden, kann zusätzlich ein Digitalisierungsgerät verwendet werden, welches die Bilder speichern kann. Somit kann der Arzt die Bilder im Laufe der Krankengeschichte über einen langen Zeitraum vergleichen. Atypische Entwicklungen des Erscheinungsbilds können so leichter und präziser erkannt werden (Haenssle et al., 2006; Tromme et al., 2012).

Nach der chirurgischen Entfernung eines möglichen Melanoms folgt eine histopathologische Diagnose. Wenn diese ein invasives Melanom bestätigt, folgt eine sonographische und palpatorische Untersuchung in der naheliegenden Lymphknotenregion. Liegt ein Primärtumor mit einer Tiefe von mindestens 4mm oder Hinweise auf Metastasen vor, wird eine weiterführende Bildgebung mittels MRT oder CT empfohlen, um eine Fernmetastasierung auszuschließen (Schadendorf et al., 2018).

3.6 Mutationen

Die häufigsten Mutationen von Melanomen sind in den Genen zu finden, die zentrale zelluläre Prozesse wie Proliferation steuern (Leonardi et al., 2018). Außerdem stellt die UV-Belastung einen Risikofaktor dar, der zu Spontanmutationen führen kann.

3.6.1 BRAF-Mutation

Das Protein BRAF ist ein Protoonkogen, das für eine Serin/Threonin-Proteinkinase kodiert. Es ist am Ras-Raf-MEK-ERK-Kinase Signalweg (auch als MAPK-Signalweg bekannt) beteiligt (siehe Abbildung 5). 40-60% aller Melanomfälle weisen eine Mutation im BRAF-Protein auf (Leonardi et al., 2018). In der Missense-Mutation V600E wird am Codon 600 fälschlicherweise ein Valin statt einer Glutaminsäure eingebaut. BRAF^{V600E} ist konstitutiv aktiv und somit entsteht eine unkontrollierte Zellproliferation. 90% aller aktivierten Mutationen kommen von dieser Missense-Mutation (Lovly et al., 2012; Rubinstein et al., 2010; Solit & Sawyers, 2010). Die zweithäufigste Mutation von BRAF betrifft den Aminosäureaustausch V600K (statt Valin ein Lysin) (Pollock et al., 2003).

3.6.2 NRAS-Mutation

NRAS-aktivierte Mutationen sind in 15-30% der mutierten Melanome zu finden und sind somit die zweithäufigste Mutation am MAPK-Signalweg. Durch eine Missense-Mutation der Codons 12, 13 oder 61 kommt es zu einem verlängerten Zustand, indem NRAS in der aktiven GTP-gebundenen Form konstitutiv aktiv ist. Dadurch bleibt die Signalübertragung über den MAPK- und PI3K-Signalweg abnormal bestehen und ist unabhängig von übergeordneten Stimulationen (Curtin et al., 2005; Fedorenko et al., 2013; Giehl, 2005; Jakob et al., 2012). Prinzipiell gilt, dass sich BRAF- und NRAS-Mutation gegenseitig ausschließen, allerdings können selten Co-Mutationen auftreten (Leonardi et al., 2018).

3.6.3 Tumorsuppressor NF1

Das NF1-Protein katalysiert die Hydrolyse des Guanosintriphosphats im aktiven RAS und inaktiviert dadurch den RAS-Signalweg (Nissan et al., 2014). 10-15 % der Melanomapatienten weisen in diesem Gen eine Mutation auf, wodurch die inhibitorische Wirkung des Ras-Signalwegs durch NF1 verloren geht. Guanosintriphosphat, von RAS gebunden, wird weniger effizient zu Guanosindiphosphat inaktiviert, wodurch NRAS länger und effizienter nachgeschaltete Signalmoleküle aktivieren kann. Somit kommt es zu einer abnormalen Signalübertragung mit verstärkter Aktivierung des MAPK- und PI3K-Signalwegs (Maertens et al., 2013; Whittaker et al., 2013).

3.7 Signalwege

3.7.1 ERK/MAPK-Signalweg

Der ERK-Signalweg (extrazelluläre signalregulierte Kinase; englisch: extracellular signal-regulated kinase) ist Teil der Familie der MAPK-Signalwege (mitogenaktivierte Proteinkinase; englisch: mitogen-activated protein kinase) und leitet extrazelluläre Signale intrazellulär an ihr Ziel weiter (siehe Abbildung 5). Diese Kaskade reguliert unter anderem die Zelldifferenzierung und -proliferation. Eine Funktionsstörung bzw. übermäßigen Aktivierung kann schwere Folgen wie neurologische Störungen, Entwicklungsstörungen und Krebs haben (Guo et al., 2020).

Ein extrazelluläres Signal, wie zB. der epidermale Wachstumsfaktor EGF, aktiviert Grb2 (Wachstumsfaktor-Rezeptor-bindendes Protein 2) und dieser reagiert mit SOS (Son of Sevenless). Der Guaninnucleotid austauschfaktor (GEF) SOS aktiviert Ras-GDP (Guanindiphosphat) zu Ras-GTP (Guanintriphosphat). Raf, das eine Serin/Threonin – Proteinkinaseaktivität hat, bindet an das aktivierte Ras und Raf aktiviert wiederum MEK über seine C-terminale katalytische Domäne. Die dualspezifische Kinase MEK hat sowohl eine Tyrosin-, als auch eine Threonin- Regulationsstelle. Diese doppelte Spezifität verbessert den Erkennungs- und Aktivierungsmechanismus für ERK erheblich. ERK ist im inaktiven Zustand im Zytoplasma zu finden. Wenn ERK durch MEK phosphoryliert wird, wird die aktive ERK in den Zellkern transloziert. In weiterer Folge werden verschiedene Transkriptionsfaktoren (z.Bsp.: Protoonkogene c-Fos, c-Jun- cMyc) durch ERK phosphoryliert und somit aktiviert (Guo et al., 2020). Die Folge ist eine Stimulation von Proliferation, Wachstum und Differenzierung der entsprechenden Zellen und Gewebe.

Durch eine Mutation in einem Teil dieses Signalweges wird nicht nur die Entstehung eines Melanoms begünstigt, sondern auch dessen unkontrollierbare Progression. Daher stellt dieser Signalweg ein zentrales Ziel für eine zielgerichtete Therapie von fortgeschrittenen Melanomen dar.

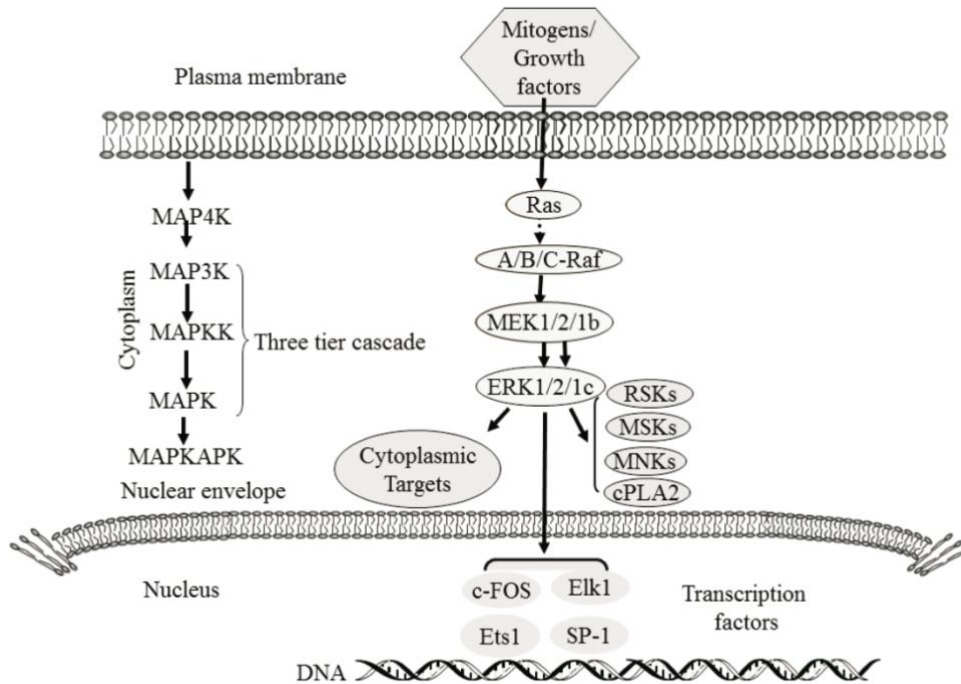


Abbildung 5 - Schematische Darstellung des ERK/MAPK - Signalweg (Guo et al., 2020).

3.8 Therapie

Die Leitlinie sieht in frühen Phasen eines malignen Melanoms eine vollständige chirurgische Entfernung vor, bei der je nach Dicke des Tumors ein Rand von 1-3cm des gesunden Gewebes mitentfernt wird. Ab eines Metastasierungsrisikos von 5% oder einer Tumordicke von 0,8-1mm wird eine Biopsie des Sentinel-Lymphknoten empfohlen. Bei einem positiven Ergebnis wird dieser Lymphknoten entfernt. Bei bereits vorhandenen Metastasen wird je nach Möglichkeit eine chirurgische Entfernung in Betracht gezogen, sowie eine Chemotherapie, eine Therapie mit Immun-Checkpoint-Inhibitoren, eine zielgerichtete Therapie oder eine Strahlentherapie (Lazar et al., 2024). Letzteres wird nach einer Operation verwendet um das Wiederauftreten zu reduzieren oder wenn eine lokale Operation nicht möglich ist. Eine Strahlentherapie alleine wirkt nur begrenzt und wird oft palliativ und zur Linderung der Symptome eingesetzt (Natarelli et al., 2024). Des Weiteren wurden monoklonale Antikörper gegen PD-1, ein Protein, das auf der Oberfläche von Tumorzellen zu finden ist und die T-Zellen hemmt, wie Nivolumab und Pembrolizumab, entwickelt (Lazar et al., 2024).

Außerdem wurden Vakzine aus tumorbezogenen Antigenen und Impfstoffadjuvanten hergestellt (Xu et al., 2024). Ein Forschungsteam aus den USA hat einen Dendritischen Zell-basierten Impfstoff eines rekombinanten Adenovirus, das drei Melanom-Antigene coexprimiert, entwickelt. In einer Studie mit 35 Teilnehmern wurde ein Zusammenhang mit einer positiven Überlebensrate festgestellt (Maurer et al., 2020).

In vielen Fällen liegt eine Mutation im MAPK-Signalweg vor, bei der eine zielgerichtete Therapie mit Hemmung der Mutationen angewendet wird. Diese Therapie ist eine Kombinationstherapie aus einem BRAF- und einem MEK-Inhibitor (Lazar et al., 2024):

- Dabrafenib (BRAF-Inhibitor) + Trametinib (MEK-Inhibitor)
- Vemurafenib (BRAF-Inhibitor) + Cobimetinib (MEK-Inhibitor)
- Encorafenib (BRAF-Inhibitor) + Binimetinib (MEK-Inhibitor)

Der aktuelle Behandlungsstatus sieht eine Kombinationstherapie aus Dabrafenib und Trametinib vor, die zusammen synergetisch wirken (Gouda & Subbiah, 2023). Die Ansprechrate konnte in der Kombinationstherapie auf 70% erhöht werden. Ebenfalls steigt das mediane progressionsfreie Überleben von 7-9 Monaten auf 11-14,5. Außerdem wird die Hauttoxizität in der Kombinationstherapie von Dabrafenib und Trametinib reduziert (Schadendorf et al., 2018).

3.8.1 Dabrafenib

Dabrafenib ist ein BRAF – Inhibitor und wurde 2013 von der Food and Drug Administration (FDA) als Monotherapie für Melanome mit einer BRAF^{V600E} – Mutation zugelassen, welche inoperabel und/oder metastasierend sind. Dieser Wirkstoff inhibiert kompetitiv die ATP-Bindung an der BRAF-Kinase und somit die nachfolgende Signalkaskade (siehe 3.7) (Gouda & Subbiah, 2023). Nebenwirkungen wie leichte Hautreaktionen und Fieber sind eventuelle Begleiterscheinungen einer Therapie mit Dabrafenib, führen jedoch selten zu einem Abbruch (Menzies et al., 2012).

3.8.2 Trametinib

Trametinib ist als Monotherapie für inoperable und/oder metastasierende Melanome mit einer BRAF^{V600E} - oder BRAF^{V600K} – Mutation zugelassen, wenn der Patient zuvor nicht mit BRAF-Inhibitoren behandelt wurde. Dieser MEK-Inhibitor hemmt MEK1 und MEK2 reversibel (Gouda & Subbiah, 2023).

3.8.3 SOS1 – Inhibitor (BAY293)

BAY293 ist ein SOS1-RAS Interaktionsinhibitor und verhindert die selektive Bindung von RAS an die hydrophobe Tasche von SOS1. Durch die Konformationsverschiebung der Bindungstasche kann es zu keiner KRAS-SOS1 Interaktion kommen und die Aktivierung der nachfolgenden Signalwege, inklusive der Tumor Proliferation, sind inhibiert. (Hillig et al., 2019)

3.9 Prolin

In preliminären Experimenten dieser Arbeitsgruppe wurde ersichtlich, dass Prolin einen Einfluss auf Melanomzellen hat (Mayr, 2020; Obereigner, 2025; Wasinger Christine et al., 2018).

Die nicht-essenzielle, zyklische Aminosäure Prolin (siehe Abbildung 6) spielt eine wichtige Rolle bei der Funktion und Struktur von Proteinen. Prolin wird aus der Nahrung gewonnen, de-novo synthetisiert oder durch Katabolismus aus Proteinstrukturen bereitgestellt, wobei ATP und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) gewonnen werden. Die Hauptquelle für diese Aminosäure ist Kollagen (Vettore et al., 2021).

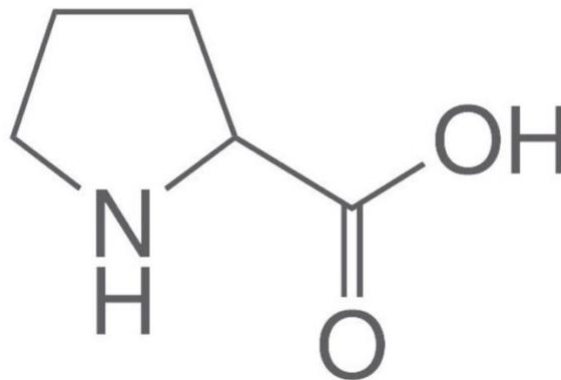


Abbildung 6 - Struktur von Prolin

3.9.1 Prolinbiosynthese

Prolin wird durch mehrere Biosynthesewege synthetisiert. Folgend wird der häufigste Syntheseweg vereinfacht erklärt:

Der Startpunkt der Prolinbiosynthese ist Glutamat. Glutamat wird durch die γ -Glutamylkinase phosphoryliert und somit zu γ -Glutamylphosphat. Danach wird γ -Glutamylphosphat durch die γ -Glutamylphosphatreduktase zu γ -Glutamylsemialdehyd reduziert. Anschließend erfolgt eine spontane Zyklisierung zu Δ^1 -Pyrrolin-5-carboxylat (P5C) und abschließend wird diese Zwischenstufe durch Δ^1 -Pyrrolin-5-carboxylatreduktase zu Prolin reduziert (Fichman et al., 2015).

3.9.2 Funktionen und Aufgaben von Prolin

Neue Erkenntnisse zeigen, dass der Prolinabbau und die Prolinbiosynthese eine wichtige Rolle bei verschiedenen Erkrankungen, durch die Konsequenzen des Prolinstoffwechsels auf

das gesamte Prolinstoffwechselnetzwerk und die Synthese neuer Proteine als Teil pathogener Prozesse, spielen. Besonders deutlich ist das bei der Metastasierung und Proliferation von Krebszellen zu sehen (Vettore et al., 2021).

Bei Melanomzellen wurde festgestellt, dass diese Zellen mehr Prolin de-novo synthetisieren als gesunde Melanozyten. Des Weiteren ist zu erkennen, dass vertikal-wachsende WM793b-Zellen Prolin stärker aufnehmen als die radial-wachsenden WM35-Zellen (Wasinger Christine et al., 2018). Außerdem lässt sich sagen, dass Krebs Nährstoffmängel je nach Mikroumgebung durch den Abbau von Prolin durch die Prolin Dehydrogenase/Prolin Oxidase (PRODH/POX) überstehen kann (Feig et al., 2012). Des Weiteren scheint PRODH/POX in nicht-kleinzelligen Lungenkrebszelllinien (NSCLC) die Progression von Krebs zu steigern. Durch eine Überexpression steigt die Zellproliferationsrate und es erhöht sich *in-vitro* die Invasion und Migration von NSCLC (Y. Liu et al., 2020). Ebenfalls wurde in einem *in-vivo* Versuch mit Brustkrazinomzellen herausgefunden, dass die PRODH/POX-Aktivität erhöht war (Elia et al., 2017).

In Arbeiten, die den Zusammenhang zwischen Prolin und Tumoren betrachten, wurde festgestellt, dass Prolin aus Kollagen synthetisiert und in die Tumorzellen aufgenommen wird. Besonders bei einer Tumorkachexie dient Prolin als Energiequelle und treibt den Tumorstoffwechsel an (Wasinger Christine et al., 2018).

Eine weitere Funktion von Prolin ist es die Redox-Homöostase aufrecht zu erhalten. Prolin wird in den Mitochondrien durch PRRODH/POX oxidiert und dabei werden freie Elektronen auf die mitochondriale Atmungskette übertragen. Dadurch entsteht Adenosintriphosphat (ATP) und reaktive Sauerstoffspezies (ROS). Eine Überproduktion von ROS kann zu Schädigung der Zellen führen. Bei dem Anabolismus von Prolin wird P5C reduziert und dabei wird das Reduktionsmittel NADPH verbraucht, welches die Redoxlage stabilisiert. Prolin kann somit helfen auf veränderten oxidativen Stress zu reagieren (Burke et al., 2020; Vettore et al., 2021).

Abschließend ist zu sagen, dass es im Zusammenhang mit Prolin weitere Erkrankungen gibt. Ein POX-Mangel führt zu einer Hyperprolinämie Typ I und wird mit einer erhöhten Anfälligkeit für Schizophrenie in Zusammenhang gebracht. Im Gegensatz dazu gibt es die Hypoprolinämie, die mit einer Hyperammonämie in Verbindung gebracht wird (Mitsubuchi et al., 2008). Außerdem bestätigte eine Studie, dass Prolin und P5C potenzielle Biomarker für Depressionen sind (Bian et al., 2023).

4. Ziel der Arbeit

Aufgrund vorheriger Arbeiten in der Arbeitsgruppe Hohenegger wurde festgestellt, dass Prolin einen stimulatorischen Effekt auf das Wachstum von Melanomzellen unterschiedlicher Wachstumsphasen hat und dieser Faktor durch die gleichzeitige Gabe von Simvastatin verstärkt werden kann (Wasinger et al., 2018). Basierend auf diesen Erkenntnissen werden im Rahmen dieser Masterarbeit folgende Fragen gestellt und versucht zu beantworten:

1. Gibt es einen konzentrationsabhängigen Effekt bezogen auf den Colony Formation Assay unter Prolinbehandlung?
2. Reduziert der SOS-RAS Inhibitor BAY293 die Koloniebildung im Colony Formation Assay?
3. Unterscheiden sich die Effekte von Prolin und BAY293 in Zellen der verschiedenen Wachstumsphasen des Melanoms?

5. Material und Methoden

5.1 Verwendete Zelllinien

Für die Experimente in der vorliegenden Masterarbeit wurden sowohl metastatische als auch nicht metastatische humane Melanomzellen untersucht. Folgende fünf Zelllinien wurden verwendet:

Die **WM35** Zelllinie weist eine BRAF^{Val600Glu} Mutation auf und ist nicht metastasierend. Die Zellen wurden einer 24-jährigen Frau entnommen und durch das Coriell Institut (WC00060) verteilt.

Die BRAF^{Val600Glu} Mutation lässt sich auch in den **WM278** Zellen finden. Sie sind ebenfalls nicht metastasierend, stammen von einer 62jährigen Frau und wurden durch das Coriell Institut (WC00054) vertrieben.

Die **WM793b** Zellen mit einer BRAF^{Val600Glu} Mutation gehören auch zu den nicht metastasierenden Melanomzellen. Sie wurden einem Menschen unbekanntem Geschlechts und Alters entnommen und vom Coriell Institut (WC00062) verteilt. Diese Zelllinie weist bereits ein vertikales Wachstum auf.

Für die Experimente wurden auch metastasierende Melanomzellen verwendet. Zum einen die **A375** Zelllinie, die eine BRAF^{Val600Glu} Mutation aufweist und von einer 54-jährigen Frau stammt. Das Institut für Krebsforschung der Medizinischen Universität Wien (Prof. Dr. Walter Berger) stellte die Zellen der Arbeitsgruppe zur Verfügung.

Die metastatischen **518a2** Zellen mit einer BRAF^{Val600Glu} Mutation stammen von einem Menschen dessen Alters und Geschlechts uns unbekannt sind und von der Klinik für Strahlentherapien am AKH Wien (Prof. Dr. Edgar Selzer) zur Verfügung gestellt wurde.

5.2 Nährmedien

Für die nicht metastasierenden Zelllinien (WM35, WM278; WM793b) wurde das „DMEM/Ham's F-12 Medium mit L-Glutamine“ der Firma „Capricorn Scientific“ verwendet. Um das Medium den speziellen Bedürfnissen der Melanomzellen anzupassen, wurden 0,7g Glucose, 20mM HEPES hinzugefügt und FBS (Fetal Bovine Serum) auf eine finale Konzentration von 2% und ein Penicillin-Streptomycingemisch auf eine finale Konzentration von 1% ergänzt.

Die metastasierenden Zellen (A375, 518a2) wurden mit dem „DMEM High Glucose with L-Glutamin, without Sodium Pyruvate“ Medium der Firma „biowest“ versorgt. Es wurden

zusätzlich noch 10% FBS (Fetal Bovine Serum), 20mM HEPES und 1% Penicillin-Streptomycin hinzugegeben.

5.3 Substanzen

Substanz	CAS Nummer	Chargennummer	Hersteller	Molekülmasse
BAY 203	2244904-70-7	AOB17686-5	Aobious	448,58 g/mol
Prolin	147-85-3	150717	Sereva	115,13 g/mol
Dansylprolin	-	-	Synthese und Reinigung Konstantin Mayr	-
Agar	24302139	419161/1	Fluka	-

Tabelle 1 - Informationen zu den verwendeten Substanzen.

5.4 Geräte

Fluoreszenz Mikroskop: IX83 (Olympus)

Mikroskop: Nikon Eclipse TS100

Zellzähler: LUNA II Automated Cell Counter (logos biosystem)

Analysewaage: sartorius 1702

Zentrifuge: eppendorf Centrifuge 5810 R

Lamina Air Flow: steril-Polaris

Inkubator: BINDER CB220 CO₂, Inkubator

5.5 Zellkultur

5.5.1 Zellen auftauen

Die gewünschten Zelllinien wurde auf -80°C im Gefrierschrank gelagert, aufgetaut und in Kultur genommen. Je nach Dichte in einen 25cm² oder einen 75cm² Flask und entsprechend 5ml bzw. 10ml Medium (auf 37°C erwärmt) ausgesät. Nach 4 Stunden im Inkubator bei 37°C, 20% O₂, 5% CO₂ und einer Luftfeuchtigkeit von 100%, wurde das Medium vorsichtig

abgesaugt und neues Medium hinzugefügt, sodass die DMSO-Konzentration stark verdünnt wurde.

5.5.2 Zellen splitten

Die Zellen wurden täglich unter dem Mikroskop kontrolliert, die Zelldichte protokolliert und gegebenenfalls ein Mediumwechsel durchgeführt. Sobald die Zellen eine Konfluenz von circa 80% erreichten, wurden die Zellen im Lamina Air Flow gesplittet. Dafür wurde das gesamte Medium entfernt, die Zellen mit Trypsin (25cm² Flask: 1ml; 75cm² Flask: 3ml) versetzt und 2-4 Minuten in den Inkubator gegeben. Danach wurde das Trypsin, welches nun die Zellen beinhaltet, in einen Falcon überführt und der Flask mit PBS gewaschen (25cm² Flask: 5ml; 75cm² Flask: 10ml). Der Falcon wurde zusammen mit einem Gegengewicht in die Zentrifuge gegeben und bei Raumtemperatur mit einer Geschwindigkeit von 1100 Umdrehungen pro Minute für 4 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet in Medium resuspendiert. Für die Weiterzucht wurde die Zellsuspension in einem 75cm² Flask mit 10ml Medium zwischen 0,1ml und 1ml hinzugegeben, je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zelltypen. Abschließend wurden die Flasks wieder in den Inkubator gegeben und die Zellen weiter gezüchtet.

5.5.3 Zellen zählen

Für Experiment wie den Colony Formation Assay oder die Mikroskopie wurde eine genau Anzahl an Zellen benötigt, die mit dem Gerät „LUNA II Automated Cell Counter“ ermittelt wurde. Nach dem Splitten und Resuspendieren wurden 50µl dieser Zellsuspension mit 50µl PBS versetzt. Von dieser Mischung wurden wiederum 50µl mit 50µl Trypanblau vermengt und davon 10µl auf einen Objektträger pipettiert und gezählt. Für die Melanomzellen wurde das Protokoll WM793 Melanoma verwendet (Verdünnungsfaktor 2; minimale Zellgröße 8µm; maximale Zellgröße 40µm; Rundheit 20%; Sensitivität für lebende Zellen 1).

5.5.4 Zellen einfrieren

Zellen, die nicht mehr benötigt wurden, wurden bei -80°C eingefroren, um sie für zukünftige Zwecke wieder aufzutauen. Zuerst wurde das komplette Medium abgesaugt und der Flask mit 10ml PBS gewaschen. Danach wurde, wie beim Zellensplitten, 2ml Trypsin verwendet, um die Zellen abzulösen und anschließend wurde der Flask nochmal mit 10ml PBS gewaschen. Der Falcon mit Trypsin und PBS, die die Zellen beinhalteten, wurde fünf bis zehn Minuten bei 1500 – 2000 Runden pro Minuten und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig dekantiert, das Zellpellet in 1-2ml Medium aufgenommen und resuspendiert. Der Falcon wurde 10-15 Minuten auf Eis heruntergekühlt. Währenddessen wurde pro Röhrchen 1ml Freezing Medium (FM; 0,9ml FBS + 0,1ml DMSO) vorgelegt und im Anschluss wurde die jeweilig passende Menge Zellsuspension hinzupipettiert. Abschließend wurden die befüllten

Röhrchen sofort in der -80°C Gefriertruhe verstaut und wenn möglich zwei Stunden lang nicht bewegt.

5.6 Koloniebildungsexperiment (Colony Formation Assay)

Der Colony Formation Assay wurde in diesem Experiment in sechs 6er-well-Platten durchgeführt, daher beziehen sich folgende Mengenangaben auf die Mengen, die benötigt werden, um sechs 6er-well-Platten zu befüllen.

5.6.1 Vorbereitungen

Für den Colony Formation Assay wurden 0,6% und 1% Agarlösungen benötigt. Dafür wurden 0,6g bzw. 1g Agar in 100ml MQ-Wasser gegeben und in der Mikrowelle so lange erhitzt, bis sich der Agar komplett gelöst hat. Anschließend wurden die Gläser mit der Lösung autoklaviert und bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

5.6.2 Untere Agarschicht

Zuerst wurde das Gefäß mit der 1%igen Agarlösung leicht geöffnet und in der Mikrowelle für zwei bis drei Minuten bei 800W erhitzt. Gleichzeitig wurde das benötigte Medium in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Unter dem Lamina Air Flow wurden zwei 50ml Flacons mit je 15ml Medium und 15ml 1%igen Agarlösung befüllt und vermengt (1:1) und anschließend pro Well 1,5ml dieser Mischung appliziert. Wichtig dabei war es, Luftblasen in der Agarschicht zu vermeiden. Danach wurden die befüllten 6er-Well-Platten 30 Minuten im LAF stehen gelassen, damit der Agar aushärten konnte.

5.6.3 Zellen sammeln

Die erwünschte Zelllinie wurde aus dem Inkubator genommen, wie in 5.5.2 gesplittet und anschließend wie in 5.5.3 gezählt. Um optimale Ergebnisse zu erlangen, wurden zwischen 5000 und 10 000 Zellen pro Well ausgesät.

5.6.4 Obere Agarschicht

Für die obere Schicht wurde die 0,6%ige Agarlösung leicht geöffnet und in der Mikrowelle für ein bis zwei Minuten bei 800W erhitzt. Daraufhin wurden wieder zwei 50ml Falcons befüllt. Dieses Mal wurden wieder insgesamt 30ml 0,6% Agarlösung verwendet, jedoch wurde von den 30ml Medium die benötigte Zellsuspension abgezogen. Ebenfalls wurden wieder 1,5ml dieser Mischung pro Well hinzugegeben. Nach weiteren 30 Minuten Wartezeit, um den Agar aushärten zu lassen, wurden in jedes Well 100µl Medium auf den festen Agar pipettiert.

5.6.5 Behandlungen

Die Behandlung mit Prolin und BAY293 erfolgte immer einen Tag später. Dafür wurden folgende finalen Konzentrationen verwendet:

6er-well-Platte #1:

Kontrolle	0,1mM Prolin	0,3mM Prolin
Kontrolle	0,1mM Prolin	0,3mM Prolin

6er-well-Platte #2:

1mM Prolin	3mM Prolin	10mM Prolin
1mM Prolin	3mM Prolin	10mM Prolin

6er-well-Platte #3:

Kontrolle	0,1µM BAY293	1µM BAY293
Kontrolle	0,1µM BAY293	1µM BAY293

6er-well-Platte #4:

1mM Prolin	1mM Prolin + 0,1µM BAY293	1mM Prolin + 1µM BAY293
1mM Prolin	1mM Prolin + 0,1µM BAY293	1mM Prolin + 1µM BAY293

6er-well-Platte #5:

Kontrolle	0,1µM BAY293	1µM BAY293
Kontrolle	0,1µM BAY293	1µM BAY293

6er-well-Platte #6:

1mM Prolin	1mM Prolin + 0,1µM BAY293	1mM Prolin + 1µM BAY293
1mM Prolin	1mM Prolin + 0,1µM BAY293	1mM Prolin + 1µM BAY293

Es wurde alle 3-5 Tage 200µl neues Medium auf den festen Agar pipettiert, um eventuelles Verdunsten auszugleichen.

5.6.6 Auswertung

Die erste Reihe der Platten wurde nach zwei Wochen ausgewertet und die zweite Reihe nach vier Wochen.

5.6.6.1 Tote Zellen färben

Zuerst wurde das alte Medium weggenommen und anschließend wurden 500µl 4% para-Formaldehyd und 500ml 0,01% „crystal violet“ pro Well hinzugegeben. Danach wurden die Platten eine Stunde inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Lösung abgesaugt und der Agar wurde einmal mit PBS gewaschen.

5.6.6.2 Dokumentation der Koloniebildung

Pro Well wurden unter dem Mikroskop vier Bilder in der 4x Vergrößerung aufgenommen.

5.6.6.3 Auswertung

Diese Bilddateien (.tif) wurden in ImageJ geöffnet und von 8-bit auf 16-bit umgestellt. Danach wurde mit der Hilfe des Befehls „Threshold“ die Zellen markiert und anschließend mit „Make Binary“ und „Convert to Mask“ so geändert, dass der Hintergrund schwarz und die Kolonien weiß waren. Mit dem Befehl „Analyze Particles“ wurden die weißen Bereiche gezählt und die Fläche wurde gemessen. Dabei ist zu beachten, dass die minimale Koloniegröße auf 50µm² eingestellt wurde, um zu vermeiden, dass Einzelzellen als Kolonien gewertet werden. Diese Daten wurden in Excel kopiert und davon wurden jeweils für die Zelllinien die Mittelwerte und Standardabweichungen der Anzahl der Kolonien nach zwei und vier Wochen berechnet. Um die Größe der Kolonien genauer zu untersuchen, wurden die einzelnen Werte der Größe nach geordnet und nummeriert. Mit diesen Werten wurde mithilfe des Programmes SigmaPlot Diagramme erstellt.

5.7 Fluoreszenzmikroskopie

Die Zellen für diese Experimente wurden ebenfalls in Flasks gezüchtet. Sobald die Melanomzellen eine Konfluenz von 80% erreicht hatten, wurden sie wie in 5.5.2 abgelöst und wie in 5.5.3 gezählt. Anschließend wurde sie in „µ-Slide 4 Well ibiTeat“ (Nr.: 80426) von der Firma „ibidi“, welche mit 500µl Medium pro Well gefüllt waren, überführt und in den Inkubator gegeben. Am nächsten Tag wurden die verschiedenen Experimente gemacht.

5.7.1 Lyso- und Mitotracker

Zuerst wurde das Medium auf 250µl reduziert. Danach wurden sowohl 2µl 10µM LysoTracker (im Kanal TRITC sichtbar; Excitation: 530-560nm / Emission: 570-620nm), als auch 2µl 10µM MitoTracker (im Kanal FITC sichtbar; Excitation: 460-490nm / Emission: 510-550nm) in das Medium gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Danach wurden unter

dem Mikroskop Aufnahmen mit einer Vergrößerung von 60x und 100x gemacht (Belichtungszeit von FITC vier Sekunden; von TRITC fünf Sekunden und Phasenkontrast zwischen 100 und 200ms). Abschließend wurden Bilder ohne Überlagerungen mit der Dekonvolution Option in der Software bearbeitet.

5.7.2 Dansylprolin

Zuerst wurde in das Medium 1,7µl Hoechst (im Kanal DAPI sichtbar; Excitation: 350-400nm / Emission: 420-480nm) pipettiert und zehn Minuten in den Inkubator gegeben. Danach wurde das Medium gewechselt und von 500 auf 250µl reduziert. Die Platte mit den Zellen wurde im Mikroskop eingespannt und es wurden die ersten Bilder gemacht (Zeitpunkt 0 Minuten). Anschließend wurden in alle vier Wells jeweils 6,25µl 40µM Dansylprolin (im Kanal FITC sichtbar) in das Medium gegeben. Nach 15, 30 und 45 Minuten wurde von der exakt selben Stelle erneut eine Belichtung gemacht.

Mit dem Programm ImageJ wurden die Intensitäten der verschiedenen Zellen in einem Bildausschnitt über die verschiedenen Zeitpunkte hin gemessen und in jedem Bild der Hintergrund abgezogen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen dieser Intensitäten pro Zelle wurden dann gegen die Inkubationszeit mit dem Programm SigmaPlot in Diagrammen dargestellt.

5.8 Statistische Auswertung

In dieser Arbeit wurde für die statistische Auswertung das Programm SigmaPlot 11.0 verwendet. Es wurden Diagramme erstellt und die verschiedenen Behandlungsgruppen auf Signifikanz getestet. Für multiples Vergleichen wurde der One Way ANOVA Test und anschließend der Holm-Sidak Test angewendet. Ein Ergebnis wurde als signifikant gewertet, wenn $p < 0,05$ war. Um die Signifikanz in den Abbildungen darstellen zu können, wurden Sonderzeichen (* / # / § / \$) verwendet. Die Signifikanz wurde wiederum in drei Abschnitte eingeteilt:

$p < 0,05$ mit einem Symbol (* / # / § / \$)

$p < 0,01$ mit zwei Symbolen (** / ## / §§ / \$\$)

$p < 0,001$ mit drei Symbolen (***) / ### / §§§ / \$\$\$)

Die Erklärung, wann welche Zeichen verwendet wurden, ist jeweils der Abbildungslegende zu entnehmen.

6. Ergebnisse

6.1 Colony Formation Assay

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse des Colony Formation Assay gezeigt, der ein Maß für dreidimensionales Wachstum darstellt. Es sollte also zu erwarten sein, dass unterschiedlich aggressive Melanomzelllinien unterschiedlich große und viele Kolonien ausbilden. Es wurden verschiedenen Konzentrationen Prolin und BAY293 untersucht und die Anzahl und Größe der Kolonien ausgewertet. Weiters wurden Zellen der radialen Wachstumsphase (WM35, WM278), mit Zellen der metastasierenden Phase (A375, 518a2) und der vertikalen Wachstumsphase (WM793b) verglichen.

6.1.1 Behandlung mit Prolin

In einer Vorarbeit hat Konstantin Mayr im Labor von Dr. Hohenegger gezeigt, dass die Aminosäure Prolin einen proliferativen Effekt auf bestimmte Melanomzellen hat (Mayr, 2020). Um diese Effekte weiter zu untersuchen, wurde Prolin in verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen hinzugegeben.

In Abbildung 7 ist eine Mikroskopieaufnahme vom Colony Formation Assay der Kontrollgruppe der 518a2 Zelllinie nach zwei Wochen zu sehen. Diese Bilder wurden anschließend mit ImageJ ausgewertet.

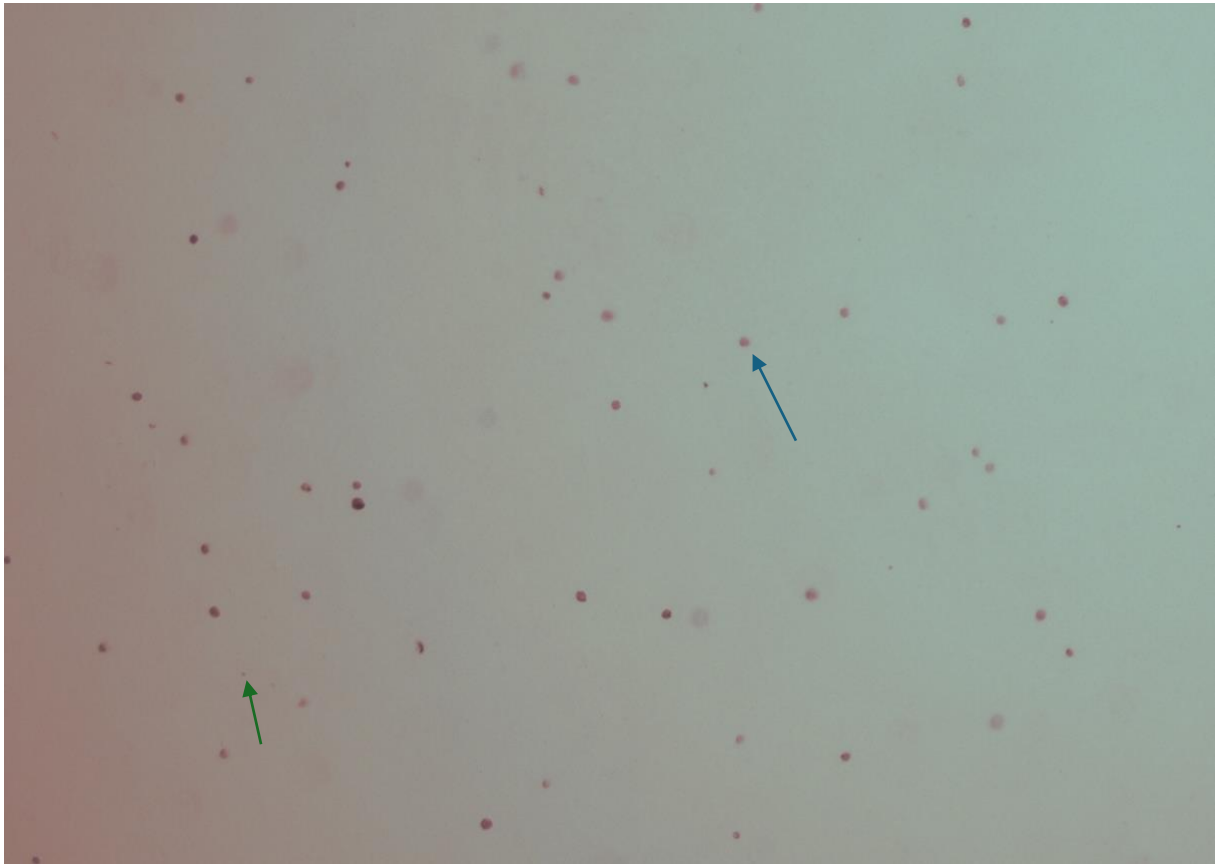


Abbildung 7 - Phasenkontrastaufnahme der Kolonien der 518a2 Zellen in vierfacher Vergrößerung.

Der blaue Pfeil zeigt auf eine Kolonie und der grüne Pfeil auf eine Einzelzelle nach zwei Wochen Wachstum. Je größer ein Punkt ist, desto mehr Zellen bilden diese Kolonie. Die Zellen wurden nicht behandelt (Kontrollgruppe) und zwei Wochen lang inkubiert.

Nachfolgend sind die Ergebnisse nach den einzelnen Zelllinien geordnet.

6.1.1.1 WM35 Zelllinie

In Abbildung 8 sieht man, dass Prolin auf die WM35 Zellen keinen konzentrationsabhängigen Effekt bezüglich der Anzahl der Kolonien hat. Sowohl die Kontrolle als auch die Prolinbehandlungen (0,1mM; 0,3mM; 1mM; 3mM und 10mM) unterscheiden sich weder nach zwei noch nach vier Wochen signifikant. Im Gegenteil, die Anzahl der Kolonien war in allen Proben nach vier Wochen geringer als nach zwei Wochen.

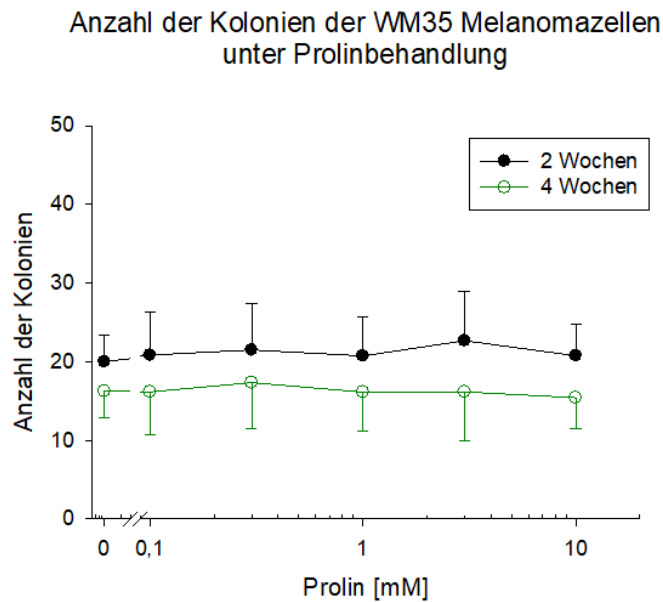


Abbildung 8 – Konzentrationsabhängiger Effekt von Prolin auf die Koloniebildung von WM35 Zellen.

Die WM35 Melanomzellen wurden in 6-Well-Platten mit einer Dichte von 10.000 Zellen pro Well ausplattiert und in Abwesenheit und Anwesenheit von steigenden Konzentrationen von Prolin inkubiert. Nach zwei bzw. vier Wochen wurden die Kolonien mit „Crystal violett“ gefärbt und anschließend mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Kolonien unter dem Mikroskop bei vierfacher Vergrößerung fotografiert und die Bilder in ImageJ auf die Anzahl der vorhandenen Kolonien ausgewertet. Das Diagramm wurde mit SigmaPlot erstellt. Die Symbole und Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung von insgesamt 12-36 Aufnahmen. Eine signifikante Veränderung der Prolinbehandlung gegenüber der Kontrolle konnte nicht erhoben werden.

Nachdem sich die Anzahl der Kolonien der WM35 Zellen unter verschiedenen Prolinkonzentrationen nicht geändert hat, wurde die Fläche der Kolonien genauer analysiert (siehe Abbildung 9) und halblogarithmisch dargestellt. Die so erhaltene sigmoidale Kurve wurde dann ab einer Koloniefäche von $50\mu\text{m}^2$ in drei Kategorien eingeteilt. Koloniefächen zwischen $50\mu\text{m}^2$ - $200\mu\text{m}^2$, $200\mu\text{m}^2$ - $400\mu\text{m}^2$ und größer als $400\mu\text{m}^2$ wurden willkürlich festgelegt und die Anzahl der Kolonien in diesen Kategorien zusätzlich ausgewertet. In Abbildung 9B und 9D sieht man die Schwellwerte als Linie eingezeichnet.

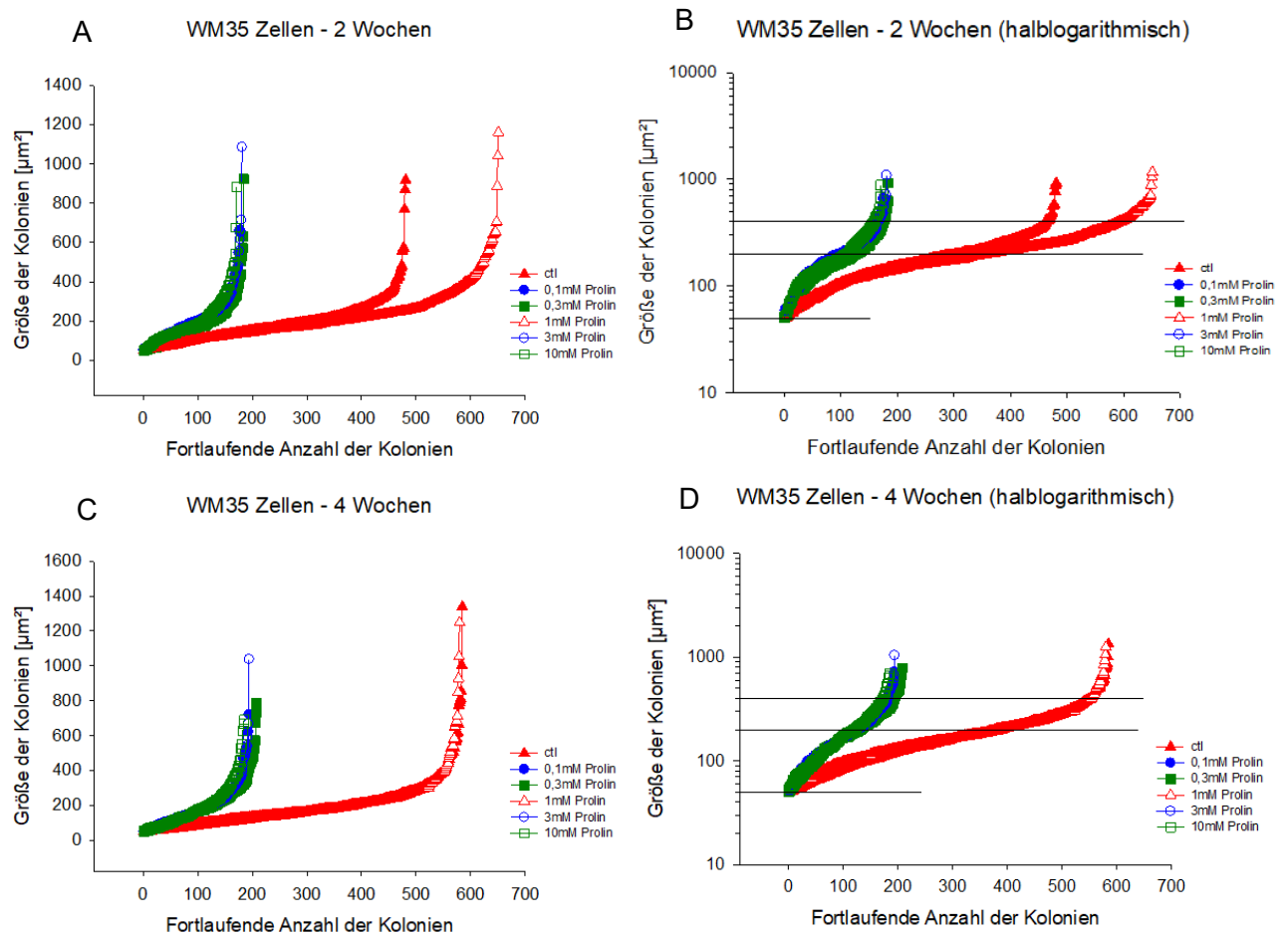


Abbildung 9 – Verteilung der Koloniefächen von WM35 Zellen in Abhängigkeit von der Prolinkonzentration.

Die Zellen wurden gleich behandelt, wie in Abbildung 8 beschrieben. Die Auswertung der Koloniebilder mit ImageJ liefert auch die Fläche der Kolonien, die in weiterer Folge der Größe nach (A-D) sortiert und gezählt wurden. Von der Kontrollgruppe und 1mM Prolin-Gruppe wurden mehrere Wells und somit auch mehr Bilder ausgewertet. Dementsprechend gibt es für diese Behandlungen insgesamt mehr Kolonien. In A wurde die Größe der Kolonien nach 2 Wochen linear dargestellt, in B halblogarithmisch. Die Schwellenwerte der im Text beschriebenen Kategorien sind in B und D dargestellt. In C und D die Werte der vier Wochen Inkubation dargestellt.

Da die Diagramme aus Abbildung 9 nicht verglichen werden können, weil die Anzahl der Kolonien in jeder Gruppe unterschiedlich ist, wurden die absoluten Ergebnisse in relative umgerechnet und in Prozent der jeweiligen Behandlungsgruppe dargestellt (siehe Tabelle 2). In Tabelle 2 sieht man, dass nach zwei Wochen der Anteil ab 400µm² großen Kolonien in den Gruppen mit 1mM, 3mM und 10mM Prolin doppelt so groß im Vergleich zur Kontrollgruppe bzw. der 0,1mM und 0,3mM Prolin Gruppe ist. Nach vier Wochen kann dieser Effekt nicht mehr erkannt werden. Auch sind die restlichen Werte sehr ähnlich und deshalb lässt sich keine weiter Aussage zur Größenverteilung der Kolonien in WM35 Zellen treffen.

WM35	2 Wochen			4 Wochen		
	< 200	$200 \leq x < 400$	≥ 400	< 200	$200 \leq x < 400$	≥ 400
Kontrolle	64,66	31,39	3,95	66,67	27,52	5,81
0,1mM Prolin	68,36	27,68	3,95	65,46	27,84	6,70
0,3mM Prolin	68,48	27,17	4,35	62,98	29,81	7,21
1mM Prolin	54,99	36,41	8,60	65,17	30,17	4,66
3mM Prolin	54,14	37,57	8,29	62,89	30,93	6,19
10mM Prolin	64,33	28,07	7,60	64,32	29,19	6,49

Tabelle 2 – Prozentuelle Verteilung der Flächen der Kolonien von WM35 Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung.

Die Fläche der Kolonien wurde auf die Anzahl der Kolonien in den Kategorien mit den Schwellenwerte- $50\mu\text{m}^2$ - $200\mu\text{m}^2$, $200\mu\text{m}^2$ - $400\mu\text{m}^2$ und größer gleich $400\mu\text{m}^2$ normalisiert und als Prozent dargestellt.

6.1.1.2 WM278 Zelllinie

In WM278 Melanomzellen ist ebenfalls kein konzentrationsabhängiger Effekt von Prolin bezüglich der Anzahl der Kolonien zu erkennen (siehe Abbildung 10). Die Werte nach zwei und vier Wochen Behandlung sind fast deckungsgleich.

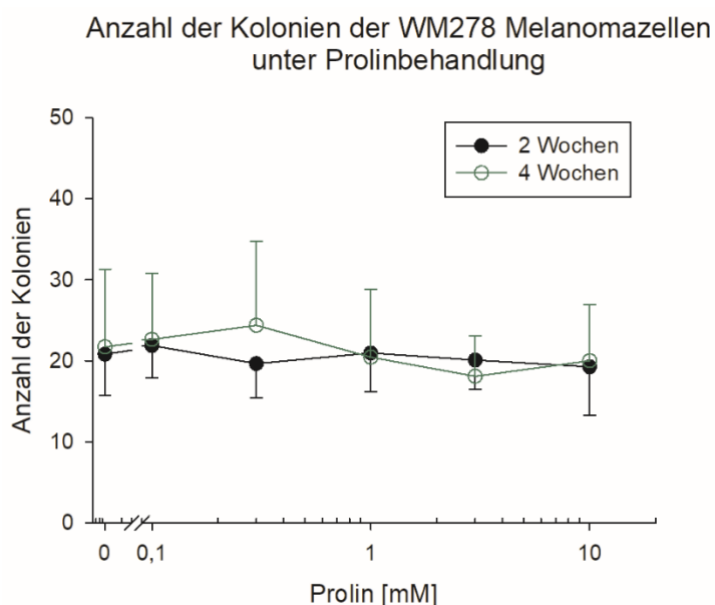


Abbildung 10 – Konzentrationsabhängiger Effekt von Prolin auf die Koloniebildung von WM278 Zellen (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 8).

In weiterer Folge wurde die Fläche der Kolonien von WM278 Zellen analog zu der Zelllinie WM35 untersucht (siehe Abbildung 11).

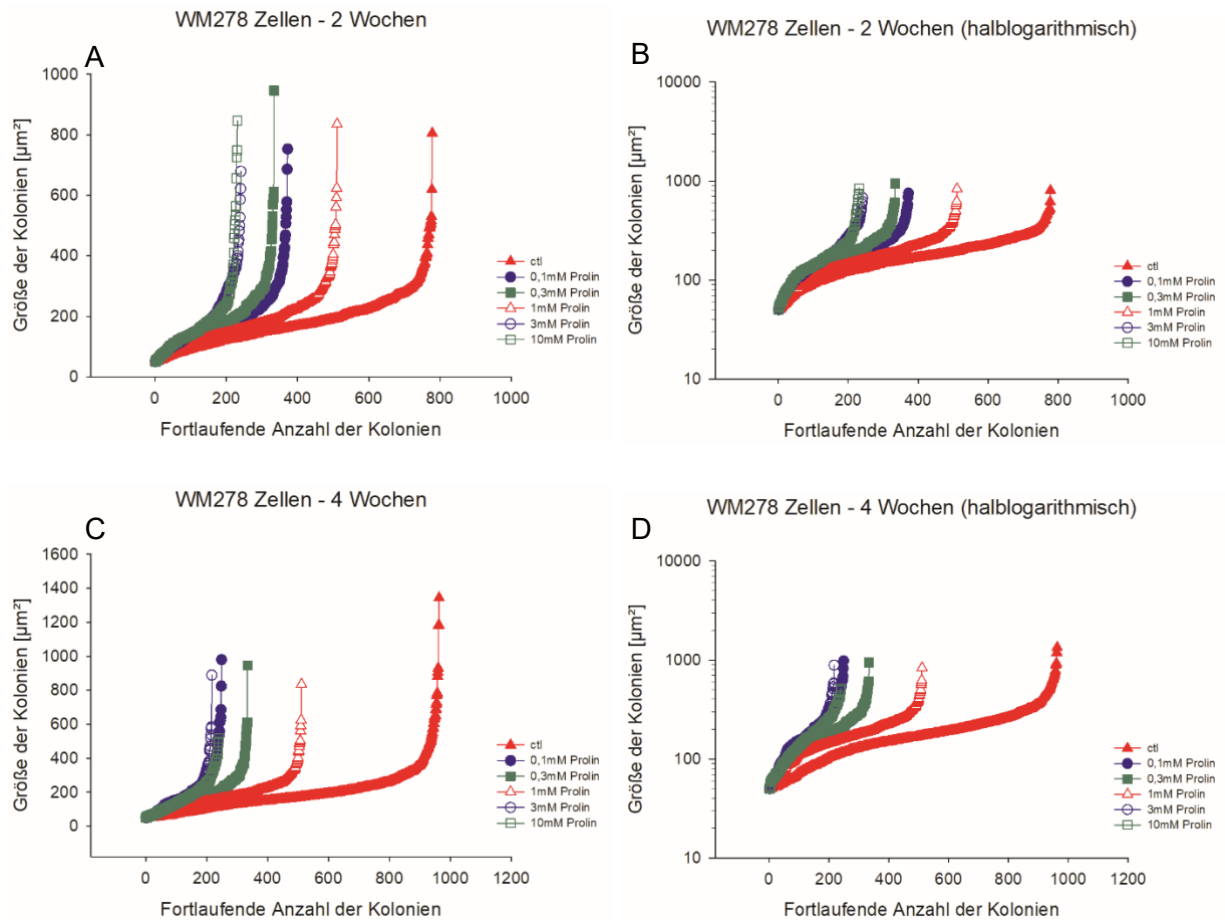


Abbildung 11 - Verteilung der Koloniefächen von WM278 Zellen in Abhängigkeit von der Prolinkonzentration. (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 9).

Beim Betrachten der prozentualen Größenaufteilung (siehe Tabelle 3) ist zu erkennen, dass in allen Konzentrationsgruppen circa zwei Drittel der Kolonien kleiner als $200\mu\text{m}^2$ sind. Wie schon bei den WM35 Zellen zeigt sich, dass die Behandlung mit 3mM und 10mM Prolin nach zwei Wochen den Anteil der Kolonien mit der größten Fläche ab $400\mu\text{m}^2$ gegenüber der Kontrolle verdoppelt hat, was darauf schließen könnte, dass die steigende Prolinkonzentration die Größe der Kolonien beeinflusst. Nach vier Wochen ist dieser Effekt nicht mehr zu sehen und im Vergleich zu 0,1µM Prolin und der Kontrollgruppe sogar gesunken.

WM278	2 Wochen			4 Wochen		
	< 200	$200 \leq x < 400$	≥ 400	< 200	$200 \leq x < 400$	≥ 400
Kontrolle	67,22	30,59	2,19	65,84	28,76	5,40
0,1mM Prolin	70,70	26,34	2,96	59,84	32,93	7,23
0,3mM Prolin	67,66	29,04	3,29	72,82	23,08	4,10
1mM Prolin	69,08	28,57	2,35	71,87	24,77	3,36
3mM Prolin	67,63	28,22	4,15	70,97	24,88	4,15
10mM Prolin	74,03	21,21	4,76	68,75	27,92	3,33

Tabelle 3 - Prozentuelle Verteilung der Flächen der Kolonien von WM278 Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Tabelle 2).

6.1.1.3 WM793b Zelllinie

Die Kolonieanzahl der WM793b Zellen (siehe Abbildung 12) ändert sich nicht durch die Zugabe steigender Konzentrationen von Prolin, weder nach einer Expositionszeit von zwei oder vier Wochen. Lediglich die 0,1mM Prolin Behandlung zeigt im Vergleich zur Kontrolle nach zwei Wochen einen signifikanten Abfall. Danach steigt die Anzahl wieder an, jedoch nicht mehr signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Werte nach vier Wochen bleiben, bis auf einen minimalen Ausreißer bei 3mM Prolin, fast exakt gleich.

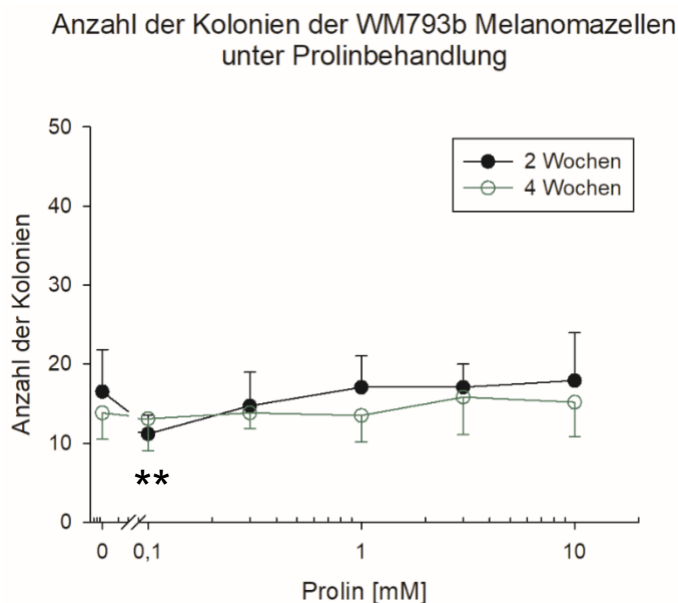


Abbildung 12 – Konzentrationsabhängiger Effekt von Prolin auf die Koloniebildung von WM793b Zellen (Vorgehensweise siehe Legende von Abbildung 8).

Der Wert nach zwei Wochen Inkubationszeit bei einer Behandlung von 0,1mM Prolin weist eine signifikante Reduktion ($p=0,002$; **) der Kolonienanzahl auf. Dadurch, dass bei den Werten danach jedoch keine signifikanten Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen sind, wird hier von einem Ausreißer ausgegangen.

In weiterer Folge wurde bei der Zelllinie WM793b die Größen der Kolonien untersucht (siehe Abbildung 13).

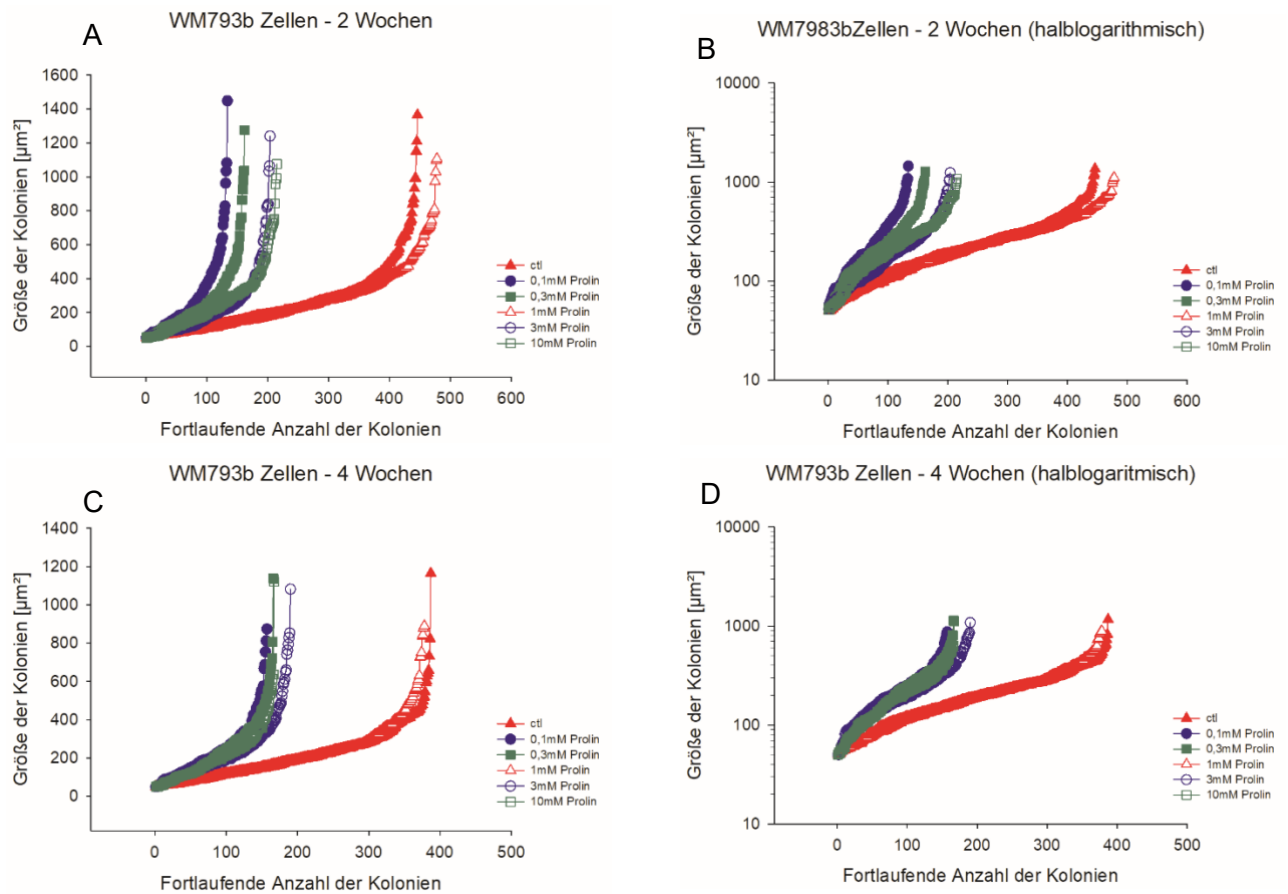


Abbildung 13 - Verteilung der Flächen der Kolonien von WM793b Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 9).

Die Kolonien der WM793b Zelllinie sind im Vergleich zu den radial wachsenden Zelllinien (WM35 und WM278) deutlich größer. Die Zunahme der Kolonien ab $400\mu\text{m}^2$ korreliert mit einer Abnahme bei der kleinen Kategorie der Kolonien ($50\text{-}200\mu\text{m}^2$). Eine Konzentrationsabhängigkeit der Koloniengröße konnte für Prolin nicht gezeigt werden. Dennoch ist der Trend zu größeren Kolonien mit der Beobachtung kompatibel, dass WM793b Melanomzellen in ihrem Wachstumsverhalten bezüglich Migration und Invasion zwischen den metastasierenden und nichtmetastasierenden Melanomzellen anzusiedeln sind.

WM793b	2 Wochen			4 Wochen		
	< 200	$200 \leq x < 400$	≥ 400	< 200	$200 \leq x < 400$	≥ 400
Kontrolle	50,67	32,74	16,59	55,30	34,88	9,82
0,1mM Prolin	50,75	27,61	21,64	48,41	38,85	12,74
0,3mM Prolin	48,77	33,33	17,90	49,40	37,35	13,25
1mM Prolin	45,61	36,61	17,78	54,23	34,66	11,11
3mM Prolin	58,82	28,43	12,75	56,32	32,63	11,05
10mM Prolin	46,98	37,21	15,81	55,69	35,33	8,98

Tabelle 4 – Prozentuelle Größenverteilung der WM793b Zellen nach zwei und vier Wochen Inkubation (Vorgehensweise siehe Legende zu Tabelle 2).

6.1.1.4 A375 Zelllinie

Die A375 Zellen sind eine metastasierende Melanomzelllinie. Die Anzahl der Kolonien sind nach zwei und vier Wochen nahezu ident (siehe Abbildung 14). Lediglich zeigt diesmal nach vier Wochen die 0,1mM Prolinbehandlung eine signifikante Reduktion der Kolonien verglichen mit der Kontrollgruppe.

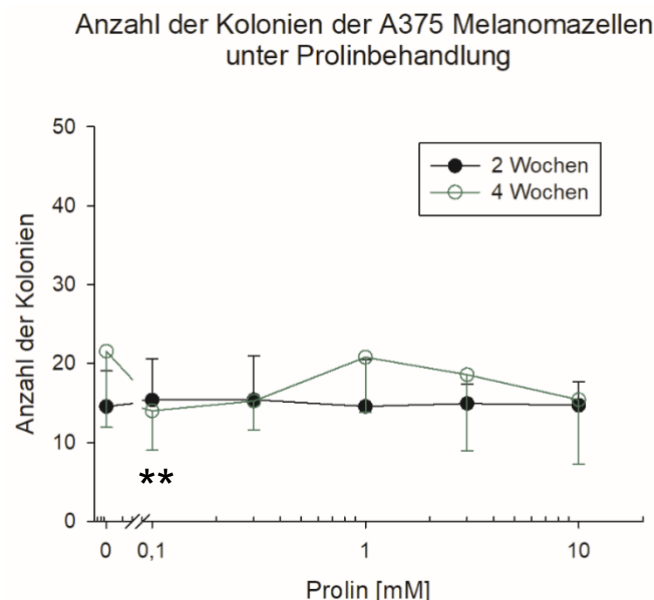


Abbildung 14 - Konzentrationsabhängiger Effekt von Prolin auf die Koloniebildung von A375 Zellen (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 8).

Bei einer Behandlung von 0,1mM Prolin ist nach 4 Wochen eine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe zu erkennen ($p=0,003$; ***).

In weiterer Folge wurde auch bei dieser Zelllinie die Größenverteilung der Kolonien genauer untersucht (siehe Abbildung 15).

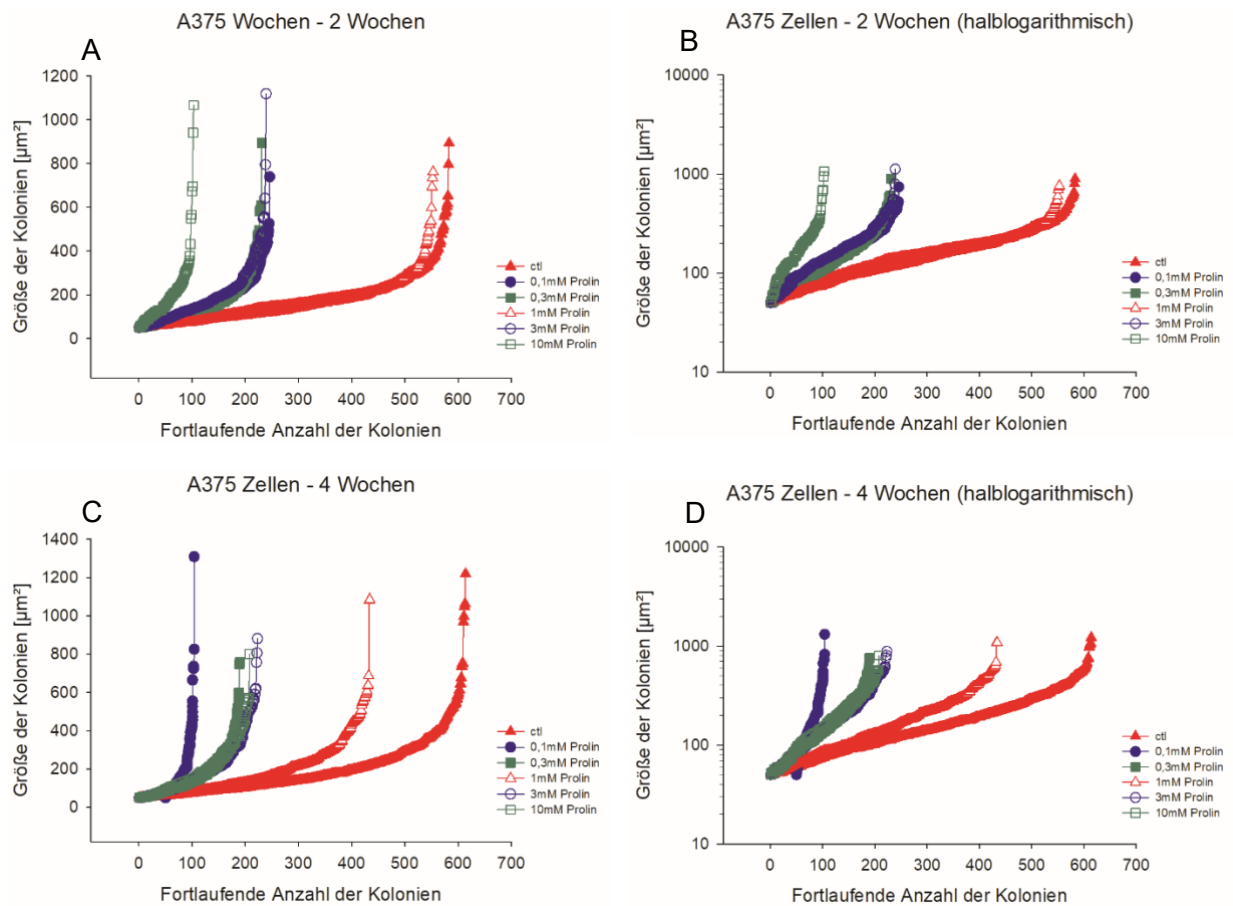


Abbildung 15 - Verteilung der Koloniefächen von A375 Zellen in Abhängigkeit von der Prolinkonzentration (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 9).

Beim Gegenüberstellen der Flächenverteilungen der zweiten und vierten Woche wird ersichtlich, dass die ab $400\mu\text{m}^2$ großen Kolonien über die Zeit zunehmen. Ein konzentrationsabhängiger Effekt der Prolinbehandlung lässt sich nicht erkennen, weshalb sich keine weiteren Aussagen treffen lassen.

A375	2 Wochen			4 Wochen		
	< 200	$200 \leq x < 400$	≥ 400	< 200	$200 \leq x < 400$	≥ 400
Kontrolle	70,15	25,73	4,12	66,61	25,08	8,31
0,1mM Prolin	72,76	22,76	4,47	68,47	22,17	9,39
0,3mM Prolin	76,62	17,32	6,06	66,84	26,84	6,32
1mM Prolin	77,22	19,89	2,89	65,21	25,35	9,45
3mM Prolin	66,11	25,52	8,37	64,13	23,77	12,11
10mM Prolin	61,17	32,04	6,80	65,38	25,96	8,65

Tabelle 5 - Prozentuelle Verteilung der Flächen der Kolonien von A375 Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Tabelle 2).

6.1.1.5 518a2 Zelllinie

Die metastasierende Zelllinie 518a2 zeigt einen klaren Anstieg der Anzahl der Kolonien durch steigende Prolinkonzentrationen (siehe Abbildung 16). Im Vergleich zu den anderen Zelllinien hat diese Zelllinie die meisten Kolonien. Nach zwei Wochen ist ein Anstieg von 0,1mM Prolin bis 3mM Prolin zu sehen. Der Wert der Behandlung mit 10mM Prolin fällt allerdings unter die Anzahl der Kontrollgruppe ab. Nach vier Wochen Behandlung ist die Anzahl der Kolonien bei 0,1- 10mM Prolin gegenüber der Kontrolle erhöht, aber ein konzentrationsabhängiger Anstieg ist nicht zu erkennen. Bei der Behandlung mit 10mM Prolin sinkt auch hier der Wert wieder leicht ab.

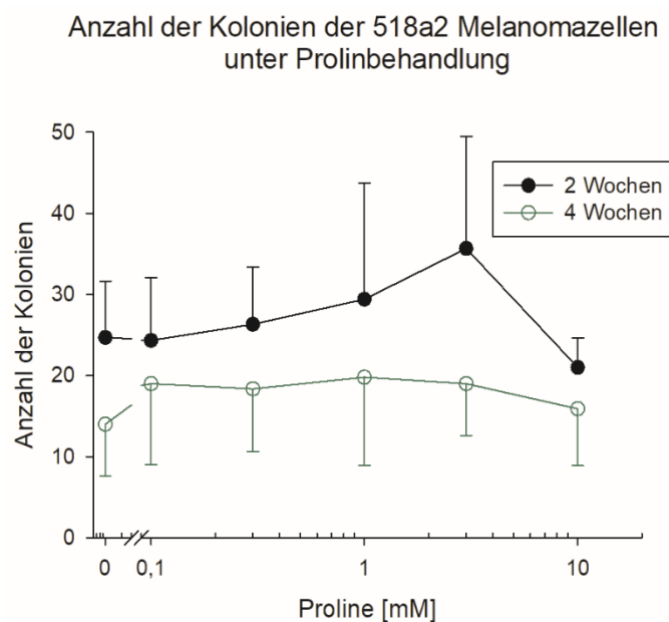


Abbildung 16 – Konzentrationsabhängiger Effekt von Prolin auf die Koloniebildung von 518a2 Zellen (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 8).

Wie bei allen anderen Zelllinien konnte die Anzahl der Kolonien durch Prolin nicht signifikant im Sinne einer Konzentrationsabhängigkeit verändert werden. Deshalb wurde auch hier die Größe der Kolonien genauer betrachtet (siehe Abbildung 17).

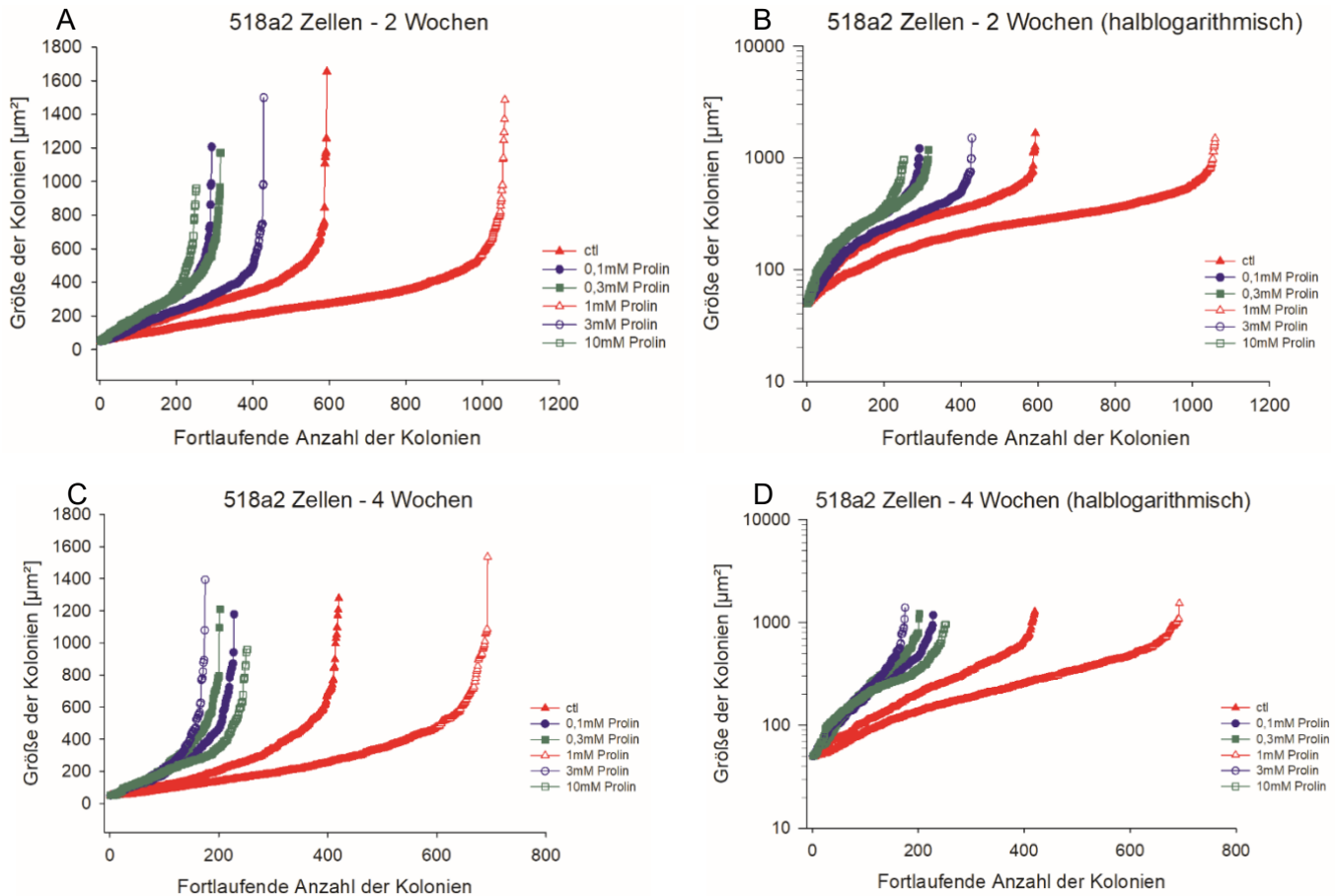


Abbildung 17 - Verteilung der Koloniefächen von 518a2 Zellen in Abhängigkeit von der Prolinkonzentration (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 9).

In Tabelle 6 wird klar ersichtlich, dass die 518a2 Zellen die meisten großen Kolonien bildet. Der Anteil der $\geq 400\mu\text{m}^2$ großen Kolonien sinkt von der Kontrollgruppe auf 0,1mM Prolin ab und steigt bei 0,3mM Prolin wieder an. Anschließend sinken sie kontinuierlich bis zur Behandlung mit 10mM Prolin ab. Das ist sowohl bei Woche zwei als auch bei Woche vier zu erkennen. Nach vier Wochen steigt dieser prozentuelle Anteil verglichen mit den Werten von zwei Wochen an.

518a2	2 Wochen			4 Wochen		
	< 200	$200 \leq x < 400$	≥ 400	< 200	$200 \leq x < 400$	≥ 400
Kontrolle	31,87	46,04	22,09	46,67	30,48	22,86
0,1mM Prolin	36,64	46,58	16,78	46,05	33,77	20,18
0,3mM Prolin	33,65	42,54	23,81	45,54	31,68	22,77
1mM Prolin	36,17	45,14	18,41	46,18	32,18	21,65
3mM Prolin	37,38	46,96	15,65	47,37	33,16	19,47
10mM Prolin	40,08	45,24	14,68	53,14	30,86	16,00

Tabelle 6 - Prozentuelle Verteilung der Flächen der Kolonien von 518a2 Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Tabelle 2).

Da sowohl die Anzahl als auch die Größe der Kolonien bei keiner Zelllinie so groß ist wie bei der 518a2 Zelllinie, haben diese metastasierenden Zellen den höchsten Drang dazu Kolonien zu bilden. Dieser Umstand wird dadurch unterstützt, dass der Anteil an kleinen Kolonien (50-200µm²) konzentrationsabhängig nach zwei und vier Wochen Prolinbehandlung steigt.

6.1.2 Behandlung mit BAY293 und BAY293 kombiniert mit Prolin

BAY293 ist ein Wirkstoff der die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs auf Höhe der SOS1/RAS Interaktion inhibiert. Dieser Signalweg ist wesentlich für die Proliferation verantwortlich und könnte somit die Anzahl bzw. Größe der Kolonien reduzieren. Der Wirkstoff wurde in den Konzentrationen 0,1µM und 1µM getestet, die in Voruntersuchungen durch andere Diplomanden antiproliferative Eigenschaften bei humanen Melanomzellen gezeigt haben. Ebenfalls wurden die Kombination mit 1mM Prolin untersucht.

In Abbildung 18 ist eine Aufnahme unter dem Mikroskop zu sehen, die den Colony Formation Assay der 518a2 Zelllinien unter der Behandlung von 1µM BAY293 nach zwei Wochen zeigt.



Abbildung 18 - Aufnahme der Kolonien der 518a2 Zellen in vierfacher Vergrößerung.

In dieser Abbildung zeigt der rote Pfeil auf eine Kolonie und der schwarze Pfeil zeigt auf eine Kolonie, die nicht in der Schärfeebene liegt. Diese Aufnahme zeigt die Zellen der Linie 518a2 nach zwei Wochen Inkubationszeit bei einer Behandlung mit 1µM BAY293.

Nachfolgend sind die Ergebnisse nach den einzelnen Zelllinien geordnet.

6.1.2.1 WM35 Zelllinie

In Abbildung 19 ist zu sehen, dass nach zwei Wochen die Behandlung mit 1µM BAY293 eine signifikante Reduktion der Anzahl der Kolonien verglichen mit der Kontrollgruppe ergibt. Bei der Verwendung von 1µM BAY293 + 1mM Prolin ist das Gleiche zu erkennen. Untereinander haben die zwei Gruppen sowohl in der Kontrollgruppe als auch bei 0,1µM und 1µM BAY293 gleiche Daten. Dies zeigt erneut das Ergebnis von 6.1.1.1 auf, wo es keinen erkennbaren konzentrationsabhängigen Prolineffekt gegeben hat. Nach weiteren zwei Wochen ist ebenfalls zu erkennen, dass 1µM BAY293 kombiniert mit 1mM Prolin einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe, die in diesem Fall mit 1mM Prolin behandelt wurde, ergibt. Bei der reinen 1µM BAY293-Behandlung ist eine signifikante Reduktion im Vergleich zu der 0,1µM BAY293-Behandlung zu erkennen. Nach vier Wochen ist zu sehen, dass die Zellen, die zusätzlich mit

1mM Prolin behandelt wurden, die Kolonieanzahl stärker reduzieren. Außerdem ist zu erkennen, dass die Reduktion nach vier Wochen minimal stärker ist.

Anzahl der Kolonien der WM35 Melanomzellen - behandelt mit BAY293 und BAY293 kombiniert mit 1mM Prolin

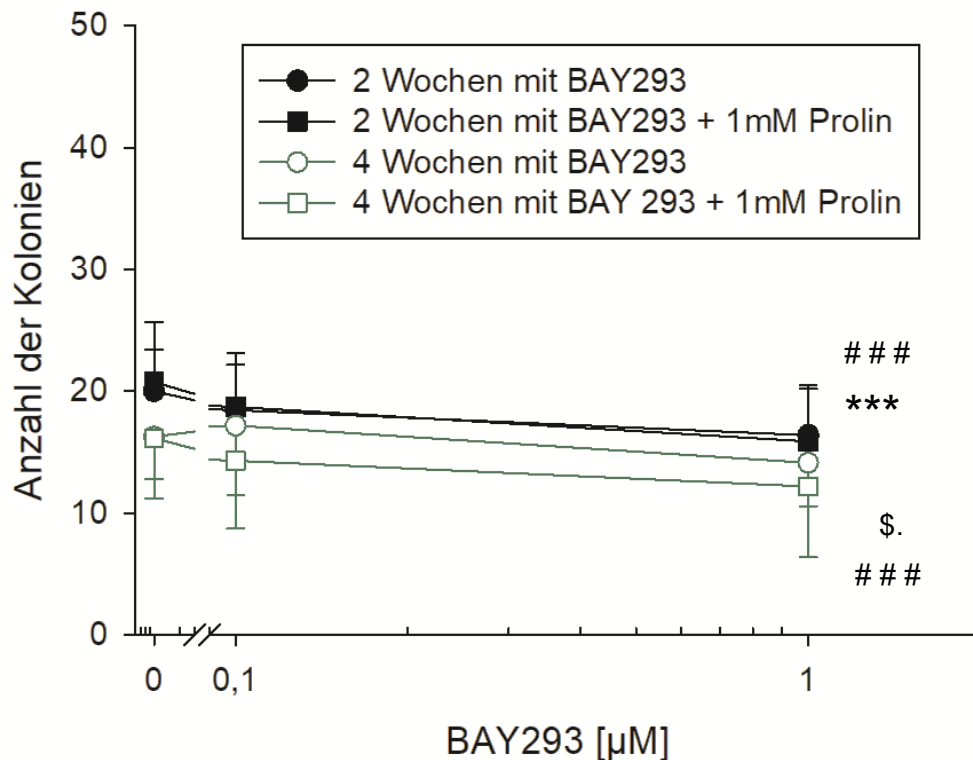


Abbildung 19 - Konzentrationsabhängiger Effekt von BAY293 und BAY293 kombiniert mit 1mM Prolin auf die Koloniebildung der WM35 Zellen.

Die WM35 Melanomzellen wurden gleich wie in Abbildung 8 beschrieben ausplattiert, behandelt und ausgewertet. Die Symbole und Fehlerbalken repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung von insgesamt 12-24 ausgewerteten Bildern. Die Signifikanz wurde wie folgt gekennzeichnet: BAY293 gegenüber der Kontrolle (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$), BAY293 + 1mM Prolin gegenüber der Kontrolle (#: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$), 1μM BAY293 gegenüber 0,1μM BAY293 (\$: $p < 0,05$; \$\$: $p < 0,01$; \$\$\$: $p < 0,001$).

Auch in diesem Fall wurde die Größenverteilung genauer untersucht. Es wurde mit den gleichen Schwellenwerten gearbeitet, die in Abbildung 9 erklärt wurden (zwischen $50\mu\text{m}^2$ und $200\mu\text{m}^2$, zwischen $200\mu\text{m}^2$ und $400\mu\text{m}^2$ und $\geq 400\mu\text{m}^2$).

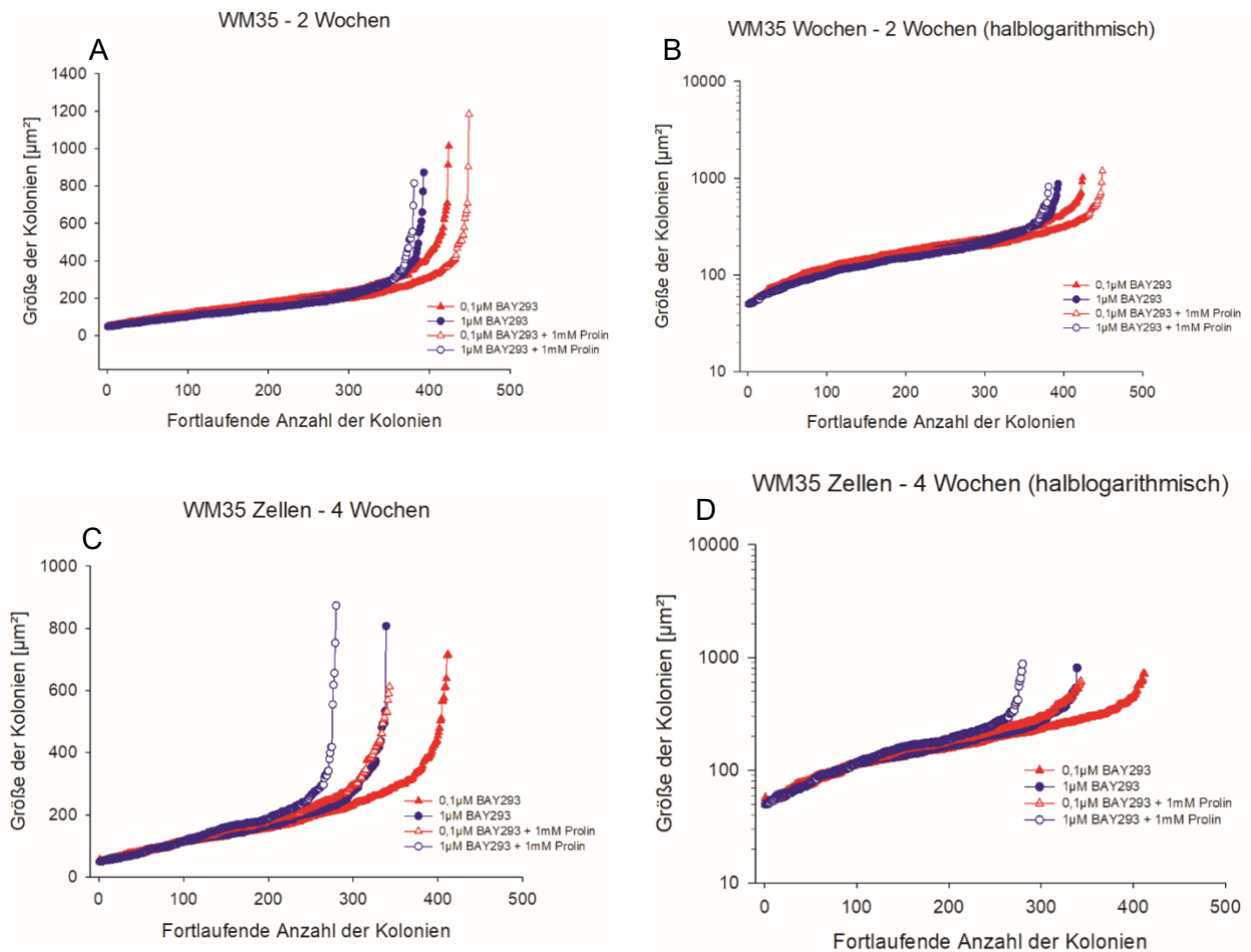


Abbildung 20 – Verteilung der Koloniefäche von WM35 Zellen in Abhängigkeit von der BAY293- und Prolinkonzentration (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 9).

Abbildung 21 zeigt den prozentualen Anteil der Kolonien, die größer gleich $400\mu\text{m}^2$ sind. Es ist zu erkennen, dass alle Gruppen eine Reduktion des Anteils der großen Kolonien vorweisen können, außer die zwei-Wochen-Gruppe, die nur mit BAY293 behandelt wurde. Hier ist der Kontrollwert circa gleich wie der $1\mu\text{M}$ BAY293-Wert. Es könnte sich jedoch um einen Ausreißer handeln, da der $0,1\mu\text{M}$ BAY293-Wert fast doppelt so groß ist. Der erwartete Prolineffekt ist auch hier nicht erkennbar (abgesehen von dem Ausreißer).

Prozentueller Anteil der großen Kolonien der Zelllinie WM35 ab $400\mu\text{m}^2$

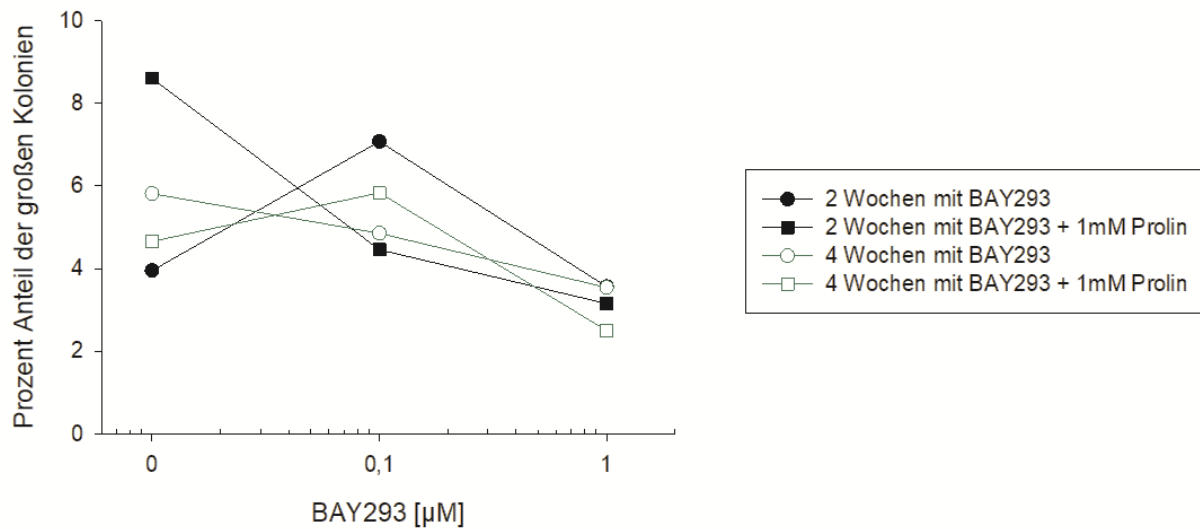


Abbildung 21 – Prozentueller Anteil der WM35 Zelllinie ab $400\mu\text{m}^2$ mit BAY293-Behandlung.

Diese Werte wurden auf die Gesamtzahl der Kolonien relativiert und als Prozentanteil in Tabelle 7 dargestellt. Anschließend wurden diese Zahlen mit dem Programm SigmaPlot in Diagramme umgewandelt.

WM35	2 Wochen			4 Wochen		
	< 200	$200 \leq x < 400$	≥ 400	< 200	$200 \leq x < 400$	≥ 400
Kontrolle	64,66	31,39	3,95	66,67	27,52	5,81
0,1 μM BAY 293	56,37	36,56	7,07	62,38	32,77	4,85
1 μM BAY 293	67,94	28,50	3,56	70,21	26,25	3,54
1mM Prolin	54,99	36,41	8,60	65,17	30,17	4,66
0,1 μM BAY 293 + 1mM Prolin	67,93	27,62	4,45	65,89	28,28	5,83
1 μM BAY 293 + 1mM Prolin	75,85	21,00	3,15	73,93	23,57	2,50

Tabelle 7 – Prozentuelle Verteilung der Fläche der Kolonien von WM35 Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Tabelle 2).

6.1.2.2 WM278 Zelllinie

Bei dem Diagramm der WM278 Zellen ist gleich wie bei den WM35 Zellen kein konzentrationsabhängiger Prolineffekt zu erkennen. Nach zwei Wochen zeigt die Behandlungsgruppe 1 μM BAY293 plus 1mM Prolin eine signifikante Verringerung der Koloniezahl gegenüber der Kontrollgruppe 1mM Prolin. Vier Wochen nach der Behandlung zeigt auch die Gruppe mit 0,1 μM BAY293 eine Veränderung im Vergleich zur Kontrollgruppe auf. Bei der Erhöhung der BAY293-Konzentration auf 1 μM steigt diese Signifikanz noch weiter und auch in der Kombination mit 1mM Prolin ist ein wesentlicher Unterschied zu reinem 1mM Prolin zu erkennen.

Anzahl der Kolonien der WM278 Melanomazellen - behandelt mit BAY293 und BAY293 kombiniert mit 1mM Prolin

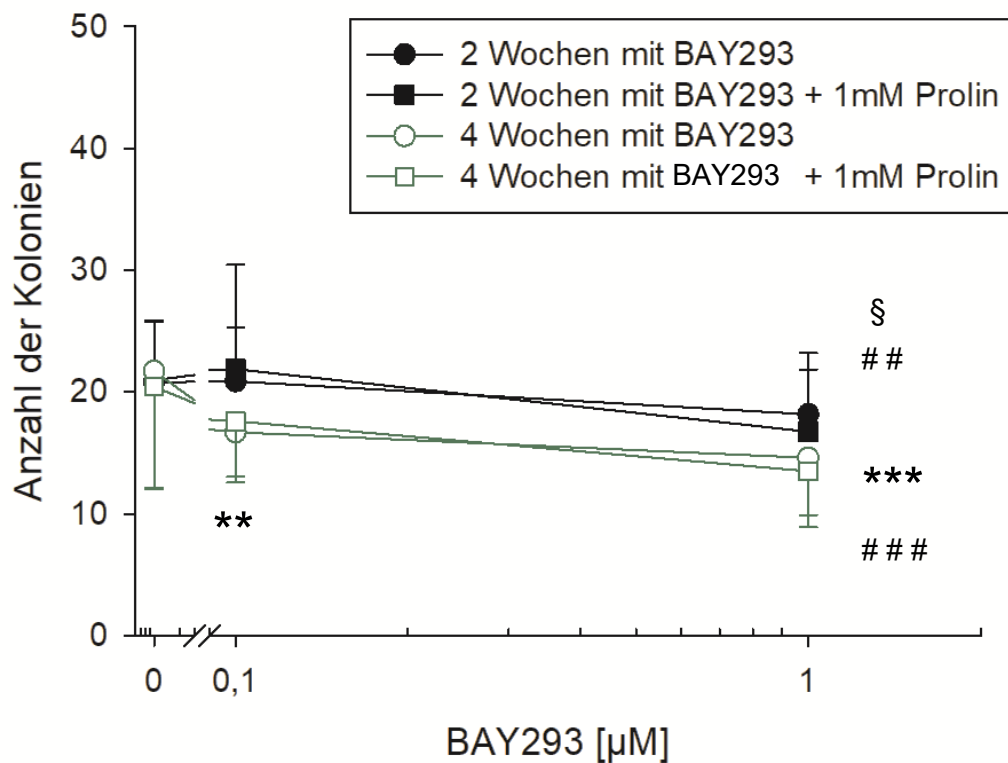


Abbildung 22 - Konzentrationsabhängiger Effekt von BAY293 und BAY293 kombiniert mit 1mM Prolin auf die Koloniebildung der WM278 Zellen (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 19).

Die Signifikanz wurde wie folgt gekennzeichnet: BAY293 gegenüber der Kontrolle (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$), BAY293 + 1mM Prolin gegenüber der Kontrolle (#: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$), 1µM BAY293 + 1mM Prolin gegenüber 0,1µM BAY293 + 1mM Prolin (§: $p < 0,05$; §§: $p < 0,01$; §§§: $p < 0,001$).

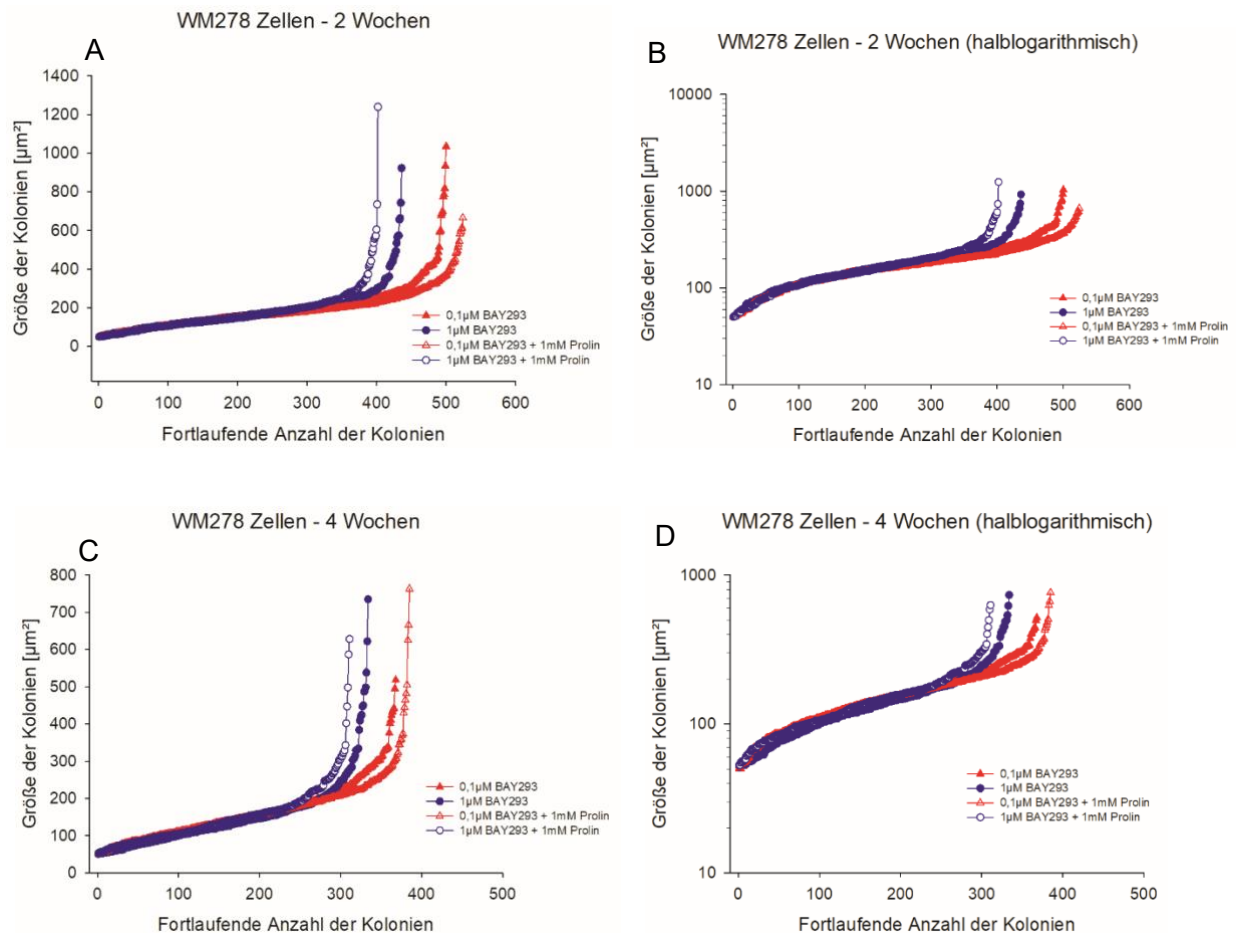


Abbildung 23 - Verteilung der Koloniefäche von WM278 Zellen in Abhängigkeit von der BAY293- und Prolinkonzentration (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 9).

Das Diagramm in Abbildung 24 weist verwirrende Ergebnisse auf. Zwei Wochen nach der Behandlung ist der Anteil der großen Kolonien bei der Behandlung mit 0,1µM und 1µM BAY293 (mit/ohne 1mM Prolin) größer als bei der Kontrollgruppe. Die WM278 Zellen, die mit BAY293 und 1mM Prolin behandelt wurden, zeigen vier Wochen später eine Reduktion der Kolonieanzahl die über 400µm² groß sind. Auch der konzentrationsabhängige Prolineffekt zeigt keinen Einfluss auf den Anteil der großen Kolonien.

Prozentueller Anteil der großen Kolonien der Zelllinie WM278 ab 400µm²

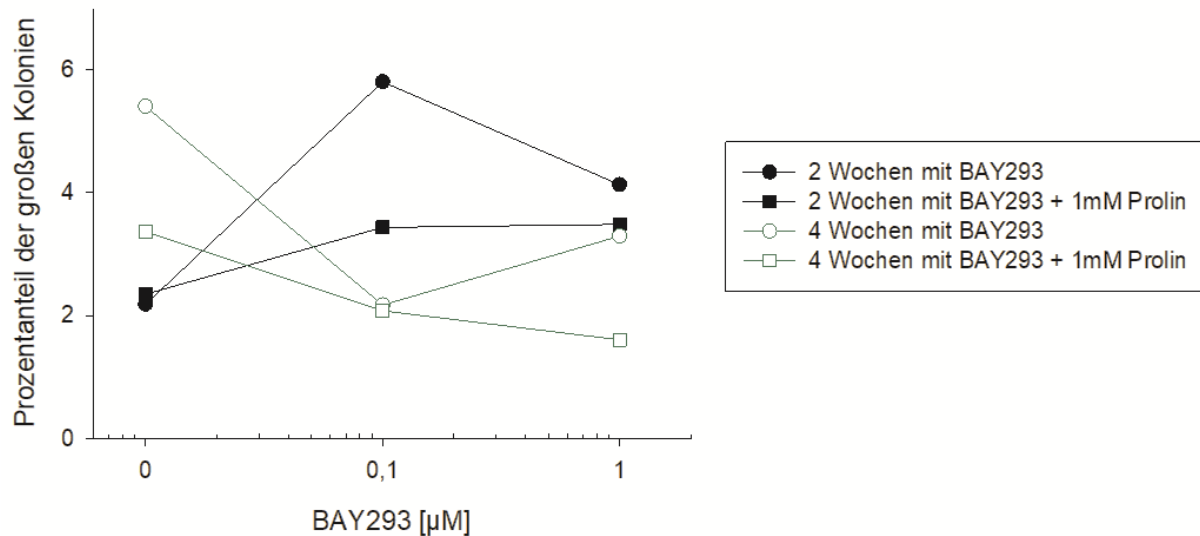


Abbildung 24 - Prozentueller Anteil der WM278 Zelllinie ab 400µm² mit BAY293-Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 21).

WM278	2 Wochen			4 Wochen		
	< 200	200 ≤ x <400	≥ 400	< 200	200 ≤ x <400	≥ 400
Kontrolle	67,22	30,59	2,19	65,84	28,76	5,40
0,1µM BAY 293	62,80	31,40	5,80	74,18	23,64	2,18
1µM BAY 293	66,97	28,90	4,13	82,63	14,07	3,30
1mM Prolin	69,08	28,57	2,35	71,87	24,77	3,36
0,1µM BAY 293 + 1mM Prolin	66,41	30,15	3,44	74,29	23,64	2,07
1µM BAY 293 + 1mM Prolin	71,89	24,63	3,48	81,99	16,40	1,61

Tabelle 8 - Prozentuelle Verteilung der Fläche der Kolonien von WM278 Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Tabelle 2).

6.1.2.3 WM793b Zelllinie

In Abbildung 25 ist zu sehen, dass nach zwei Wochen beide Behandlungsgruppen sowohl bei der 0,1µM als auch bei der 1µM BAY293 Behandlung mehr Kolonien vorweisen als die jeweilige Kontrollgruppe. Jedoch ist zu erkennen, dass nach vier Wochen die Kombinationsgruppe von BAY293 und 1mM Prolin eine signifikante Verringerung zeigt. Schon bei 0,1µM BAY293 + 1mM Prolin ist eine sehr hohe Signifikanz zu sehen, die auch bei 1µM BAY293 + 1mM Prolin so bleibt. Sowohl nach zwei als auch nach vier Wochen ist zu erkennen, dass die Gruppe, die zusätzlich mit Prolin behandelt wurde, jeweils weniger Kolonien haben. Insgesamt lässt sich noch sagen, dass die Wirkung von BAY293 nach vier Wochen stärker ist als nach zwei.

Anzahl der Kolonien der WM793b Melanomazellen - behandelt mit BAY293 und BAY293 kombiniert mit 1mM Prolin

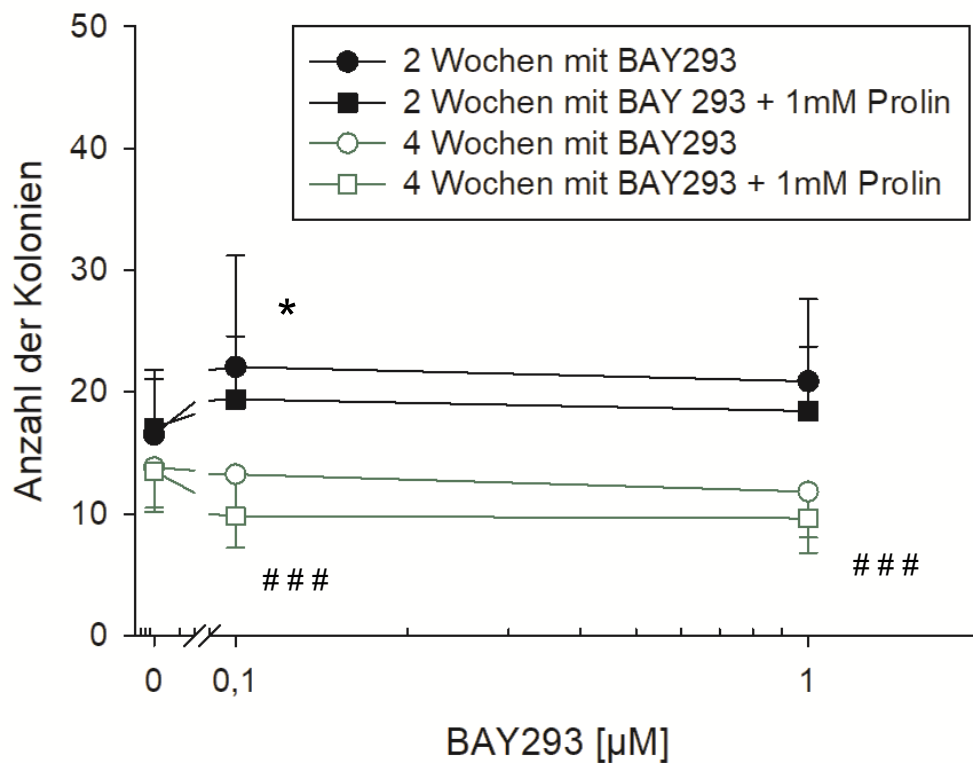


Abbildung 25 - Konzentrationsabhängiger Effekt von BAY293 und BAY293 kombiniert mit 1mM Prolin auf die Koloniebildung der WM793b Zellen (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 19).

Die Signifikanz wurde wie folgt gekennzeichnet: BAY293 gegenüber der Kontrolle (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$), BAY293 + 1mM Prolin gegenüber der Kontrolle (#: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$).

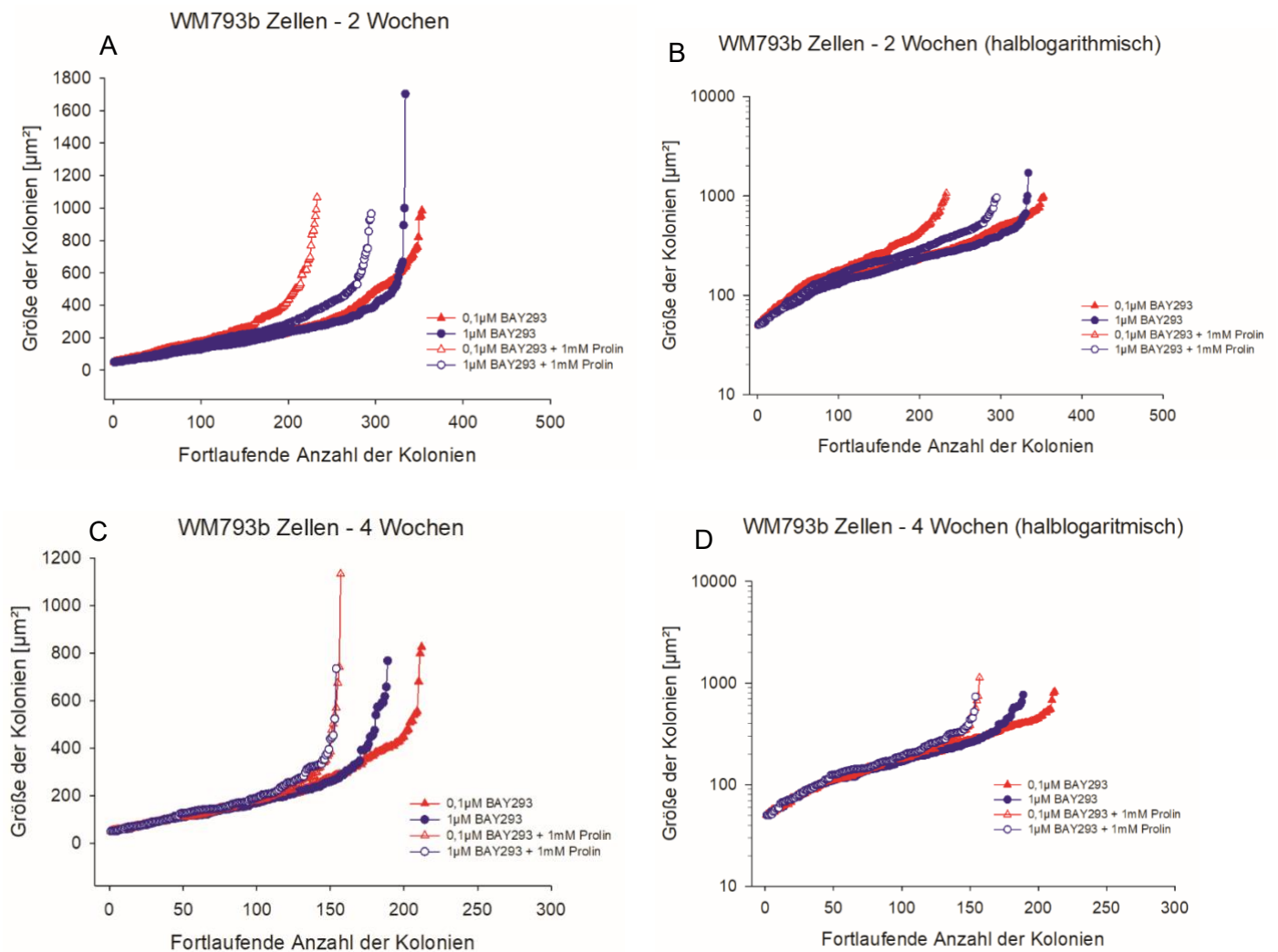


Abbildung 26 - Verteilung der Koloniefäche von WM793b Zellen in Abhängigkeit von der BAY293- und Prolinkonzentration (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 9).

In Abbildung 27 ist zu erkennen, dass es nach zwei Wochen bei der Behandlung mit 1 μM BAY293 eine eindeutige Reduktion des relativen Anteils der Kolonien ab 400 μm^2 gibt. Die Kombinationsgruppe mit 1mM Prolin hingegen weist keine relevanten Veränderungen auf. Allerdings ist nach vier Wochen eine Reduktion der großen Kolonien zu erkennen. Im Gegensatz dazu ist bei der reinen BAY293 Gruppe nur eine kleine Minimierung der großen Kolonien zu erkennen.

Prozentueller Anteil der großen Kolonien der Zelllinie WM793b ab 400µm²

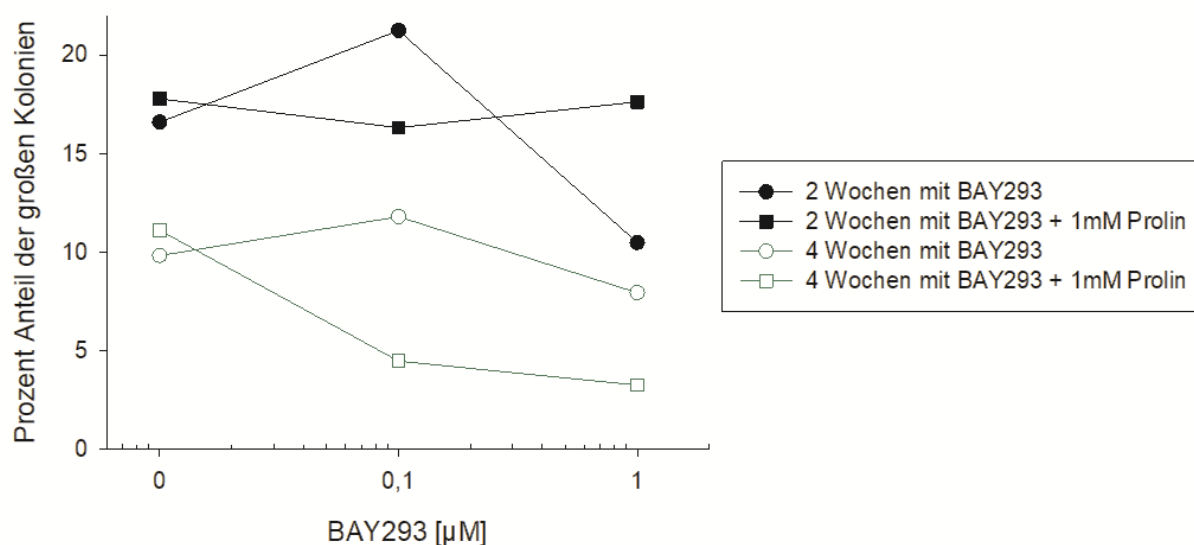


Abbildung 27 - Prozentueller Anteil der WM793b Zelllinie ab 400µm² mit BAY293-Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 21).

WM793b	2 Wochen			4 Wochen		
	< 200	200 ≤ x < 400	≥ 400	< 200	200 ≤ x < 400	≥ 400
Kontrolle	50,67	32,74	16,59	55,30	34,88	9,82
0,1µM BAY 293	56,09	22,66	21,25	55,56	32,55	11,89
1µM BAY 293	51,50	38,02	10,48	62,96	29,10	7,94
1mM Prolin	45,61	36,61	17,78	54,23	34,66	11,11
0,1µM BAY 293 + 1mM Prolin	49,36	34,44	16,31	70,06	25,48	4,46
1µM BAY 293 + 1mM Prolin	44,1	37,97	17,63	66,88	29,87	3,25

Tabelle 9 - Prozentuelle Verteilung der Fläche der Kolonien von WM793b Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Tabelle 2).

6.1.2.4 A375 Zelllinie

Die Zelllinie A375 (Abbildung 28) zeigt nach zwei Wochen eine signifikante Reduktion der Koloniezahl bei einer Behandlung mit 1µM BAY293. Bei 0,1µM BAY293 gibt es auch eine signifikante Veränderung der Anzahl, jedoch erhöht sich die Koloniezahl bei dieser Behandlungsgruppe. Der Effekt ist nach vier Wochen eindeutig signifikanter als nach zwei Wochen. Sowohl die alleinige Behandlung mit 0,1µM BAY293 als auch die Kombination mit 1mM Prolin zeigen signifikante Verminderungen der Koloniezahl. Bei dieser Zelllinie ist kein konzentrationsabhängiger Prolineneffekt erkennbar.

Anzahl der Kolonien der A375 Melanomazellen - behandelt mit BAY293 und BAY293 kombiniert mit 1mM Prolin

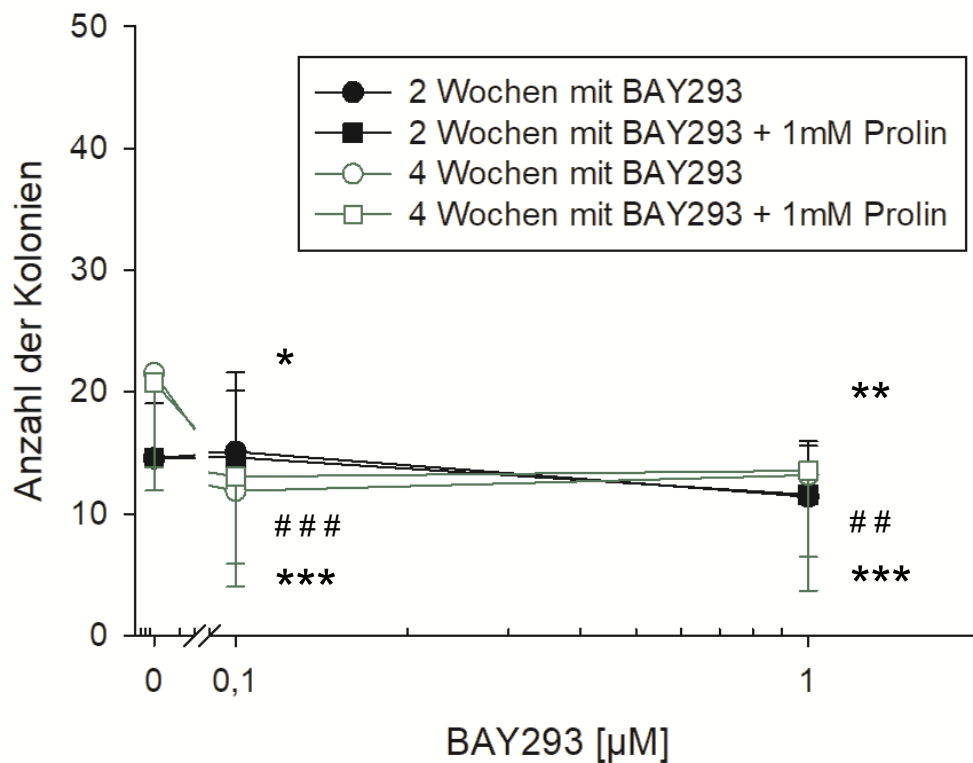


Abbildung 28 - Konzentrationsabhängiger Effekt von BAY293 und BAY293 kombiniert mit 1mM Prolin auf die Koloniebildung der A375 Zellen (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 19).

Die Signifikanz wurde wie folgt gekennzeichnet: BAY293 gegenüber der Kontrolle (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$), BAY293 + 1mM Prolin gegenüber der Kontrolle (#: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$).

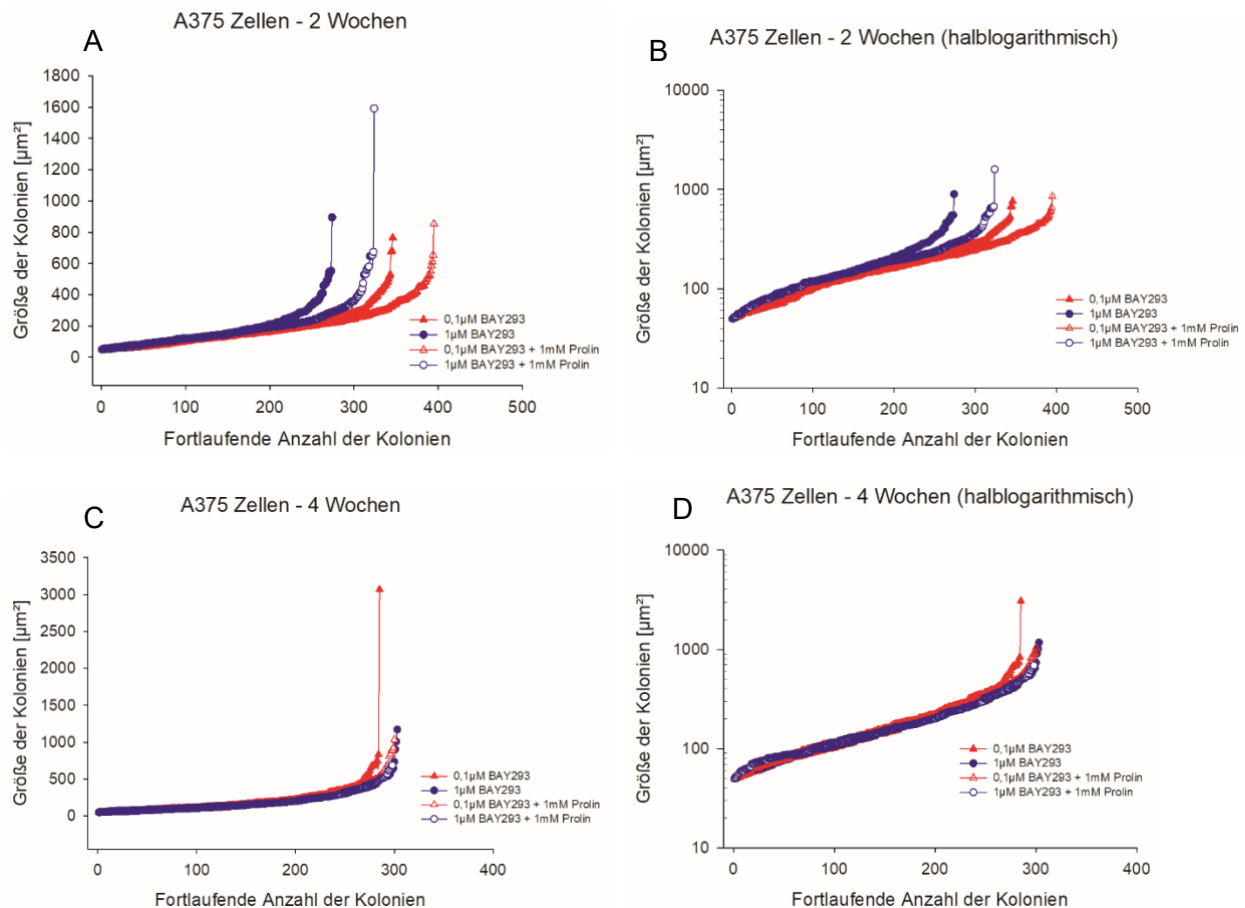


Abbildung 29 - Verteilung der Koloniefäche von A375 Zellen in Abhängigkeit von der BAY293- und Prolinkonzentration (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 9).

In Abbildung 30 ist erstmals zu sehen, dass der relative Anteil der Kolonien ab $400\mu\text{m}^2$ nach vier Wochen höher ist als nach der zweiten Woche. Ebenfalls lässt sich keine Verringerung der großen Kolonien mit der Behandlung von BAY293 feststellen. Jedoch ist in dieser Abbildung erstmalig in vier von sechs Behandlungsgruppen ein Prolineffekt, im Sinne einer Zunahme der Kolonien in der Kategorie $\geq 400\mu\text{m}^2$ zu sehen.

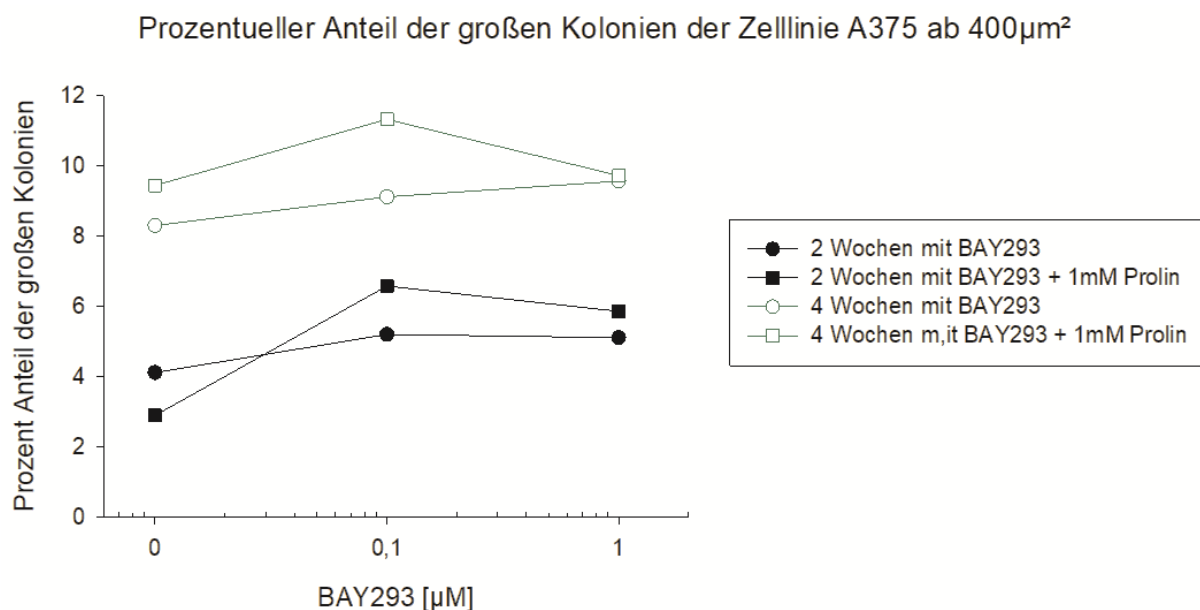


Abbildung 30 - Prozentueller Anteil der A375 Zelllinie ab 400µm² mit BAY293-Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 21).

A375	2 Wochen			4 Wochen		
	< 200	200 ≤ x < 400	≥ 400	< 200	200 ≤ x < 400	≥ 400
Kontrolle	70,15	25,73	4,12	66,61	25,08	8,31
0,1µM BAY 293	70,23	24,57	5,20	64,21	26,67	9,12
1µM BAY 293	71,17	23,72	5,11	65,35	25,08	9,57
1mM Prolin	77,22	19,89	2,89	65,21	25,35	9,45
0,1µM BAY 293 + 1mM Prolin	63,04	30,38	6,58	62,00	26,67	11,33
1µM BAY 293 + 1mM Prolin	65,74	28,40	5,86	66,11	24,16	9,73

Tabelle 10 - Prozentuelle Verteilung der Fläche der Kolonien von A375 Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Tabelle 2).

6.1.2.5 518a2 Zelllinie

Bei den 518a2 Zellen ist in den Kontrollgruppen nach zwei und nach vier Wochen der Prolineffekt, im Sinne einer Zunahme der Kolonien zu erkennen (siehe Abbildung 31), der auch schon in Kapitel 6.1.1.5 in Abbildung 17 erkennbar war. Nach zwei Wochen lässt sich keine signifikanten Veränderungen der Anzahl der Kolonien feststellen. Jedoch sind nach vier Wochen die Ergebnisse der Kombination von 0,1µM BAY293 plus 1mM Prolin und 1µM BAY293 plus 1mM Prolin hoch signifikant. Die alleinige Behandlung mit BAY293 zeigt nach vier Wochen keinen eindeutigen Veränderungen. Ebenfalls ist hervorzuheben, dass die Koloniezahl nach vier Wochen geringer ist als nach zwei Wochen. Allerdings ist auch die Anzahl in den Kontrollgruppen nach vier Wochen geringer als nach zwei.

Anzahl der Kolonien der 518a2 Melanomazellen - behandelt mit BAY293 und BAY293 kombiniert mit 1mM Prolin

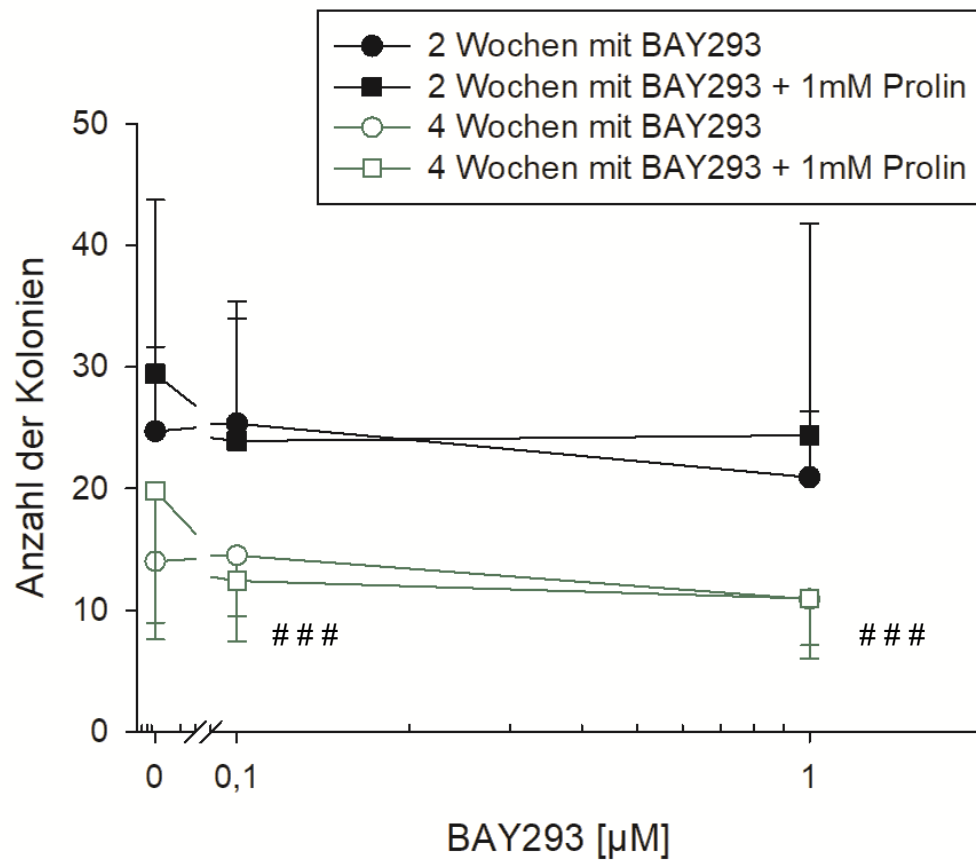


Abbildung 31 - Konzentrationsabhängiger Effekt von BAY293 und BAY293 kombiniert mit 1mM Prolin auf die Koloniebildung der 518a2 Zellen (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 19).

Die Signifikanz wurde wie folgt gekennzeichnet: BAY293 + 1mM Prolin gegenüber der Kontrolle (#: $p < 0,05$; ##: $p < 0,01$; ###: $p < 0,001$).

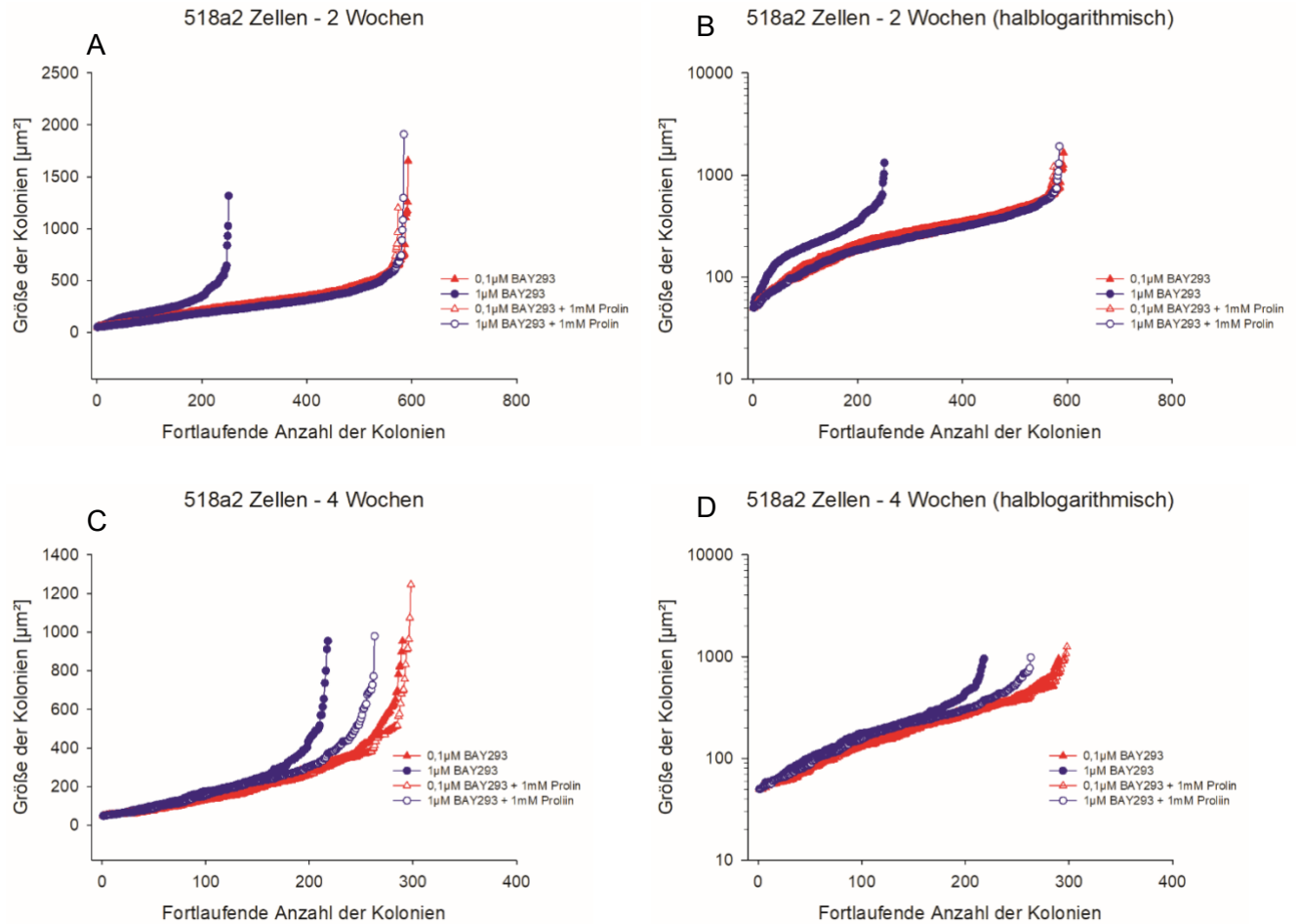


Abbildung 32 - Verteilung der Koloniefäche von 518a2 Zellen in Abhängigkeit von der BAY293- und Prolinkonzentration (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 9).

In Abbildung 33 ist zu sehen, dass, verglichen mit den anderen Zelllinien, die 518a2 Zellen den größten Anteil an Kolonien ab $400\mu\text{m}^2$ bildet. Dieser relative Anteil sinkt nach der vierten Woche eindeutig. Bei der Behandlung mit $1\mu\text{M}$ BAY293 sinkt der prozentuelle Teil von circa 23% in der Kontrollgruppe auf circa 10% ab. Während nach zwei Wochen in der Kombinationstherapie keine Reduktion erkennbar ist, zeigt sich in der Monotherapie mit BAY293 eine leichte Verringerung. In dieser Zelllinie zeigt die Behandlung mit Prolin keine Vergrößerung der Kolonien.

Prozentueller Anteil der großen Kolonien der Zelllinie 518a2 ab 400µm²

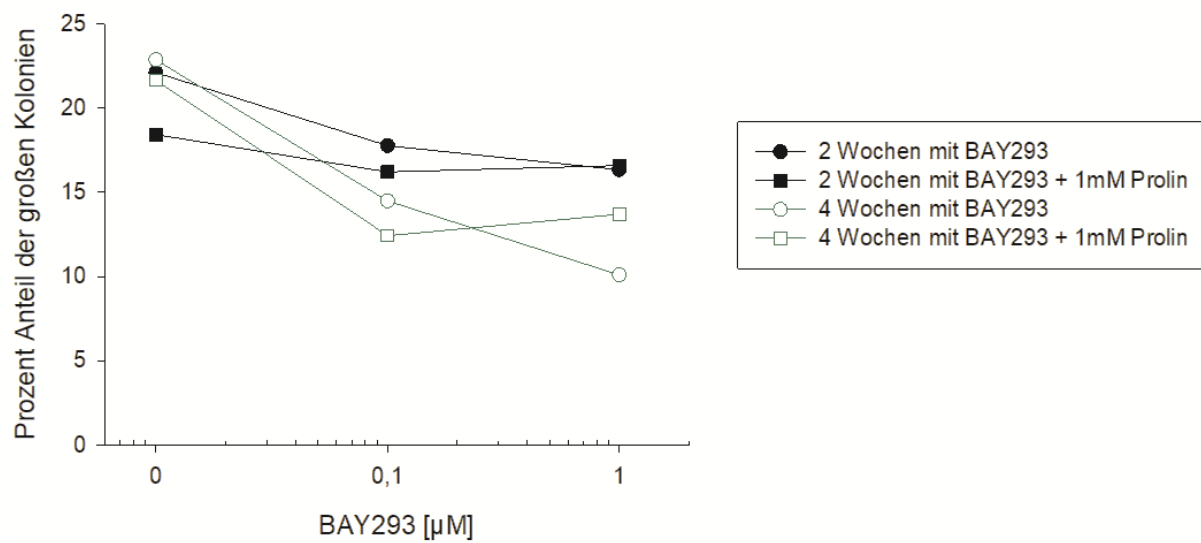


Abbildung 33 - Prozentueller Anteil der 518a2 Zelllinie ab 400µm² mit BAY293-Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 21).

518a2	2 Wochen			4 Wochen		
	< 200	200 ≤ x <400	≥ 400	< 200	200 ≤ x <400	≥ 400
Kontrolle	31,87	46,04	22,09	46,67	30,48	22,86
0,1µM BAY 293	41,12	41,12	17,76	49,66	35,86	14,48
1µM BAY 293	41,04	42,63	16,33	55,50	34,40	10,10
1mM Prolin	36,17	45,14	18,41	46,18	32,18	21,65
0,1µM BAY 293 + 1mM Prolin	40,59	43,21	16,20	52,35	35,23	12,42
1µM BAY 293 + 1mM Prolin	38,80	44,62	16,58	49,43	36,88	13,69

Tabelle 11 - Prozentuelle Verteilung der Fläche der Kolonien von 518a2 Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Tabelle 2).

6.2 Fluoreszenzmikroskopie

6.2.1 Morphologie von Melanomzellen

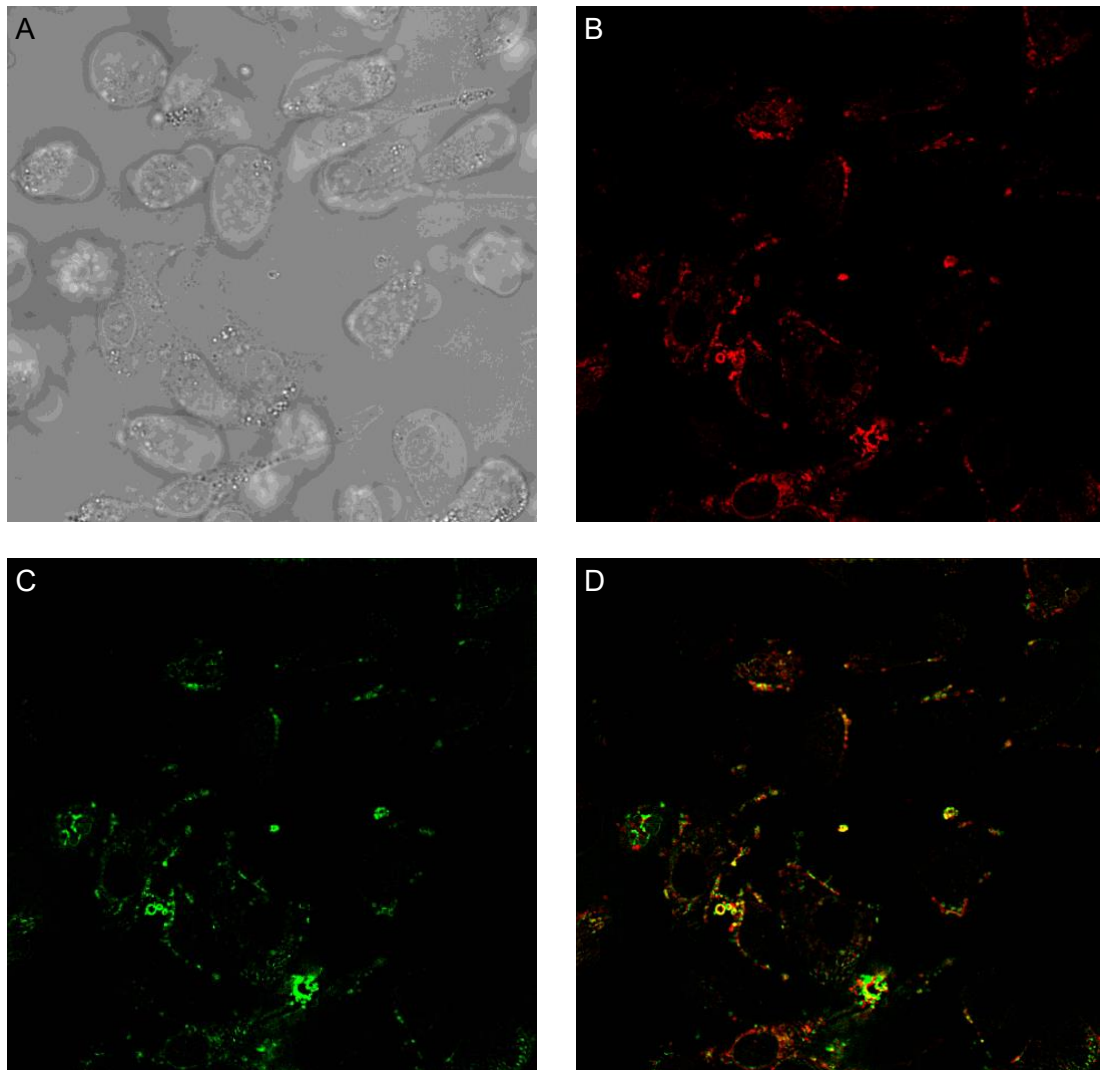


Abbildung 34 – Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von den WM278 Zellen mit besonderer Darstellung der Lysosomen und Mitochondrien.

Das Medium der Zellen wurde auf 250µl reduziert. Anschließend wurden 2µl 10µM LysoTracker und 2µl 10µM MitoTracker hinzupipettiert. Nachdem die Platte mit den Zellen 15 Minuten bei Raumtemperatur stand, wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop Bilder in 60x Vergrößerung gemacht. In Abbildung A sind die Zellen im Hellfeld zu sehen. Die Lysosomen, die durch den LysoTracker rot fluoreszieren (TRITC Kanal), sind in Abbildung B zu erkennen, während die Mitochondrien, die durch den MitoTracker grün fluoreszieren (FITC Kanal) in Abbildung C zu sehen sind. Abschließend wurden die zwei Kanäle in einem Bild kombiniert, um das Zusammenspiel von Lysosomen und Mitochondrien zu veranschaulichen (Abbildung D).

Die rot fluoreszierenden Lysosomen sind in der ganzen Zelle außer dem Zellkern zu finden und die meisten befinden sich entlang der Doppelmembranschicht (siehe Abbildung 34B). In Abbildung 34C sind die Mitochondrien (grün) zu sehen, die sich ebenfalls in der kompletten Zelle verteilen, nur im Zellkern sind keine Mitochondrien zu erkennen. Lysosome und

Mitochondrien stehen miteinander eng in Kontakt, da die Lysosomen unter Anderem Calciumionen und Signalmoleküle an Mitochondrien weiterleiten. An Stellen, wo Lysosomen und Mitochondrien zusammenkommen, überlagern sich die zwei Fluoreszenzsignale und leuchten gelb (Abbildung 34D).

6.2.2 Aufnahme von Dansylprolin

Um einen Beweis für die Aufnahme von Prolin in die Melanomzellen zu liefern, wurde dansyliertes Prolin (Synthese Konstanin Mayr) 518a2-Melanomzellen angeboten und die Aufnahme des fluoreszierenden Prolins in die Zelle über die Zeit am Fluoreszenzmikroskop gemessen.

In Abbildung 35 ist zu sehen, dass Dansylprolin in die Zellen aufgenommen wird. In den ersten 15 Minuten ist die Aufnahme stärker als zwischen 15 und 45 Minuten. Jedoch ist trotzdem ein stetiger Anstieg der FITC-Intensität sichtbar. Der Unterschied der Intensitäten zwischen 15 und 45 Minuten ist signifikant.

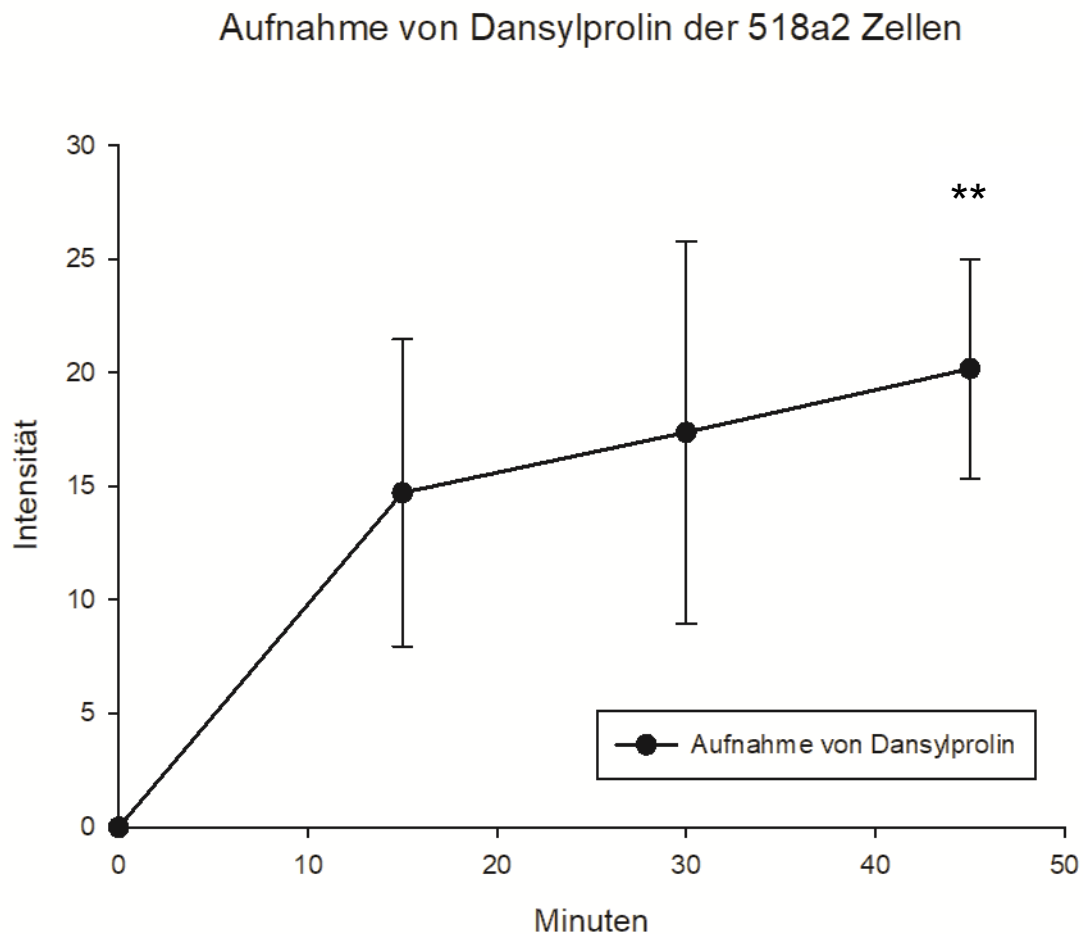


Abbildung 35 - Aufnahme von Dansylprolin in 518a2 Zellen.

Metastatische 518a2 Melanomzellen wurden bei einer Vergrößerung von 40x mit einem Fluoreszenzmikroskop (Olympus IX83) fokussiert (Zeitpunkt: 0 Minuten) und im Anschluss mit 40µM Dansylprolin versetzt. Nach 15, 30

und 45 Minuten wurde an den exakt gleichen Stellen Aufnahmen im FITC Kanal gemacht. Pro Well wurden vier Bilder aufgenommen und mit ImageJ die Intensität des FITC-Kanal zu verschiedenen Zeitpunkten ausgewertet. Von den Intensitäten wurde der Hintergrund abgezogen, der Mittelwert und Standardabweichungen berechnet und dargestellt. Die Aufnahme nach 45 Minuten zeigte mit $p=0,002(**)$, dass die Dansylprolinintensität im Vergleich zu dem 15 Minuten Wert signifikant zugenommen hat.

Nach der Erkenntnis, dass Dansylprolin aufgenommen wird, stellte sich die Frage, ob es homogen verteilt oder in Teilen der Zelle bzw. in bestimmten Zellorganellen zu finden ist. Abbildung 36 zeigt, dass Dansylprolin nicht in den Zellkern aufgenommen wird, sondern sich perinukleär verteilt und dort in Organellen akkumuliert. Die Dansylprolin-Fluoreszenz (siehe Abbildung 36B) überlagert mit den Lysosomen (siehe Abbildung 36C, D). Die gelben Bereiche zeigen eine Übereinanderlagerung von Dansylprolin (grün) und LysoTracker (rot) und bestätigen so eine Kolokalisation und Anreicherung von Dansylprolin in Lysosomen.

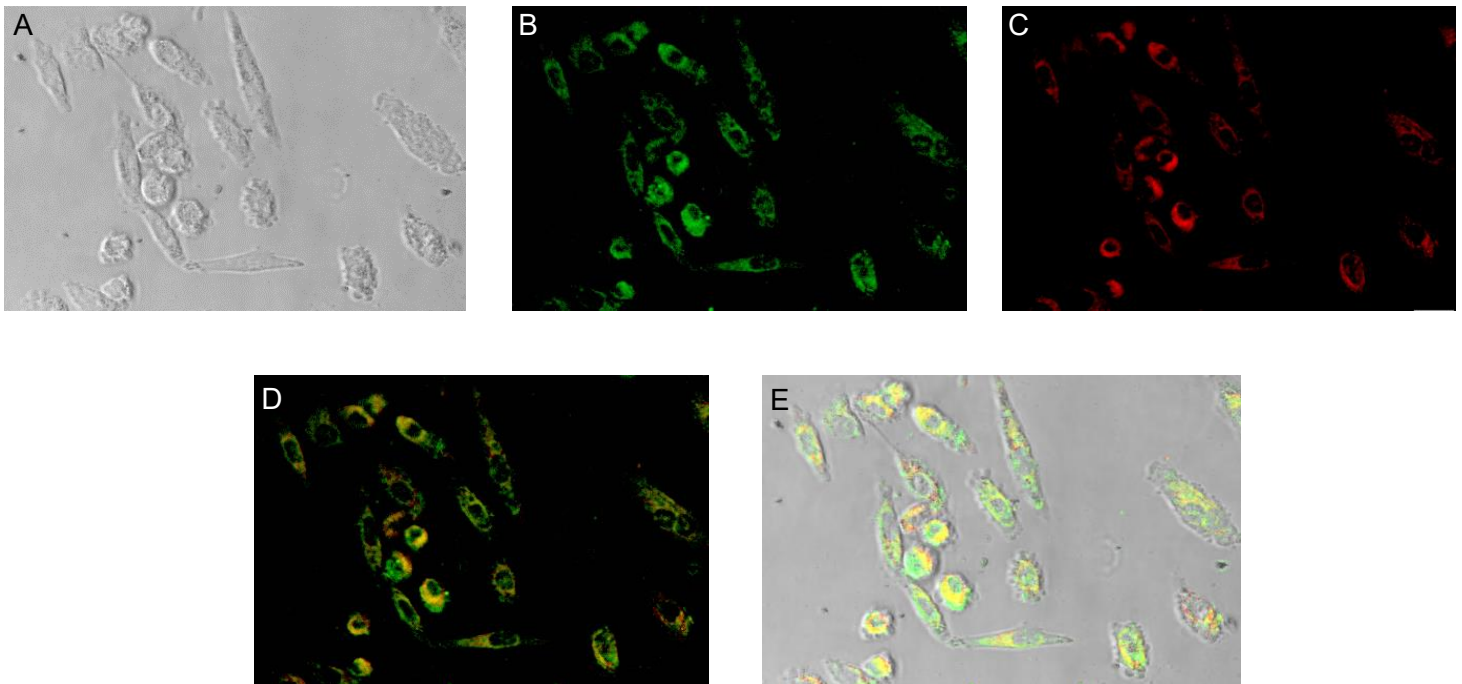


Abbildung 36 - Aufnahmen von den WM278 Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Die WM278 Zellen wurden zuerst mit 6,25 μ l von 40 μ M Dansylprolin versetzt. Nach der Zugabe wurden die Zellen 45 Minuten in den Inkubator gestellt. Danach wurden 2 μ l von 10 μ M LysoTracker hinzupipettiert und 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Abschließend wurden Bilder unter dem Fluoreszenzmikroskop gemacht und bearbeitet. In Abbildung A sieht man die Zellen in Phasenkontrast, während in Abbildung B der FITC-Kanal zu sehen ist, der das Signal für Dansylprolin zeigt. Das rote LysoTracker-Signal (TRITC-Kanal) in Abbildung C zeigt die Standorte von Lysosomen. In Abbildung D sind die Abbildungen B und C zusammengefügt. Die gelben Stellen zeigen die Übereinanderlagerung des FITC- und TRITC-Signal. Abschließend sind in Abbildung E alle Kanäle zusammengefügt worden (Phasenkontrast, FITC und TRITC).

7. Diskussion

In dieser Arbeit wurden fünf verschiedene humane Melanomzelllinien verwendet. Die WM35, WM278 sind Zellen, die sich noch in der radialen Wachstumsphase befinden, die WM793b Zellen weisen schon ein vertikales Wachstum auf und die A375 und 518a2 Zelllinien sind metastatisierende Zellen. Ziel der Arbeit war es eine mögliche Wachstumsstimulation im Colony Formation Assay von Prolin zu zeigen und diese durch BAY293 zu inhibieren. Weiters sollte mit Hilfe von Dansylprolin gezeigt werden, ob Prolin aufgenommen wird und eventuell in Zellorganellen akkumuliert.

7.1 Auswirkungen von Prolin auf humane Melanomzellen

In einer Arbeit von 2018 aus der Arbeitsgruppe Hohenegger wurde festgestellt, dass Prolin stimulierend auf das Wachstum von Melanomzellen wirkt (Wasinger Christine et al., 2018). 2024 wurde die Auswirkung von Prolin auf Melanomzellen wieder untersucht und ebenfalls festgestellt, dass ein proliferativer Effekt erkennbar ist (Sperat Konstantin, 2024). Eine andere Forschungsgruppe hat 2012 festgestellt, dass Prolindehydrogenase, welche beim Abbau von Prolin entsteht in frühen Stadien als Tumorsuppressor agiert. Allerdings kann dieses Enzym unter metabolischem Stress auch als Tumorüberlebensfaktor dienen (W. Liu & Phang, 2012).

7.1.1 Auswirkung auf die Anzahl der Kolonien

In den nicht-metastatischen Melanomzellen (WM35, WM278 und WM793b) ist weder nach zwei noch nach vier Wochen ein signifikanter konzentrationsabhängiger Prolineffekt zu sehen. Des Weiteren ist die Kolonieanzahl nach vier Wochen geringer (siehe Abbildungen 8, 10, 12). Bei den metastatischen A375 Kolonien ist nach zwei Wochen ebenso kein Effekt zu sehen. Allerdings ist nach vier Wochen zu sehen, dass die Anzahl der Kolonien in der Kontrollgruppe circa bei 21 liegt. Bei einer Prolinkonzentration von 0,1mM und 0,3mM, sinkt die Anzahl auf 13 und steigt dann auf 15 an. Bei einer Konzentration von 1mM Prolin steigt die Zahl der Kolonien wieder auf circa 21, sinkt dann bei den Konzentration 3mM und 10mM wieder kontinuierlich auf 15 ab (siehe Abbildung 14). Diese Ergebnisse deuten eher auf experimentelle Schwankungen als auf signifikante Veränderungen hin. Bei der 518a2 Zelllinie hingegen ist nach zwei Wochen ein kontinuierlicher Anstieg bis zu einer Prolinkonzentration von 3mM zu erkennen. Die absolute Anzahl der Kolonien in der Kontrollgruppe liegt circa bei 24, während die Anzahl bei einer Behandlung mit 3mM die Kolonieanzahl bei 35 liegt. Bei einer Prolinkonzentration von 10mM sinkt der Wert wieder circa auf 20 ab. Nach vier Wochen steigt die Anzahl der Kolonien des Kontrollwertes (circa 15) zu 0,1mM Prolin (circa 19) an, stagniert danach circa bei dem gleichen Wert (siehe Abbildung 16).

Insgesamt lässt sich sagen, dass nur die Ergebnisse der 518a2 Zellen nach zwei Wochen eine Zunahme der Koloniezahlen zeigen, die mit höher werdenden Konzentrationen von Prolin einhergehen und alle anderen Zelllinien keinen derartigen Effekt widerspiegeln.

7.1.2 Auswirkung auf die Größe der Kolonien

Der relative Anteil von den Kolonien der radial-wachsenden Melanomzellen, die mindestens $400\mu\text{m}^2$ groß sind, nehmen zu Beginn der Konzentrationsreihe nach zwei Wochen (bis 1mM - WM35 bzw. 3mM Prolin – WM278) mit steigender Prolinkonzentration zu und sinken danach wieder ab. Außerdem sind die Kolonien nach vier Wochen bei den niedrigeren Konzentrationen größer (WM35 bis 0,3mM und WM278 bis 1mM). Die Zellen, die sich in der Übergangsphase befinden (WM793b) sind nach vier Wochen kleiner und lassen keinen klaren Trend abhängig von verschiedenen Konzentrationen erkennen.

Die Kolonien der metastatischen Zelllinien sind nach vier Wochen größer als nach zwei. Die A375 Kolonien werden innerhalb der Konzentrationsreihe bis 3mM Prolin, mit einem Ausreißer, immer größer.

Allgemein lässt sich sagen, dass die Kolonien unter Prolinbehandlung bis circa einer Konzentration von 1mM Prolin wachsen.

7.2 Auswirkungen von BAY293 auf humane Melanomzellen

Das Team rund um Adelina Plangger untersuchte die Wirkung von BAY293 ($5\mu\text{M}$) in Kombination mit verschiedenen Wirkstoffen in verschiedenen Zelllinien des Pankreaskarzinom mittels MTT-Assay und anschließender Berechnung des Kombinationsindizes nach der Chou-Talalay-Methode. BAY293 reduzierte in zweidimensionalen Zellkulturen den KRAS-GTP-Spiegel in HeLa- und Calu-1-Zellen. Da BAY293 die KRAS-Signalübertragung nur teilweise inhibiert, testete das Forschungsteam verschiedene Kombinationen. Unter anderem erwies sich eine Kombination mit Trametinib ($50\mu\text{g/ml}$) in den BxPC3- und AsPC-1-Zelllinien als synergetisch wirksam, sowie eine Kombination mit Metformin (5mM) oder Linsitinib ($5\mu\text{M}$) (Plangger et al., 2022). Außerdem nahm das gleiche Team die Wirkung von BAY293 ($5\mu\text{M}$) in Kombinationen auf NSCLC-Zellen unter die Lupe. In den Ergebnissen des MTT-Assay zeigen sich einige der untersuchten Kombination als erfolgreiche Synergien (z.B.: der EGFR-Inhibitor Afatinib, der CDK4/6-Inhibitor Palbociclib und der Tyrosinkinase-Inhibitor Osimertinib). Des Weiteren gaben sie die Vorschau, dass der Wirkstoff auch bei Kolonkarzinomzellen von Bedeutung sein könnte (Plangger et al., 2021). Deborah Mannino und Rossella Basilotta von der Universität Messina, Italien, führten unter anderem einen Colony Formation Assay durch, indem BAY293 in den Konzentrationen $1\mu\text{M}$, $10\mu\text{M}$ und $25\mu\text{M}$ verwendet wurde. Nach einer Behandlungsdauer von

24 Stunden wurden die Zellen zehn Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Alle Konzentrationen von BAY293 bewirkten eine eindeutige Reduktion der Koloniebildung (Mannino et al., 2025).

Auch die Ergebnisse meiner Experimente weisen eine Reduktion der Melanomzellen unter der Behandlung von BAY293 auf.

7.2.1 Auswirkung auf die Anzahl der Kolonien

In den nicht-metastatischen Zelllinien WM35, WM278 und WM793b sind nach vier Wochen weniger Kolonien vorhanden als nach zwei Wochen. In den WM35 Zellen sind schon nach zwei Wochen bei einer BAY293-Konzentration von 1µM eine signifikante Reduktion ($p < 0,001$) der Kolonien zu erkennen (siehe Abbildung 19). Im Gegensatz dazu weisen die WM278 Zellen nach zwei Wochen keine eindeutige Reduktion der Melanomzellen durch 0,1 und 1µM BAY293 vor, allerdings ist nach vier Wochen eine signifikante Reduktion zu erkennen (siehe Abbildung 22). Bei den WM793b Zellen, die im Gegensatz zu den anderen zwei Zelllinien schon ein vertikales Wachstum aufzeigen, ist bei der alleinigen Behandlung mit BAY293 nach zwei Wochen ein Wachstum und nach vier Wochen eine gleichbleibende Anzahl zu erkennen (siehe Abbildung 25).

Bei der metastatischen Zelllinie A375 ist bei einer Behandlung mit BAY293 nach zwei Wochen ein signifikanter Unterschied ($p < 0,01$) zu der Kontrollgruppe zu erkennen. Nach vier Wochen steigt die Signifikanz auf $p < 0,001$ an. Dieser Reduktion der Kolonienanzahl ist auch schon bei einer BAY293-Konzentration von 0,1µM zu erkennen (siehe Abbildung 28). Bei den 518a2 Zellen, welche die aggressivste Zelllinie in diesem Experiment ist, hat BAY293 allein weder nach zwei noch nach vier Wochen einen Effekt (siehe Abbildung 31).

7.2.2 Auswirkung auf die Größe der Kolonien

In der nicht-metastatischen Zelllinie WM35 ist nach vier Wochen eine konzentrationsabhängige Verringerung des relativen Anteils der Kolonien, die mindestens 400µm² groß sind, zu erkennen (siehe Abbildung 21). Nach zwei Wochen könnte dieser Effekt ebenfalls vermutet werden, jedoch ist die Größe Kontrollgruppe sehr niedrig (könnte ein Ausreißer sein). Das gleiche Phänomen ist auch bei den WM278 Zellen nach zwei Wochen zu erkennen. Nach vier Wochen ist eine Verringerung des relativen Anteils im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen (siehe Abbildung 24). WM793b zeigt eindeutig eine Reduktion der großen Kolonien beim zwei-zu-vier-Wochen-Vergleich (siehe Abbildung 27).

Bei der metastatischen Zelllinie A375 ist der gegenteilige Effekt zu erkennen. Der relative Anteil der großen Kolonien ist nach vier Wochen doppelt so groß wie nach zwei Wochen. Des Weiteren steigt mit der Konzentration von BAY293 auch diese Anzahl (siehe Abbildung 30). Bei den 518a2 Zellen sieht es wieder anders aus und die Kolonien werden mit steigender BAY293-Konzentration kleiner.

7.3 Auswirkungen von BAY293 in Kombination mit Prolin auf humane Melanomzellen

7.3.1 Auswirkung auf die Anzahl der Kolonien

In allen nicht-metastatischen Zelllinien zeigt die Kombination aus BAY293 und 1mM Prolin nach 4 Wochen eine größere Reduktion der Kolonieanzahl als eine Monotherapie mit BAY293. Bei der WM35 Zelllinie ist nach zwei und nach vier Wochen bei einer BAY293-Konzentration von 1µM eine signifikante Abnahme der Kolonien zu sehen ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 19). Ebenso ist bei den WM278 Zellen nach zwei Wochen ein signifikanter Unterschied zu sehen ($p < 0,01$), der sich nach vier Wochen noch einmal vergrößert ($p < 0,001$). Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Anzahl der Kolonien nach vier Wochen eindeutig geringer ist als nach zwei (siehe Abbildung 22). Die Anzahl WM793b Kolonien, die sich in der Übergangsphase befinden, reduziert sich nach den ersten zwei Wochen nicht, sondern steigt sogar an. Nach vier Wochen zeigen beide Konzentrationen (0,1µM und 1µM BAY293) eine signifikante Abnahme der Anzahl ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 25).

Beide metastatischen Zelllinien zeigen nach zwei Wochen keine Veränderung. Die A375 Zellen zeigen in der Kombinationstherapie schon bei einer BAY293-Konzentration von 0,1µM nach vier Wochen eine starke Reduktion der Kolonieanzahl ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 28). Ebenso weisen die 518a2 Kolonien bei einer Behandlung von 0,1µM BAY293 plus 1mM Prolin eine signifikante Reduktion der Anzahl der Kolonien auf ($p < 0,001$) (siehe Abbildung 31).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die radial-wachsenden Melanomzellen (WM35 und WM278) schon nach zwei Wochen bei einer BAY293-Konzentration von 1µM eine signifikante Reduktion der Kolonien vorweisen, während die vertikal-wachsenden (WM793b) und metastasierenden Melanomzellen (A375 und 518a2) erst nach vier Wochen eine eindeutige Verringerung der Kolonien vorweisen können, jedoch hier schon ab einer Konzentration von 0,1µM. Ebenfalls lässt sich feststellen, dass die Kombinationstherapie bei allen Zelllinien, bis auf A375, nach vier Wochen effektiver ist.

7.3.2 Auswirkung auf die Größe der Kolonien

Bei den nicht-metastatischen Melanomzellen lässt sich bis auf eine Ausnahme (WM793b; 2 Wochen; 1µM BAY293 + 1mM Prolin) feststellen, dass die Verkleinerung der Kolonien mit 1mM Prolin effektiver ist als ohne Prolin.

Die Größe der A375 Kolonien steigt auch wie in der Behandlungsgruppe ohne Prolin an (siehe Abbildung 30). In den 518a2 Kolonien ist nach vier Wochen eine Reduktion des relativen Anteils ab 400µm² zu erkennen (siehe Abbildung 33).

7.4 Aufnahme von Dansylprolin in humane Melanomzellen

In einem Experiment von Wasinger wurde 2018 festgestellt, dass Prolin in die WM793b Zellen (nicht-metastatisch) aufgenommen wird.

In dieser Arbeit wurde direkt gezeigt, dass Dansylprolin signifikant ($p < 0,01$) in die 518a2 Zellen (metastatisch) aufgenommen wird (siehe Abbildung 35).

Durch die fluoreszierende Eigenschaft von Dansylprolin wurde erkannt, dass es sich unter anderem in Lysosomen anreichert. Dies unterscheidet sich von der bisherigen Literatur, die überwiegend die mitochondriale Aufnahme von Prolin beschreibt (Atlante et al., 1994; Block et al., 2025).

7.5 Konklusion

Die Ergebnisse meiner Arbeit zeigen, dass ein konzentrationsabhängiger Prolineffekt im Colony Formation Assay nur bei der 518a2 Zelllinie nach zwei Wochen bis zu einer Konzentration von 3mM nachgewiesen werden konnte. Allerdings zeigt der Zuwachs des relativen Anteils der Kolonien ab einer Größe von $400\mu\text{m}^2$ sowohl bei den nicht-metastatischen als auch bei den metastatischen eine Prolinabhängigkeit, weshalb man darauf schließen kann, dass Prolin die Größe der Kolonien beeinflusst. BAY293 zeigt bei den radial-wachsenden Zelllinien sowohl bei der Anzahl als auch bei der Größe der Kolonien einen inhibierenden Effekt, jedoch ist dieser in Kombination mit 1mM Prolin stärker. In dieser Kombinationstherapie zeigen die radial-wachsenden Melanomzellen schon nach zwei Wochen bei einer Behandlung mit $1\mu\text{M}$ BAY293 eine signifikante Reduktion der Anzahl der Kolonien. Im Vergleich dazu benötigen man bei den WM793b Zellen und den metastatischen Melanomzelllinien vier Wochen, um eine signifikante Verminderung der Kolonieanzahl zu erkennen. Allerdings reicht in diesem Fall bereits eine BAY293-Konzentration von $0,1\mu\text{M}$ um diesen Effekt zu erzielen. Auch die Anzahl der großen Kolonien der WM35, WM278 und WM793b Zellen sind in der Kombinationsbehandlung (Prolin plus BAY293) deutlich kleiner. Durch die Aufnahme des fluoreszierenden Dansylprolins konnte eine perinukleäre Anreicherung in Lysosomen nachgewiesen werden.

Abschließend lässt sich noch sagen, dass die Ergebnisse der Experimente mit Prolin überraschend waren, da eigentlich eine Stimulation erwartet wurde. Des Weiteren wurde nicht erwartet, dass die Kombination von Prolin und BAY293 bessere Ergebnisse liefern als BAY293 allein. Diese unerwarteten Erkenntnisse sollten in zukünftigen Arbeiten überprüft werden.

8. Abkürzungen

ALM:	akral lentiginöses Melanom
ATP:	Adenosintriphosphat
BCC:	Basalzellkarzinom
GDP:	Guanindiphosphat
GEF:	Guaninnukleotidaustauschfaktor
GTP:	Guanintriphosphat
EGF:	epidermaler Wachstumsfaktor
ERK:	extrazelluläre signalregulierte Kinase
EW:	Einwohner und Einwohnerinnen
Grb2:	Wachstumsfaktor-rezeptor-bindendes Protein 2
LMM:	Lentiginöses malignes Melanom
MAPK:	mitogenaktivierte Proteinkinase
NM:	noduläres Melanom
NMSC:	nicht-melanozytärer Hautkrebs
NF1:	Neurofibromin 1
PRODH/POX:	Prolin Dehydrogenase/Prolin Oxidase
P5C:	1-Pyrrolin-5-carboxylat
ROS:	reactive Sauerstoffspezies
SCC:	Plattenepithelkarzinom
SOS:	Son of Sevenless
SSM:	Superfiziell spreitendes Melanom
UV-Strahlung:	ultraviolette Strahlung

9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Aufbau der Haut (Roky et al., 2025).....	8
Abbildung 2 - Verschiedene Arten von Hautkrebs (Roky et al., 2025).....	8
Abbildung 3 - Aussehen der verschiedenen Melanomtypen (Roky et al., 2025).....	10
Abbildung 4 - Stadien des Melanoms (Roky et al., 2025).....	10
Abbildung 5 - Schematische Darstellung des ERK/MAPK - Signalweg (Guo et al., 2020).	15
Abbildung 6 - Struktur von Prolin	17
Abbildung 7 - Phasenkontrastaufnahme der Kolonien der 518a2 Zellen in vierfacher Vergrößerung.....	28
Abbildung 8 – Konzentrationsabhängiger Effekt von Prolin auf die Koloniebildung von WM35 Zellen.....	29
Abbildung 9 – Verteilung der Kolonief Flächen von WM35 Zellen in Abhängigkeit von der Prolinkonzentration.....	30
Abbildung 10 – Konzentrationsabhängiger Effekt von Prolin auf die Koloniebildung von WM278 Zellen (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 8).....	31
Abbildung 11 - Verteilung der Kolonief Flächen von WM278 Zellen in Abhängigkeit von der Prolinkonzentration. (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 9).....	32
Abbildung 12 – Konzentrationsabhängiger Effekt von Prolin auf die Koloniebildung von WM793b Zellen (Vorgehensweise siehe Legende von Abbildung 8).....	33
Abbildung 13 - Verteilung der Flächen der Kolonien von WM793b Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 9).....	34
Abbildung 14 - Konzentrationsabhängiger Effekt von Prolin auf die Koloniebildung von A375 Zellen (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 8).....	35
Abbildung 15 - Verteilung der Kolonief Flächen von A375 Zellen in Abhängigkeit von der Prolinkonzentration (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 9).	36
Abbildung 16 – Konzentrationsabhängiger Effekt von Prolin auf die Koloniebildung von 518a2 Zellen (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 8).	37
Abbildung 17 - Verteilung der Kolonief Flächen von 518a2 Zellen in Abhängigkeit von der Prolinkonzentration (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 9).	38
Abbildung 18 - Aufnahme der Kolonien der 518a2 Zellen in vierfacher Vergrößerung.	40

Abbildung 19 - Konzentrationsabhängiger Effekt von BAY293 und BAY293 kombiniert mit 1mM Prolin auf die Koloniebildung der WM35 Zellen.	41
Abbildung 20 – Verteilung der Koloniefäche von WM35 Zellen in Abhängigkeit von der BAY293- und Prolinkonzentration (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 9).....	42
Abbildung 21 – Prozentueller Anteil der WM35 Zelllinie ab 400µm² mit BAY293-Behandlung.....	43
Abbildung 22 - Konzentrationsabhängiger Effekt von BAY293 und BAY293 kombiniert mit 1mM Prolin auf die Koloniebildung der WM278 Zellen (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 19).	44
Abbildung 23 - Verteilung der Koloniefäche von WM278 Zellen in Abhängigkeit von der BAY293- und Prolinkonzentration (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 9).....	45
Abbildung 24 - Prozentueller Anteil der WM278 Zelllinie ab 400µm² mit BAY293-Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 21).....	46
Abbildung 25 - Konzentrationsabhängiger Effekt von BAY293 und BAY293 kombiniert mit 1mM Prolin auf die Koloniebildung der WM793b Zellen (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 19).	47
Abbildung 26 - Verteilung der Koloniefäche von WM793b Zellen in Abhängigkeit von der BAY293- und Prolinkonzentration (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 9).....	48
Abbildung 27 - Prozentueller Anteil der WM793b Zelllinie ab 400µm² mit BAY293-Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 21).....	49
Abbildung 28 - Konzentrationsabhängiger Effekt von BAY293 und BAY293 kombiniert mit 1mM Prolin auf die Koloniebildung der A375 Zellen (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 19).	50
Abbildung 29 - Verteilung der Koloniefäche von A375 Zellen in Abhängigkeit von der BAY293- und Prolinkonzentration (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 9).....	51
Abbildung 30 - Prozentueller Anteil der A375 Zelllinie ab 400µm² mit BAY293-Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 21).....	52
Abbildung 31 - Konzentrationsabhängiger Effekt von BAY293 und BAY293 kombiniert mit 1mM Prolin auf die Koloniebildung der 518a2 Zellen (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 19).	53
Abbildung 32 - Verteilung der Koloniefäche von 518a2 Zellen in Abhängigkeit von der BAY293- und Prolinkonzentration (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 9).....	54

Abbildung 33 - Prozentueller Anteil der 518a2 Zelllinie ab 400µm² mit BAY293-Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Abbildung 21).....	55
Abbildung 34 – Fluoreszenzmikroskop-Aufnahmen von den WM278 Zellen mit besonderer Darstellung der Lysosomen und Mitochondrien.....	56
Abbildung 35 - Aufnahme von Dansylprolin in 518a2 Zellen.....	57
Abbildung 36 - Aufnahmen von den WM278 Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop.	58

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Informationen zu den verwendeten Substanzen.....	21
Tabelle 2 – Prozentuelle Verteilung der Flächen der Kolonien von WM35 Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung.	31
Tabelle 3 - Prozentuelle Verteilung der Flächen der Kolonien von WM278 Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Tabelle 2).....	33
Tabelle 4 – Prozentuelle Größenverteilung der WM793b Zellen nach zwei und vier Wochen Inkubation (Vorgehensweise siehe Legende zu Tabelle 2).	35
Tabelle 5 - Prozentuelle Verteilung der Flächen der Kolonien von A375 Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Tabelle 2).....	37
Tabelle 6 - Prozentuelle Verteilung der Flächen der Kolonien von 518a2 Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Tabelle 2).....	39
Tabelle 7 – Prozentuelle Verteilung der Fläche der Kolonien von WM35 Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Tabelle 2).....	43
Tabelle 8 - Prozentuelle Verteilung der Fläche der Kolonien von WM278 Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Tabelle 2).....	46
Tabelle 9 - Prozentuelle Verteilung der Fläche der Kolonien von WM793b Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Tabelle 2).....	49
Tabelle 10 - Prozentuelle Verteilung der Fläche der Kolonien von A375 Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Tabelle 2).....	52
Tabelle 11 - Prozentuelle Verteilung der Fläche der Kolonien von 518a2 Zellen nach zwei und vier Wochen Behandlung (Vorgehensweise siehe Legende Tabelle 2).....	55

11. Quellenverzeichnis

- Arda, O., Göksügür, N., & Tüzün, Y. (2014). Basic histological structure and functions of facial skin. *Clinics in Dermatology*, 32(1), 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2013.05.021>
- Atlante, A., Passarella, S., Pierro, P., & Quagliariello, E. (1994). Proline transport in rat kidney mitochondria. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 309(1), 139–148. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1096>
- Australian Government - Cancer Australia. (2025, July 9). *Melanoma of the skin statistics*. <https://www.canceraustralia.gov.au/cancer-types/melanoma-skin/melanoma-skin-statistics?>
- Baker, L. B. (2019). Physiology of sweat gland function: The roles of sweating and sweat composition in human health. *Temperature (Austin, Tex.)*, 6(3), 211–259. <https://doi.org/10.1080/23328940.2019.1632145>
- Benjamin, C. L., & Ananthaswamy, H. N. (2007). p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 224(3), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.12.006>
- Berwick, M., Erdei, E., & Hay, J. (2009). Melanoma epidemiology and public health. *Dermatologic Clinics*, 27(2), 205–214, viii. <https://doi.org/10.1016/j.det.2008.12.002>
- Bian, X., Zhou, N., Zhao, Y., Fang, Y., Li, N., Zhang, X., Wang, X., Li, Y., Wu, J.-L., & Zhou, T. (2023). Identification of proline, 1-pyrroline-5-carboxylate and glutamic acid as biomarkers of depression reflecting brain metabolism using carboxylomics, a new metabolomics method. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, 77(4), 196–204. <https://doi.org/10.1111/pcn.13517>
- Block, S., Chi, F., Rosen, P. C., Pineda, S. S., Darnell, A. M., Abbott, K. L., Pena, I. A., Heiman, M., Yilmaz, Ö. H., Kory, N., & Vander Heiden, M. G. (2025). Sideroflexins enable mitochondrial transport of polar neutral amino acids. *BioRxiv: The Preprint Server for Biology*. <https://doi.org/10.1101/2025.06.18.660357>
- Boniol, M., Autier, P., Boyle, P., & Gandini, S. (2012). Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 345, e4757. <https://doi.org/10.1136/bmj.e4757>
- Brenner, M., & Hearing, V. J. (2008). The protective role of melanin against UV damage in human skin. *Photochemistry and Photobiology*, 84(3), 539–549. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2007.00226.x>

- Burke, L., Guterman, I., Palacios Gallego, R., Britton, R. G., Burschowsky, D., Tufarelli, C., & Rufini, A. (2020). The Janus-like role of proline metabolism in cancer. *Cell Death Discovery*, 6, 104. <https://doi.org/10.1038/s41420-020-00341-8>
- Candido, S., Rapisarda, V., Marconi, A., Malaponte, G., Bevelacqua, V., Gangemi, P., Scalisi, A., McCubrey, J. A., Maestro, R., Spandidos, D. A., Fenga, C., & Libra, M. (2014). Analysis of the B-RafV600E mutation in cutaneous melanoma patients with occupational sun exposure. *Oncology Reports*, 31(3), 1079–1082. <https://doi.org/10.3892/or.2014.2977>
- Chang, A. E., Karnell, L. H., & Menck, H. R. (1998). The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer*, 83(8), 1664–1678. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0142\(19981015\)83:8<1664::aid-cnrcr23>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0142(19981015)83:8<1664::aid-cnrcr23>3.0.co;2-g)
- Ciążyńska, M., Kamińska-Winciorek, G., Lange, D., Lewandowski, B., Reich, A., Sławińska, M., Pabianek, M., Szczepaniak, K., Hankiewicz, A., Ułańska, M., Morawiec, J., Błasińska-Morawiec, M., Morawiec, Z., Piekarski, J., Nejc, D., Brodowski, R., Zaryczańska, A., Sobjanek, M., Nowicki, R. J., ... Lesiak, A. (2021). The incidence and clinical analysis of non-melanoma skin cancer. *Scientific Reports*, 11(1), 4337. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83502-8>
- Cummins, D. L., Cummins, J. M., Pantle, H., Silverman, M. A., Leonard, A. L., & Channugam, A. (2006). Cutaneous malignant melanoma. *Mayo Clinic Proceedings*, 81(4), 500–507. <https://doi.org/10.4065/81.4.500>
- Curtin, J. A., Fridlyand, J., Kageshita, T., Patel, H. N., Busam, K. J., Kutzner, H., Cho, K.-H., Aiba, S., Bröcker, E.-B., LeBoit, P. E., Pinkel, D., & Bastian, B. C. (2005). Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *The New England Journal of Medicine*, 353(20), 2135–2147. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050092>
- Dessinioti, C., Antoniou, C., Katsambas, A., & Stratigos, A. J. (2011). Melanocortin 1 receptor variants: functional role and pigmentary associations. *Photochemistry and Photobiology*, 87(5), 978–987. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00970.x>
- Elia, I., Broekaert, D., Christen, S., Boon, R., Radaelli, E., Orth, M. F., Verfaillie, C., Grünwald, T. G. P., & Fendt, S.-M. (2017). Proline metabolism supports metastasis formation and could be inhibited to selectively target metastasizing cancer cells. *Nature Communications*, 8, 15267. <https://doi.org/10.1038/ncomms15267>
- Environmental Health Intelligence New Zealand. (n.d.). *Melanoma*. Retrieved October 7, 2025, from <https://www.ehinz.ac.nz/indicators/uv-exposure/melanoma/>

- Fedorenko, I. V., Gibney, G. T., & Smalley, K. S. M. (2013). NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene*, 32(25), 3009–3018. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.453>
- Feig, C., Gopinathan, A., Neesse, A., Chan, D. S., Cook, N., & Tuveson, D. A. (2012). The pancreas cancer microenvironment. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(16), 4266–4276. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-3114>
- Fichman, Y., Gerdes, S. Y., Kovács, H., Szabados, L., Zilberstein, A., & Csonka, L. N. (2015). Evolution of proline biosynthesis: enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 90(4), 1065–1099. <https://doi.org/10.1111/brv.12146>
- Firnhaber, J. M. (2012). Diagnosis and treatment of Basal cell and squamous cell carcinoma. *American Family Physician*, 86(2), 161–168.
- Giehl, K. (2005). Oncogenic Ras in tumour progression and metastasis. *Biological Chemistry*, 386(3), 193–205. <https://doi.org/10.1515/BC.2005.025>
- Gordon, R. (2013). Skin cancer: an overview of epidemiology and risk factors. *Seminars in Oncology Nursing*, 29(3), 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2013.06.002>
- Gouda, M. A., & Subbiah, V. (2023). Precision oncology for BRAF-mutant cancers with BRAF and MEK inhibitors: from melanoma to tissue-agnostic therapy. *ESMO Open*, 8(2), 100788. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2023.100788>
- Griffin, L. L., Ali, F. R., & Lear, J. T. (2016). Non-melanoma skin cancer. *Clinical Medicine (London, England)*, 16(1), 62–65. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.16-1-62>
- Guo, Y.-J., Pan, W.-W., Liu, S.-B., Shen, Z.-F., Xu, Y., & Hu, L.-L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19(3), 1997–2007. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>
- Haenssle, H. A., Krueger, U., Vente, C., Thoms, K.-M., Bertsch, H. P., Zutt, M., Rosenberger, A., Neumann, C., & Emmert, S. (2006). Results from an observational trial: digital epiluminescence microscopy follow-up of atypical nevi increases the sensitivity and the chance of success of conventional dermoscopy in detecting melanoma. *The Journal of Investigative Dermatology*, 126(5), 980–985. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700119>
- Hillig, R. C., Sautier, B., Schroeder, J., Moosmayer, D., Hilpmann, A., Stegmann, C. M., Werbeck, N. D., Briem, H., Boemer, U., Weiske, J., Badock, V., Mastouri, J., Petersen, K., Siemeister, G., Kahmann, J. D., Wegener, D., Böhnke, N., Eis, K., Graham, K., ... Bader, B. (2019). Discovery of potent SOS1 inhibitors that block RAS activation via

- disruption of the RAS-SOS1 interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(7), 2551–2560. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812963116>
- Huang, K., Fan, J., & Misra, S. (2020). Acral Lentiginous Melanoma: Incidence and Survival in the United States, 2006-2015, an Analysis of the SEER Registry. *The Journal of Surgical Research*, 251, 329–339. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2020.02.010>
- International Agency for Research on Cancer. (2024, February 8). *Melanoma of skin*. <https://gco.iarc.who.int/media/globocan/factsheets/cancers/16-melanoma-of-skin-fact-sheet.pdf>
- Jakob, J. A., Bassett, R. L., Ng, C. S., Curry, J. L., Joseph, R. W., Alvarado, G. C., Rohlf, M. L., Richard, J., Gershenwald, J. E., Kim, K. B., Lazar, A. J., Hwu, P., & Davies, M. A. (2012). NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer*, 118(16), 4014–4023. <https://doi.org/10.1002/cncr.26724>
- Jiang, A. J., Rambhatla, P. V, & Eide, M. J. (2015). Socioeconomic and lifestyle factors and melanoma: a systematic review. *The British Journal of Dermatology*, 172(4), 885–915. <https://doi.org/10.1111/bjd.13500>
- Kolarsick, P. A. J., Kolarsick, M. A., & Goodwin, C. (2011). Anatomy and Physiology of the Skin. *Journal of the Dermatology Nurses' Association*, 3(4), 203–213. <https://doi.org/10.1097/JDN.0b013e3182274a98>
- Lazar, A. M., Costea, D. O., Popp, C. G., & Mastalier, B. (2024). Skin Malignant Melanoma and Matrix Metalloproteinases: Promising Links to Efficient Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(14). <https://doi.org/10.3390/ijms25147804>
- Leiter, U., Eigentler, T., & Garbe, C. (2014). Epidemiology of skin cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 810, 120–140. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0437-2_7
- Lens, M. (n.d.). Current clinical overview of cutaneous melanoma. *British Journal of Nursing (Mark Allen Publishing)*, 17(5), 300–305. <https://doi.org/10.12968/bjon.2008.17.5.28825>
- Leonardi, G. C., Falzone, L., Salemi, R., Zanghì, A., Spandidos, D. A., Mccubrey, J. A., Candido, S., & Libra, M. (2018). Cutaneous melanoma: From pathogenesis to therapy (Review). *International Journal of Oncology*, 52(4), 1071–1080. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4287>
- Lewin, J. M., & Carucci, J. A. (2015). Advances in the management of basal cell carcinoma. *F1000prime Reports*, 7, 53. <https://doi.org/10.12703/P7-53>

- Liu, W., & Phang, J. M. (2012). Proline dehydrogenase (oxidase) in cancer. *BioFactors (Oxford, England)*, 38(6), 398–406. <https://doi.org/10.1002/biof.1036>
- Liu, Y., Mao, C., Wang, M., Liu, N., Ouyang, L., Liu, S., Tang, H., Cao, Y., Liu, S., Wang, X., Xiao, D., Chen, C., Shi, Y., Yan, Q., & Tao, Y. (2020). Cancer progression is mediated by proline catabolism in non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 39(11), 2358–2376. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-1151-5>
- Lovly, C. M., Dahlman, K. B., Fohn, L. E., Su, Z., Dias-Santagata, D., Hicks, D. J., Hucks, D., Berry, E., Terry, C., Duke, M., Su, Y., Sobolik-Delmaire, T., Richmond, A., Kelley, M. C., Vnencak-Jones, C. L., Iafrate, A. J., Sosman, J., & Pao, W. (2012). Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials. *PloS One*, 7(4), e35309. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035309>
- Madan, V., Lear, J. T., & Szeimies, R.-M. (2010). Non-melanoma skin cancer. *Lancet (London, England)*, 375(9715), 673–685. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61196-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61196-X)
- Maertens, O., Johnson, B., Hollstein, P., Frederick, D. T., Cooper, Z. A., Messiaen, L., Bronson, R. T., McMahon, M., Granter, S., Flaherty, K., Wargo, J. A., Marais, R., & Cichowski, K. (2013). Elucidating distinct roles for NF1 in melanomagenesis. *Cancer Discovery*, 3(3), 338–349. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0313>
- Mannino, D., Basilotta, R., De Luca, F., Casili, G., Esposito, E., & Paterniti, I. (2025). KRAS-SOS-1 Inhibition as New Pharmacological Target to Counteract Anaplastic Thyroid Carcinoma (ATC). *International Journal of Molecular Sciences*, 26(6). <https://doi.org/10.3390/ijms26062579>
- Maurer, D. M., Adamik, J., Santos, P. M., Shi, J., Shurin, M. R., Kirkwood, J. M., Storkus, W. J., & Butterfield, L. H. (2020). Dysregulated NF-κB-Dependent ICOSL Expression in Human Dendritic Cell Vaccines Impairs T-cell Responses in Patients with Melanoma. *Cancer Immunology Research*, 8(12), 1554–1567. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-20-0274>
- Mayr, K. G. (2020). *Amino Acid Signalling in Human Melanoma Cells*. Medizinische Universität Wien.
- Menzies, A. M., Long, G. V., & Murali, R. (2012). Dabrafenib and its potential for the treatment of metastatic melanoma. *Drug Design, Development and Therapy*, 6, 391–405. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S38998>
- Mitsubuchi, H., Nakamura, K., Matsumoto, S., & Endo, F. (2008). Inborn errors of proline metabolism. *The Journal of Nutrition*, 138(10), 2016S–2020S. <https://doi.org/10.1093/jn/138.10.2016S>

- Natarelli, N., Aleman, S. J., Mark, I. M., Tran, J. T., Kwak, S., Botto, E., Aflatooni, S., Diaz, M. J., & Lipner, S. R. (2024). A Review of Current and Pipeline Drugs for Treatment of Melanoma. *Pharmaceuticals*, 17(2), 214. <https://doi.org/10.3390/ph17020214>
- Nissan, M. H., Pratilas, C. A., Jones, A. M., Ramirez, R., Won, H., Liu, C., Tiwari, S., Kong, L., Hanrahan, A. J., Yao, Z., Merghoub, T., Ribas, A., Chapman, P. B., Yaeger, R., Taylor, B. S., Schultz, N., Berger, M. F., Rosen, N., & Solit, D. B. (2014). Loss of NF1 in cutaneous melanoma is associated with RAS activation and MEK dependence. *Cancer Research*, 74(8), 2340–2350. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2625>
- Obereigner, B. (2025). *Der SOS1/RAS Interaktionsinhibitor BAY293 reduziert die Viabilität in humanen Melanomzellen durch Störung der Stoffwechselhomöostase*. Universität Wien.
- Olsen, C. M., Zens, M. S., Stukel, T. A., Sacerdote, C., Chang, Y.-M., Armstrong, B. K., Bataille, V., Berwick, M., Elwood, J. M., Holly, E. A., Kirkpatrick, C., Mack, T., Bishop, J. N., Østerlind, A., Swerdlow, A. J., Zanetti, R., Green, A. C., Karagas, M. R., & Whiteman, D. C. (2009). Nevus density and melanoma risk in women: a pooled analysis to test the divergent pathway hypothesis. *International Journal of Cancer*, 124(4), 937–944. <https://doi.org/10.1002/ijc.24011>
- Österreichische Krebshilfe. (2025). *Krebsneuerkrankungen & Krebssterblichkeit in Österreich*. <https://www.krebshilfe.net/information/krebs-in-oesterreich/krebserkrankungen-in-oesterreich>
- Papageorgiou, C., Apalla, Z., Manoli, S.-M., Lallas, K., Vakirlis, E., & Lallas, A. (2021). Melanoma: Staging and Follow-Up. *Dermatology Practical & Conceptual*, 11(Suppl 1), e2021162S. <https://doi.org/10.5826/dpc.11S1a162S>
- Pérez-Sánchez, A., Barrajón-Catalán, E., Herranz-López, M., & Micol, V. (2018). Nutraceuticals for Skin Care: A Comprehensive Review of Human Clinical Studies. *Nutrients*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/nu10040403>
- Plangger, A., Rath, B., Hochmair, M., Funovics, M., & Hamilton, G. (2021). Cytotoxicity of combinations of the pan-KRAS inhibitor BAY-293 against primary non-small lung cancer cells. *Translational Oncology*, 14(12), 101230. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2021.101230>
- Plangger, A., Rath, B., Stickler, S., Hochmair, M., Lang, C., Weigl, L., Funovics, M., & Hamilton, G. (2022). Cytotoxicity of combinations of the pan-KRAS SOS1 inhibitor BAY-293 against pancreatic cancer cell lines. *Discover Oncology*, 13(1), 84. <https://doi.org/10.1007/s12672-022-00550-w>
- Pollock, P. M., Harper, U. L., Hansen, K. S., Yudt, L. M., Stark, M., Robbins, C. M., Moses, T. Y., Hostetter, G., Wagner, U., Kakareka, J., Salem, G., Pohida, T., Heenan, P., Duray, P.,

- Kallioniemi, O., Hayward, N. K., Trent, J. M., & Meltzer, P. S. (2003). High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature Genetics*, 33(1), 19–20. <https://doi.org/10.1038/ng1054>
- Pullar, J. M., Carr, A. C., & Vissers, M. C. M. (2017). The Roles of Vitamin C in Skin Health. *Nutrients*, 9(8). <https://doi.org/10.3390/nu9080866>
- Roky, A. H., Islam, M. M., Ahasan, A. M. F., Mostaq, M. S., Mahmud, M. Z., Amin, M. N., & Mahmud, M. A. (2025). Overview of skin cancer types and prevalence rates across continents. *Cancer Pathogenesis and Therapy*, 3(2), 89–100. <https://doi.org/10.1016/j.cpt.2024.08.002>
- Rubinstein, J. C., Sznol, M., Pavlick, A. C., Ariyan, S., Cheng, E., Bacchiocchi, A., Kluger, H. M., Narayan, D., & Halaban, R. (2010). Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032. *Journal of Translational Medicine*, 8, 67. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-8-67>
- Schadendorf, D., van Akkooi, A. C. J., Berking, C., Griewank, K. G., Gutzmer, R., Hauschild, A., Stang, A., Roesch, A., & Ugurel, S. (2018). Melanoma. *Lancet (London, England)*, 392(10151), 971–984. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31559-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31559-9)
- Situm, M., Buljan, M., Kolić, M., & Vučić, M. (2014). Melanoma--clinical, dermatoscopic, and histopathological morphological characteristics. *Acta Dermatovenereologica Croatica: ADC*, 22(1), 1–12.
- Solit, D., & Sawyers, C. L. (2010). Drug discovery: How melanomas bypass new therapy. *Nature*, 468(7326), 902–903. <https://doi.org/10.1038/468902a>
- Sperat Konstantin. (2024). *Influence of the nonessential amino acid proline on the cell cycle of human melanoma cell lines of different growth phases*. Medizinischen Universität Wien.
- Tromme, I., Sacré, L., Hammouch, F., Legrand, C., Marot, L., Vereecken, P., Theate, I., van Eeckhout, P., Richez, P., Baurain, J. F., Thomas, L., Speybroeck, N., & DEPIMELA study group. (2012). Availability of digital dermoscopy in daily practice dramatically reduces the number of excised melanocytic lesions: results from an observational study. *The British Journal of Dermatology*, 167(4), 778–786. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2012.11042.x>
- van der Leest, R. J. T., Flohil, S. C., Arends, L. R., de Vries, E., & Nijsten, T. (2015). Risk of subsequent cutaneous malignancy in patients with prior melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV*, 29(6), 1053–1062. <https://doi.org/10.1111/jdv.12887>

- Vestergaard, M. E., Macaskill, P., Holt, P. E., & Menzies, S. W. (2008). Dermoscopy compared with naked eye examination for the diagnosis of primary melanoma: a meta-analysis of studies performed in a clinical setting. *The British Journal of Dermatology*, 159(3), 669–676. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2008.08713.x>
- Vettore, L. A., Westbrook, R. L., & Tennant, D. A. (2021a). Proline metabolism and redox; maintaining a balance in health and disease. *Amino Acids*, 53(12), 1779–1788. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03051-2>
- Vettore, L. A., Westbrook, R. L., & Tennant, D. A. (2021b). Proline metabolism and redox; maintaining a balance in health and disease. *Amino Acids*, 53(12), 1779–1788. <https://doi.org/10.1007/s00726-021-03051-2>
- Wasinger Christine, Hohenegger Martin, Spadiut Oliver, & Hofer Alexandra. (2018). *Amino Acid Signature in Human Melanoma Cell Lines from Different Disease Stages*.
- Whittaker, S. R., Theurillat, J.-P., Van Allen, E., Wagle, N., Hsiao, J., Cowley, G. S., Schadendorf, D., Root, D. E., & Garraway, L. A. (2013). A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer Discovery*, 3(3), 350–362. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0470>
- Xu, J., Mu, S., Wang, Y., Yu, S., & Wang, Z. (2024). Recent advances in immunotherapy and its combination therapies for advanced melanoma: a review. *Frontiers in Oncology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fonc.2024.1400193>
- Yousef, H., Alhajj, M., Fakoya, A. O., & Sharma, S. (2025). *Anatomy, Skin (Integument), Epidermis*.