

Histamin und Melanomzelllinien

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr.med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Stefanie Gerlach

geboren am 31.07.1988 in Erfurt

Gutachter:

- 1. Prof. Dr. med. Johannes Norgauer, Universitätsklinikum Jena**
- 2. Prof. Dr. med. Udo Markert, Universitätsklinikum Jena**
- 3. Prof. Dr. med. Maja Mockenhaupt, Univ.-Hautklinik Freiburg**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.06.2015

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzonsulfonylfluorid
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
α -FMH	α -Fluoromethylhistidin
b	Base
bp	Basenpaare
bHK	basale Histaminkonzentration
BSA	Rinderserumalbumin
Ca^{2+}	Kalzium-Ionen
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DAO	Diaminoxidase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie
FCS	fetales Kälberserum
FSC	Vorwärtsstreulicht
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
H^+	Wasserstoff-Ionen
HDC	L-Histidin-Decarboxylase
His	Histamin
HNMT	Histamin-N-Methyltransferase
HRP	Meerrettichperoxidase

H ₁ R	Histamin-H ₁ -Rezeptor
H ₂ R	Histamin-H ₂ -Rezeptor
H ₃ R	Histamin-H ₃ -Rezeptor
H ₄ R	Histamin-H ₄ -Rezeptor
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
JNJ	JNJ7777120
K _i	Dissoziationskonstante
Kon	Kontrolle
Konz	Konzentration
MAO-B	Monoaminoxidase-B
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MTT	Methyltetrazolium
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Hydrid
Na ₃ VO ₄	Natriumorthovanadat
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
NP-40	Nonidet P-40
n.s.	nicht signifikant
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR	Phenolrot
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RPL27	60S ribosomales Protein L27
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Seitwärtsstreulicht
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Th-Zelle	T-Helfer-Zelle
TNM	Tumorklassifikationssystem mit Angabe von Tumorausdehnung, Lymphknotenbefall und Metastasen (Tumor, Nodus, Metastasen)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
unst.	unstimuliert
UV-Strahlung	Ultraviolettstrahlung
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Das Maligne Melanom	3
2.1.1	Klinische und histopathologische Einteilung	4
2.1.2	Therapiemöglichkeiten des malignen Melanoms	4
2.2	Histamin	6
2.2.1	Der Histamin-Stoffwechsel	7
2.2.2	Die Histamin-Rezeptoren	9
2.2.2.1	Die Histamin-Rezeptoren H ₁ R, H ₂ R und H ₃ R	10
2.2.2.2	Der Histamin-H ₄ -Rezeptor	12
2.2.2.3	Der Histamin-H ₄ -Rezeptorantagonist – JNJ7777120	14
2.3	Die Rolle von Histamin und dessen Rezeptoren in neoplastischem Gewebe und Zelllinien	15
2.3.1	Der Histamin-Einfluss auf Melanomzellen	15
2.3.2	Die Bedeutung der L-Histidin-Decarboxylase in Melanomzellen	16
2.3.3	Die Expression und Funktion der Histamin-Rezeptoren auf Melanomzellen....	17
3	Zielsetzung	19
4	Material und Methoden	20
4.1	Material	20
4.1.1	Geräte	20
4.1.2	Verbrauchsmaterial	21
4.1.3	Chemikalien und Reagenzien	21
4.1.4	Stimulantien, Antagonisten und Inhibitoren	24

4.1.5	Antikörper	24
4.1.6	Melanomzelllinien.....	25
4.1.7	Lösungen und Puffer	25
4.1.8	Software	27
4.2	Methoden.....	28
4.2.1	Zellkultivierung.....	28
4.2.2	RNA-Isolierung.....	28
4.2.3	Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration	29
4.2.4	Reverse Transkription	29
4.2.5	Endpunkt-PCR	30
4.2.5.1	Primerpaare der Histamin-H ₁ -, -H ₂ -, -H ₃ - und -H ₄ -Rezeptoren und von RPL27	30
4.2.5.2	PCR-Durchführung	31
4.2.5.3	Agarose-Gelelektrophorese.....	32
4.2.6	Western-Blot	32
4.2.6.1	Probenvorbereitung.....	32
4.2.6.2	SDS-PAGE	33
4.2.6.3	Western-Blot-Durchführung	33
4.2.7	MTT-Test (Zellproliferationstest).....	34
4.2.8	Durchflusszytometrie (FACS).....	37
4.2.9	Histamin-ELISA (<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>)	38
4.2.10	Statistische Auswertung	40
5	Ergebnisse	42
5.1	Histamin-Rezeptornachweis mittels Endpunkt-PCR	42
5.2	Nachweis der L-Histidin-Decarboxylase mittels Western-Blot und Durchflusszytometrie	44
5.3	Die basale Histamin-Sekretion und Auswirkungen einer reversiblen Inhibierung der HDC	47

5.4	MTT-Test (Zellproliferationstest)	49
5.4.1	Stimulation mit Histamin	49
5.4.2	Hemmung der HDC mit dem reversiblen Inhibitor α -Methyl-DL-Histidin	52
5.4.3	Hemmung des Histamin-H ₄ -Rezeptors mit dem Antagonisten JNJ7777120.....	53
5.4.4	Beteiligung des Histamin-H ₄ -Rezeptors bei Histamin-Stimulation.....	57
6	Diskussion	60
7	Schlussfolgerung	66
8	Literaturverzeichnis	68
9	Anhang	86
9.1	Lebenslauf	86
9.2	Ehrenwörtliche Erklärung	87
9.3	Danksagung	88

1 Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist eine Tumorerkrankung, die von den pigmentproduzierenden Melanozyten ausgeht und sich in erster Linie an der Haut manifestiert. Während bei frühzeitiger Diagnostik eine Tumorexzision im Gesunden möglich ist, weist das maligne Melanom bei eingetretener Metastasierung eine zumeist infauste Prognose auf. Um effektive Therapiestrategien zu entwickeln, ist es wichtig, die Mechanismen zu verstehen, die eine Proliferation humaner Melanozyten und Melanomzellen fördern. Die Mechanismen der Tumorentstehung schließen Wachstumsfaktoren ein, zu denen unter anderem Histamin zählt. Histamin als ein biogenes Amin, das im menschlichen Organismus als Vermittler von Entzündungsreaktionen, als Gewebshormon und Neurotransmitter wichtige Funktionen erfüllt, vermittelt seine Effekte über vier G-Protein-gekoppelte Histamin-Rezeptoren (H₁R, H₂R, H₃R, H₄R).

Anhand von Melanomzellen konnte bereits das Vorhandensein von Histamin-Rezeptoren sowie die Expression des Histamin-synthetisierenden Enzyms, der L-Histidin-Decarboxylase, nachgewiesen werden. Experimentelle Studien legen außerdem nahe, dass Melanomzellen Histamin produzieren und sich durch die Histamin-Abgabe in das umgebende Tumorgewebe auf autokrinem und parakrinem Weg beeinflussen. Eine Wirkung von Histamin ist die Proliferationssteigerung von Melanomzellen vorrangig über den H₂R. Demgegenüber wird dem H₁R eine Hemmung der Proliferation zugeschrieben und über den H₃R konnte keine Proliferationsbeeinflussung nachgewiesen werden. Welche Rolle jedoch dem H₄R im Wachstumsverhalten von Melanomzellen zukommt, konnte bisher nicht ausreichend geklärt werden.

Ziel dieser Arbeit war der Nachweis einer autonomen Histamin-Produktion der vier Melanomzelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058 sowie der Nachweis einer Proliferationsbeeinflussung dieser Zelllinien durch Eingriff in den Histamin-Synthese bzw. den Histamin-Signalweg. Es erfolgte zunächst die Analyse der Rezeptorexpression mittels Endpunkt-PCR. Anschließend wurde mittels Durchflusszytometrie und Western-Blot das Histamin-synthetisierende Enzym, die L-Histidin-Decarboxylase, nachgewiesen sowie im ELISA eine basale Histamin-Sekretion überprüft. Um den Proliferationseinfluss von Histamin auf die vier Melanomzelllinien zu testen, wurden Proliferationstests mit externer Histamin-Stimulation, mit Hemmung der L-Histidin-Decarboxylase und dem H₄-Rezeptorantagonisten JNJ7777120 durchgeführt. Bei Hemmung der L-Histidin-Decarboxylase wurde nicht nur der

Proliferationseinfluss getestet, es wurde ebenso die 72-stündige Auswirkung auf die Histamin-Sekretion mittels ELISA überprüft.

Folgende Ergebnisse demonstrieren eine Beeinflussung von Melanomzellen durch Eingriff in den Histamin-Synthese und -Signalweg: Bei den Zelllinien Mel Ei, A375 und A2058 konnte die mRNA-Expression aller vier Histaminrezeptoren nachgewiesen werden. Die Zelllinie Mel G exprimiert nur die mRNA des H₂R. Die L-Histidin-Decarboxylase wurde von allen vier Zelllinien auf Protein-Ebene exprimiert. Ebenso war eine basale Histamin-Sekretion nachweisbar, die nur bei den Zelllinien Mel Ei und A375 durch HDC-Hemmung signifikant abnahm. Im Proliferationstest zeigten alle Zelllinien unter Histamin-Stimulation mit 10nM eine Proliferationssteigerung. Eine Hemmung der L-Histidin-Decarboxylase im Proliferationstest führte jedoch nur bei der Zelllinie Mel G zu einer signifikanten Wachstumshemmung. Nach Antagonisierung des H₄R durch JNJ7777120 war keine Auswirkung auf die autonome Proliferation zu erkennen. Unter gleichzeitiger Histamin-Stimulation (10nM) und H₄-Rezeptorantagonisierung durch 10µM JNJ7777120 sank die Proliferation signifikant bei den Zelllinien Mel Ei, A375 und A2058.

In der vorliegenden Arbeit konnte mit dem Nachweis der L-Histidin-Decarboxylase, der basalen Histamin-Sekretion und der mRNA-Expression der Histamin-Rezeptoren gezeigt werden, dass Melanomzellen nicht nur zur autonomen Histamin-Produktion in der Lage sind, sondern die Voraussetzungen einer autokrinen und parakrinen Beeinflussung umgebender Zellen erfüllen. Es gelang außerdem der Nachweis, dass Histamin in Konzentrationen, die die autonome Histamin-Sekretion durch die Melanomzellen übersteigt, über den H₂R eine Proliferationssteigerung bewirkt. Dagegen scheint Histamin unter autonomen Bedingungen, nur einen geringen Einfluss auf das Proliferationsverhalten zu haben, wie die fehlende Proliferationshemmung von drei Zelllinien bzw. der fehlende Einfluss einer verminderten Histamin-Sekretion nach HDC-Hemmung ergab. Unter autonomer Histamin-Abgabe konnte ebenfalls keine H₄R-Funktion auf die Proliferation nachgewiesen werden. Erst unter gleichzeitiger externer Histamin-Stimulation trägt der H₄R zur Proliferationssteigerung von Melanomzellen bei.

Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Auswirkungen der autonomen Histamin-Synthese auf eine direkte Proliferationsbeeinflussung gering sind. Durch die parakrine Wirkung von Histamin auf umgebende Zellen (z.B. Immunzellen) bleibt jedoch zu bedenken, dass Histamin auch als indirekter Wachstumsfaktor die Mikroumgebung von Tumorzellen beeinflusst, und so deren Überleben und Wachstum ermöglichen könnte.

2 Einleitung

2.1 Das Maligne Melanom

Das maligne Melanom ist ein von den pigmentproduzierenden Melanozyten ausgehender Tumor, der sich vorrangig an der Haut manifestiert. Aufgrund der schnellen hämatogenen und lymphogenen Metastasierungstendenz zählt das maligne Melanom zu den Tumoren mit einer ungünstigen Prognose. Insbesondere sein aggressives Wachstumsverhalten mit ausgeprägter Therapieresistenz sind Ursachen der zumeist infausten Prognose bei einer Melanom-erkrankung im Stadium der Metastasierung. So sind 90% aller Sterbefälle durch Hauttumore auf das maligne Melanom zurückzuführen (Altmeyer und Paech 2010).

Im direkten Vergleich mit anderen Tumorarten war das maligne Melanom im Jahr 2008 bei Frauen auf Platz fünf und bei Männern auf Platz acht der häufigsten soliden Tumorentitäten in Deutschland zu verzeichnen (Kaatsch et al. 2012). Innerhalb des Zeitraums von 1999-2008 stiegen die Inzidenzraten bei Männern von 13,7 auf 22,1 je 100.000 Einwohner und bei Frauen von 16,5 auf 21,2 je 100.000 Einwohner (Kaatsch et al. 2012). Zum Vergleich liegen die Inzidenzen in Australien bei 50-60 je 100.000 Einwohner (Jones et al. 1999). Die Inzidenzen stiegen insbesondere bei der hellhäutigen Bevölkerungsgruppe (Armstrong und Kricke 1994). Ebenso mit einzubeziehen ist die Tatsache, dass die verbesserten Diagnostikmöglichkeiten ein Grund steigender Inzidenzraten in den letzten Jahren sind. Diese ermöglichen heute die Behandlung in frühen, meist lokal begrenzten Stadien der Melanomerkkrankung und bedeuten eine deutlich bessere Prognose für den Patienten (Lasithiotakis et al. 2007).

Die infauste Prognose einer eingetretenen Fernmetastasierung spiegelt die mediane Überlebenszeit der Patienten von durchschnittlich acht Monaten sowie eine 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 3% wider (Orfanos et al. 1994). Im Gegensatz dazu liegt nach Diagnosestellung und Therapie die 10-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit im Stadium der lokalen Tumorausbreitung bei einer Tumordicke unter 1mm (nach Breslow) noch zwischen 85% und 99% in Abhängigkeit der Mitoserate und dem Vorhandensein von Ulzerationen (Balch et al. 2009).

Es gibt Faktoren, die das Risiko an einem malignen Melanom zu erkranken, erhöhen. Der wichtigste Risikofaktor ist eine hohe Anzahl melanozytärer Nävi bzw. das Vorliegen dysplastischer Nävi (Swerdlow et al. 1986, Holly et al. 1987, Grob et al. 1990, Garbe et al. 1994). Zusätzlich zu den genannten Risikofaktoren werden etwa 5-10% aller malignen Melanome auf polygene Erbfaktoren zurückgeführt (Greene et al. 1985).

2.1.1 Klinische und histopathologische Einteilung

Klinisch und histologisch wird das maligne Melanom in vier Hauptformen unterteilt: Das superfiziell spreitende Melanom tritt bei Kaukasiern mit 65% aller malignen Melanome am häufigsten auf und hat mit einer zunächst horizontalen Ausbreitungsphase bei frühzeitiger Diagnosestellung und einer vollständigen Resektion eine gute Prognose. Das noduläre Melanom wächst sofort in die Tiefe und zeigt keine horizontale Wachstumsphase. Eine weitere Form ist das Lentigo-maligna-Melanom als Tumor, der fast ausschließlich im Gesichtsbereich älterer Patienten auftritt. Das akrolentiginöse Melanom kommt vorwiegend palmoplantar, sub- oder periungual vor (Clark et al. 1969). Neben den vier Hauptformen werden als Sonderformen das amelanotische Melanom sowie Schleimhaut- oder extrakutane Melanome mit einem Gesamtanteil aller malignen Melanome von 5% zusammengefasst.

Die AJCC-Klassifikation (*American Joint Committee on Cancer*) von 2009 beschreibt das Ausmaß der anatomischen Ausbreitung des malignen Melanoms und stellt den heutigen Standard der histopathologischen Befundung dar (Balch et al. 2009). Entsprechend der AJCC erfolgt die TNM-Klassifikation (T *Primärtumor*, N *Lymphknotenbefall*, M *Metastasen*) und Stadieneinteilung nach folgenden Kriterien (Balch et al. 2009). Die Einteilung erfolgt anhand der Gesamttumordicke nach Breslow (Büttner et al. 1995). Im Stadium I ist die Tumordicke kleiner als 1mm bzw. im Stadium II größer als 1mm. Weitere Kriterien für diese beiden Stadien, die eine genauere Stadieneinteilung ermöglichen (IA, IB, IIA, IIB), sind das Vorliegen einer Ulzeration des Primärtumors und die erhöhte Mitoserate. Zum anderen definieren die Stadien III und IV das Auftreten von Metastasen mit dem Stadium III als Korrelat zu regionären Lymphknotenmetastasen und dem Stadium IV bei Auftreten von systemischen Metastasen. Von der Metastasierung vorrangig betroffene Organsysteme sind neben der Haut, die Lymphknoten, die Lunge, die Leber, das Gehirn, das Skelettsystem und die Nebennieren.

2.1.2 Therapiemöglichkeiten des malignen Melanoms

Im Stadium I besteht die Therapiemöglichkeit primär in der operativen Entfernung des Tumors mit einem Sicherheitsabstand in Abhängigkeit von der Tumordicke und dem damit verbundenen Metastasierungsrisiko. Dabei ist die chirurgische Exzision die einzige kurative Behandlungsoption.

Ist eine operative Tumorentfernung oder eine vollständige Resektion nicht möglich, besteht die Indikation zur Strahlentherapie. Insgesamt zeigt sich nach Applikation der Strahlen-

therapie keine Verlängerung des Gesamtüberlebens (Ang et al. 1994, Burmeister et al. 1995, Fuhrmann et al. 2001, Ballo et al. 2002). Es gibt jedoch positive Ergebnisse einer Strahlentherapie bezüglich der lokalen Tumorkontrolle (Kirova et al. 1999).

Als adjuvante Therapie bei Patienten mit erhöhtem Metastasierungsrisiko war Interferon- α die erste Substanz, die in prospektiv randomisierten Studien zu einer signifikanten Verlängerung der rezidivfreien Überlebenszeit geführt hat (Kirkwood et al. 1996, Rusciani et al. 1997, Grob et al. 1998, Pehamberger et al. 1998, Cameron et al. 2001).

Die Behandlungsoption der Chemotherapie wird bei Patienten mit eingetretener Metastasierung oder inoperablen Rezidivtumoren durchgeführt, um die Überlebenszeit zu verlängern und die Beschwerden zu lindern. Für die systemische Monotherapie stehen verschiedene, annähernd gleichwertige Substanzen zur Verfügung. Das älteste zugelassene Chemotherapeutikum zur Behandlung des malignen Melanoms ist Dacarbazin. In klinischen Studien zeigte Dacarbazin als Monochemotherapie objektive Remissionen in 5,3-28,6% der Erkrankungsfälle (Moon et al. 1975, Chiarion Sileni et al. 2001). Eine Kombination von mehreren Zytostatika oder Zytokinen zeigte trotz erhöhter objektiver Ansprechraten keine signifikante Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit im Vergleich zu der Monotherapie. Gleichzeitig wird jedoch die Toxizität potenziert (Falkson et al. 1998, Chapman et al. 1999, Dorval et al. 1999, Chiarion Sileni et al. 2001, Eton et al. 2002, Ridolfi et al. 2002).

Neuerdings ist die alleinige Immuntherapie mit Ipilimumab bei nicht resezierbaren Metastasen anwendbar. Ipilimumab ist ein humaner IgG1-monoklonaler Antikörper, welcher die Aktivierung und Proliferation von T-Zellen sowie deren Antitumor-Immunität fördert (Weber et al. 2009, Hodi et al. 2010, O'Day et al. 2010, Wolchok et al. 2010).

Weitere Therapiemöglichkeiten stellen der Nachweis einer BRAF- oder einer c-Kit-Mutation dar. Das am häufigsten mutierte Onkogen in Melanomzellen ist BRAF und kann bei etwa 50% der Primärtumoren nachgewiesen werden (Willmore-Payne et al. 2005, Goel et al. 2006). Hingegen ist eine c-Kit-Mutation nur bei etwa 5% der akralen und mukosalen Melanome nachweisbar (Guerriere-Kovach et al. 2004, Willmore-Payne et al. 2005). Es stehen spezifische BRAF- bzw. c-Kit-Inhibitoren (z.B. Vemurafenib, Dabrafenib, Imatinib) zur Verfügung, die gezielt die Mutation aktivierender Onkogene inhibieren. Eine Testung auf diese Mutationen sollte beim Vorhandensein von Metastasen und chirurgisch nicht resektablen Tumoren erfolgen. Bei 50-80% der behandelten Patienten führt der Einsatz von BRAF-Inhibitoren zu einer Tumorrückbildung (Chapman et al. 2011, Ribas et al. 2011).

Die Entwicklung neuer, wirksamer Therapiestrategien und die Weiterentwicklung vorhandener Ansätze sind aufgrund der zumeist infausten Prognose des malignen Melanoms,

vor allem bei eingetretener Metastasierung, dringend notwendig. Ein wichtiger Ansatzpunkt wären zum Beispiel Wachstumsfaktoren wie das Histamin als körpereigenes, biogenes Amin. Histamin wurde bereits in verschiedenen Tumorentitäten, wie dem Kolonkarzinom oder dem Brustkrebs, als Wachstumsfaktor beschrieben (Adams et al. 1994, Cricco et al. 1994, Garcia-Caballero et al. 1994, Medina et al. 2008).

2.2 Histamin

1907 entdeckten die deutschen Chemiker Windaus und Vogt die Synthese des Stoffes 2-(4-Imidazolyl)-Ethylamin (Abb. 1), der 1910 von Dale und Barger im Mutterkorn und somit als Naturstoff nachgewiesen wurde. Im gleichen Jahr konnten Dale und Laidlow diesen Stoff als körpereigene Substanz nachweisen und die grundlegenden Funktionen der Wirkung auf glatte Muskelzellen und den Blutdruck aufklären. Erst 1927, nach der Isolation des Stoffes aus Leber- und Lungengewebe, erhielt das 2-(4-Imidazolyl)-Ethylamin nach den griechischen Wörtern „histos“ (= Gewebe) und „amin“ (=stickstoffhaltige Verbindung) den Namen Histamin (Best et al. 1927).

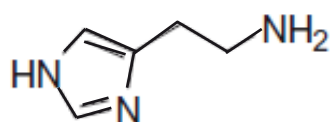


Abb. 1: Strukturformel von Histamin (Leurs et al. 2009)

Histamin spielt, wie man heute weiß, im menschlichen Organismus eine bedeutende Rolle als Gewebshormon und Neurotransmitter, dem vor allem im Rahmen des Immunsystems, speziell bei inflammatorischen Reaktionen, eine große Bedeutung zukommt. So ist Histamin in erster Linie als Mediatorsubstanz, durch seine chemotaktische Wirkung, an der Abwehr körperfremder Stoffe sowie an der Symptomatik von Entzündungsreaktionen und allergischen Reaktionen beteiligt. Lokal gebildetes Histamin vermittelt ebenso im Magen-Darm-Trakt unter anderem die Säureproduktion und ist beteiligt an der Motilität. Eine Senkung der Magensäureproduktion durch Antihistaminika wird vor allem in der Therapie peptischer Ulcera genutzt. Im zentralen Nervensystem (ZNS) entfaltet lokal gebildetes Histamin seine Wirkung zum einen durch Hemmung seiner eigenen Produktion über präsynaptische Autorezeptoren, zum anderen hemmt es die Neurotransmitterfreisetzung durch Heterorezeptoren. Die Auswirkungen spiegeln sich in der zentralen Regulation des Erbrechens, der

Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus, der Körpertemperatur, der zentralen Blutdruck-Kontrolle und der Schmerzempfindung wider (Sinha et al. 1969, Nowak et al. 1979, Klein und Gertner 1981, Kalivas et al. 1982, Arrang et al. 1983, Schlicker et al. 1988, Schlicker et al. 1989, Monti et al. 1991, Clapham und Kilpatrick 1992, Giovannini et al. 1999, Itoh et al. 1999, Attoub et al. 2001, Toyota et al. 2002). Weitere wichtige Funktionsbereiche liegen in der Vermittlung positiv chronotroper und inotroper Effekte am Herzen sowie in der Beeinflussung von Zellproliferation und Zelldifferenzierung, insbesondere im Rahmen der Wundheilung und in der Hämatopoese (Kawaguchi-Nagata et al. 1988, László et al. 2001, Szeberényi et al. 2001).

2.2.1 Der Histamin-Stoffwechsel

Bereits 1910 entdeckte Ackermann die Synthese von Histamin aus der Aminosäure L-Histidin, indem durch einen pyridoxalphosphatabhängigen Decarboxylierungsschritt Kohlendioxid von der Aminosäure abgespalten wird. Katalysiert wird die Reaktion hauptsächlich über ein cytoplasmatisches Enzym, die L-Histidin-Decarboxylase (Abb. 2). Aufgrund des Reaktionsmechanismus gehört die L-Histidin-Decarboxylase (HDC) wie die DOPA-Decarboxylase, die Glutamat-Decarboxylase und die Ornithin-Decarboxylase zur Familie der pyridoxalphosphatabhängigen Aminosäuredecarboxylasen (Hayashi 1995). Daneben ist die aromatische L-Aminosäure-Decarboxylase ebenso an der Bildung von Histamin beteiligt, jedoch in deutlich geringerem Ausmaß und vorrangig in der Niere, der Leber und im fetalen Gewebe.

Bekannte Enzyminhibitoren der HDC sind der irreversible Hemmer α -Fluoromethylhistidin (α -FMH) und der reversible Hemmer α -Methyl-DL-Histidin (Watanabe et al. 1990, Francis et al. 2012).

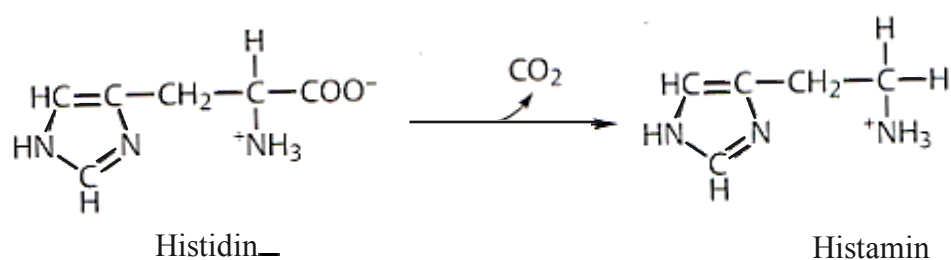


Abb. 2: Decarboxylierung (CO_2 -Abspaltung) der Aminosäure L-Histidin in einer pyridoxalphosphatabhängigen Reaktion zu Histamin (modifiziert nach Rassow et al. 2008).

Zellen, die einen hohen Histamin-Gehalt aufweisen, exprimieren auch die HDC als Histaminsynthetisierendes Enzym. Die höchsten Konzentrationen an Histamin finden sich bei gesunden Personen in Mastzellen und Basophilen. Hier wird Histamin bis zur Exocytose über eine ionische Bindung an Heparin gebunden und in Vesikeln gespeichert. Weitere Zellen mit hohem Histamin-Gehalt sind Histaminspeichernde Zellen der Schleimhäute, der Bronchien und des Magen-Darm-Traktes, sowie Thrombozyten, endokrine Zellen und Zellen des ZNS (Håkanson und Owman 1967, Soll et al. 1981, Masini et al. 1998). Während sich hohe HDC-Level ebenso in schnell proliferierendem Gewebe, wie embryonalem Gewebe oder im Rahmen der Wundheilung nachweisen lassen (Bartholeyns und Fozard 1985), weisen auch Tumorgewebe, wie das Kolonkarzinom, der Brustkrebs und Melanomzellen, einen hohen HDC-Gehalt und damit die Fähigkeit der autonomen Histamin-Synthese auf.

Der Abbau von Histamin erfolgt über zwei Wege (Schayer et al. 1953, Schayer und Karjala 1956, Schayer 1959, Yamauchi et al. 1994). So erfolgt vor allem im ZNS die Inaktivierung durch die Histamin-N-Methyltransferase (HNMT) zum N-Methylhistamin, welches im nachfolgenden Schritt durch Monoaminoxidasen (MAO-B), Diaminoxidasen (DAO) und Aldehydoxidasen (=Aldehyd-Dehydrogenase) zur N-Methyl-Imidazolessigsäure abgebaut wird (Schwartz et al. 1991). In der Peripherie erfolgt der Abbau direkt ohne vorherige Methylierung durch oxidative Desaminierung zur Imidazolessigsäure, die nach anschließender Ribosylierung über die Nieren ausgeschieden wird (Abb. 3).

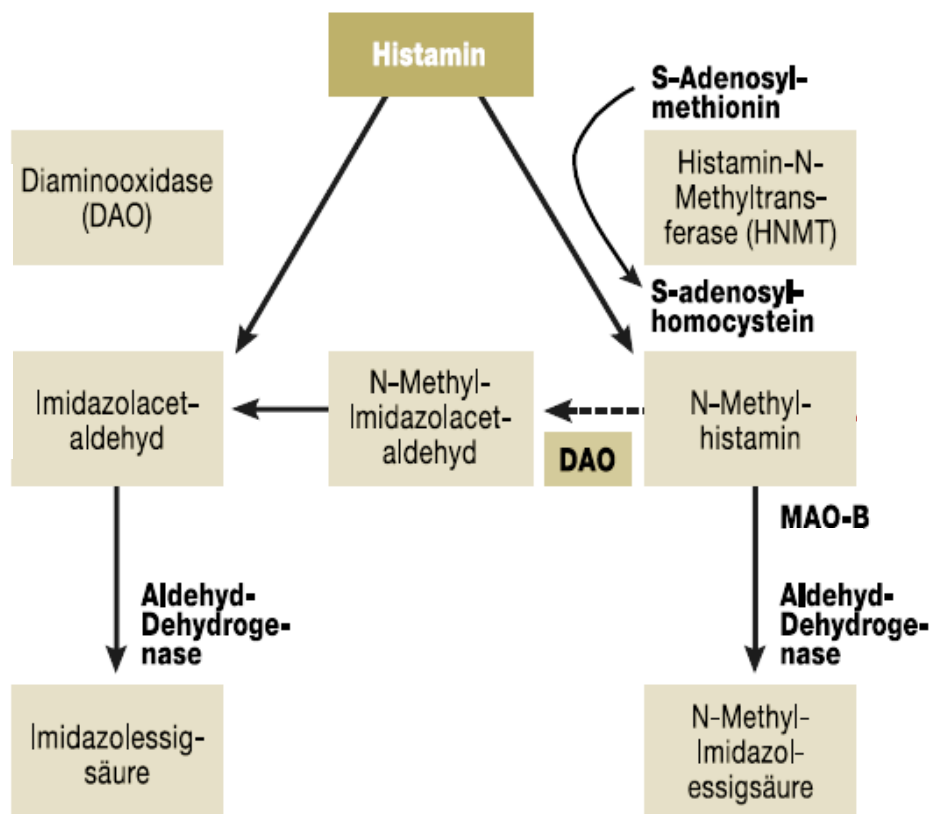


Abb. 3: Der Abbau von Histamin (modifiziert nach Maintz et al. 2006). Histamin kann über zwei Wege abgebaut werden. Im ZNS erfolgt der Abbau in erster Linie über die Histamin-N-Methyltransferase (HNMT) zum N-Methylhistamin. Anschließend kann N-Methylhistamin durch die MAO-B oder die DAO oxidiert werden. Ein weiterer Weg des Histamin-Katabolismus, der vor allem in der Peripherie für den Histamin-Abbau verantwortlich ist, erfolgt direkt über die DAO und die Aldehyd-Dehydrogenase ohne vorherige Methylierung zur Imidazolessigsäure.

2.2.2 Die Histamin-Rezeptoren

Seine Wirkung entfaltet Histamin über vier Rezeptoren, die zu der Familie der G-Proteingekoppelten Rezeptoren gehören (Gantz et al. 1991, Yamashita et al. 1991, Lovenberg et al. 1999, Oda et al. 2000). Diese werden auch als heptahelikale, transmembrane Rezeptoren bezeichnet, da sie siebenmal die Plasmamembran durchqueren. Gekoppelt sind die Rezeptoren an intrazellulär gelegene, heterotrimere G-Proteine mit drei Untereinheiten: α -, β - und γ - Untereinheit (Abb. 4). Es existieren verschiedene Untergruppen, von denen vor allem die $G\alpha_s$, die $G\alpha_{q/11}$ und die $G\alpha_{i/o}$ -Untereinheit für die Histamin-Rezeptoren eine wichtige Rolle spielen. Die Aktivierung der G-Proteine führt zur Aktivierung einer Signalkaskade im Inneren der Zelle.

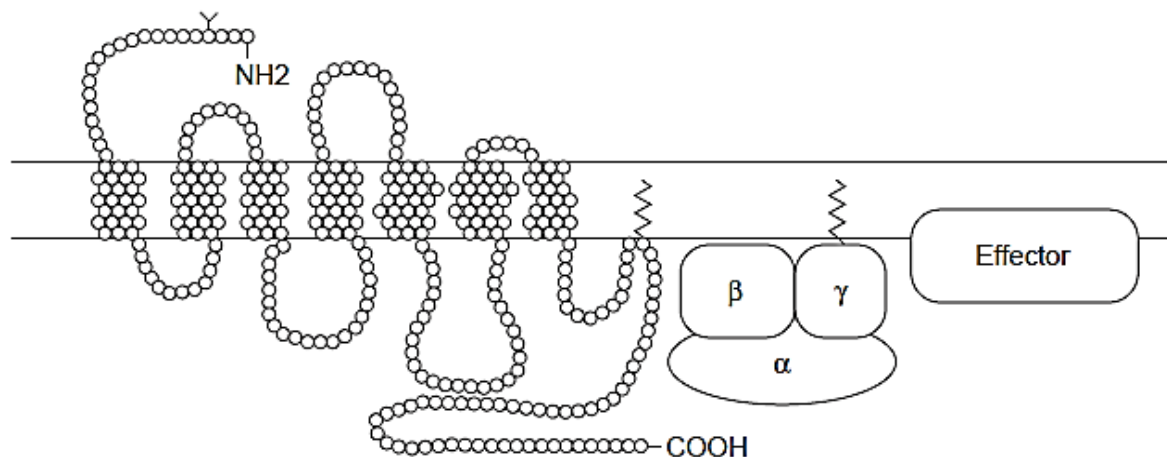


Abb. 4: Schematische Darstellung der Signalübertragung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren. Nach Histamin-Bindung am transmembranen Rezeptor wird das Signal über G-Proteine ins Zellinnere weitergeleitet (Smit et al. 1999).

Die Entdeckung der vier Histamin-Rezeptoren nahm seinen Anfang 1966, als die Unterscheidung in den Histamin-H₁-Rezeptor und den Histamin-H₂-Rezeptor (H₁R, H₂R) erfolgte (Ash und Schild 1966). Mit pharmakologischen Methoden gelang Arrang und seiner Forschungsgruppe 1983 der Nachweis des Histamin-H₃-Rezeptors (H₃R). Im Jahr 2000 konnte nach Entschlüsselung des menschlichen Genoms der Nachweis des Histamin-H₄-Rezeptors (H₄R) erbracht werden, der durch seine starke Homologie zum H₃R lange Zeit unentdeckt blieb (Nakamura et al. 2000).

Zu beachten ist, dass die Bindungsaffinität des Histamins zwischen den vier Histamin-Rezeptoren schwankt mit einem K_i von 2-10 μM für den H₁R und den H₂R und einem K_i von 2-10 nM für den H₃R und H₄R (Leurs et al. 1995, O'Reilly et al. 2002). K_i ist dabei die Dissoziationskonstante und gibt an, welcher Anteil eines Liganden im Mittel an ein Protein bzw. einen Rezeptor gebunden ist und ist damit ein Maß für die Affinität des Proteins bzw. Rezeptors zu seinem Substrat.

2.2.2.1 Die Histamin-Rezeptoren H₁R, H₂R und H₃R

Der aus 487 Aminosäuren bestehende H₁R ist auf Chromosom 3 lokalisiert und weist ein Molekulargewicht von 56 kDa auf (De Backer et al. 1993, Fukui et al. 1994, Le Coniat et al. 1994). Er wird von einer Vielzahl von Zellen exprimiert, wie Zellen des Bronchialsystems, Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen, Herzmuskelzellen, Hepatozyten, Chondrozyten, Nervenzellen, Dendritische Zellen, Monozyten, Neutrophile sowie T- und B-Zellen (Kanba

und Richelson 1984, Casale et al. 1985, Cameron et al. 1986, Hill 1990, Villemain et al. 1990, Okayama et al. 1992). Eine Rezeptorstimulation durch Histamin oder Agonisten führt zur Aktivierung der G-Protein-Untereinheit $G\alpha_{q/11}$, welche das extrazelluläre Signal über die Phospholipase C ins Zellinnere weiterleitet und eine Ca^{2+} -Mobilisierung aktiviert (Tilly et al. 1990). Funktionelle Folgen einer Ca^{2+} -Ausschüttung sind vorrangig die Kontraktion glatter Muskel- und Endothelzellen größerer Gefäße ($>80\mu\text{m}$) sowie die Dilatation kleinerer Gefäße (Toda 1987). Dies macht den H_1R zum Mediator zahlreicher pathologischer Prozesse, die vor allem allergische und inflammatorische Reaktionen betreffen wie die allergische Rhinitis, Konjunktivitis, Urtikaria, Asthma, Anaphylaxie oder die atopische Dermatitis (Hill 1990).

Im Vergleich zum H_1R liegt der H_2R auf Chromosom 5 und besteht aus 359 Aminosäuren (Traiffort et al. 1995). Bei einer Stimulation des Rezeptors wird das G-Protein $G\alpha_s$ aktiviert, in dessen Folge es über die Adenylatcyclase zu einer Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration (cyclisches Adenosinmonophosphat) kommt (Hill et al. 1997). Seine bedeutendsten Funktionen liegen in einer Steigerung der Magensäureproduktion, einer positiv chrono- und inotropen Wirkung am Herzmuskel sowie einer Vasodilatation an kleinen Gefäßen ($<80\mu\text{m}$) und an Pulmonalgefäßen (Black et al. 1972, Johnson et al. 1979, Hill et al. 1997).

Mit einem Molekulargewicht von 70kDa liegt das Gen des H_3R auf Chromosom 20. Eine Aktivierung führt über das G-Protein $G\alpha_{i/o}$ zu einer Hemmung der Adenylatcyclase mit Senkung der cAMP-Konzentration, sowie zur Erhöhung der Ca^{2+} -Konzentration und der Aktivierung des MAPK - (Mitogen-aktivierende Proteinkinase) Signalweges (Clark et al. 1993, Endou et al. 1993, Clark und Hill 1996, Laitinen et al. 1998, Lovenberg et al. 1999). Der H_3R ist vor allem im ZNS von Bedeutung mit einem hohen Vorkommen in den Basalganglien, dem Hippocampus und dem Kortex. Da der Rezeptor im ZNS sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert ist, fungiert er zum einen als Autorezeptor und hemmt die Histamin-Freisetzung an histaminergen Neuronen. Zum anderen beeinflusst er als Heterorezeptor andere Neurotransmitter und ist damit an der Regulation des Schlaf-Wach-Rhythmus, der Nahrungsaufnahme, der Körpertemperatur, des Gedächtnisses und anderen homöostatischen Prozessen beteiligt (Arrang et al. 1983, Schlicker et al. 1988, Schlicker et al. 1989, Monti et al. 1991, Clapham und Kilpatrick 1992, Giovannini et al. 1999, Itoh et al. 1999, Attoub et al. 2001, Toyota et al. 2002).

2.2.2.2 Der Histamin-H₄-Rezeptor

Der H₄R wurde erst nach Entschlüsselung des menschlichen Genoms im Jahr 2000 das erste Mal beschrieben. Das Rezeptorgen ist auf Chromosom 18q11.2 lokalisiert und codiert ein Protein aus 390 Aminosäuren (Nakamura et al. 2000, Oda et al. 2000, Cogé et al. 2001, Liu et al. 2001, Nguyen et al. 2001, Zhu et al. 2001). Auffällig ist die große Sequenzhomologie zum H₃R von insgesamt 37% bis 43% bzw. 58% in den transmembranen Regionen (Oda et al. 2000, Morse et al. 2001, Nguyen et al. 2001). Dagegen beträgt die Homologie zu dem H₁R und dem H₂R nur 18,9% bzw. 18,1% (Zhu et al. 2001). Vermittelt werden die Funktionen des Rezeptors über die G $\alpha_{i/0}$ -Untereinheit der G-Proteine (Oda et al. 2000, Hofstra et al. 2003). Diese inhibiert die Adenylatcyclase und damit die cAMP-Konzentration (Nakamura et al. 2000, Oda et al. 2000, Zhu et al. 2001). Ein weiterer Signalweg ist die Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase-Kaskade (Morse et al. 2001). In eosinophilen Granulozyten und Mastzellen wird durch den H₄R außerdem die Phospholipase C und damit der Ca²⁺-Anstieg aktiviert (Abb. 5) (Buckland et al. 2003, Hofstra et al. 2003).

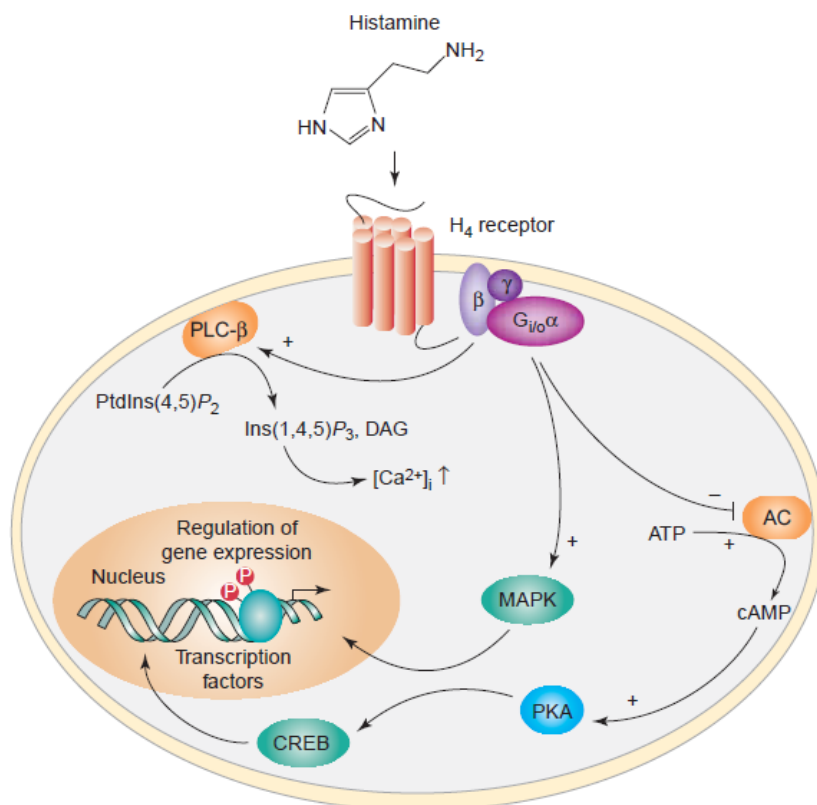


Abb. 5: Schematische Darstellung der Signalkaskade des H₄R. Nach Aktivierung des transmembranen Rezeptors werden intrazellulär an den Rezeptor gekoppelte G-Proteine aktiviert. Eine Rezeptorbindung durch Histamin führt zur Aktivierung der G-Protein-Untereinheit Gα_{i/o}, in dessen Folge es zur Hemmung der Adenylatcyclase (AC) und damit einer Senkung der cAMP-Konzentration kommt. Ebenso wird der MAP-Kinase-Signalweg (MAPK) aktiviert. Ein weiterer Weg der Signalübertragung, der in eosinophilen Granulozyten und Mastzellen durch die Gβγ-Untereinheiten aktiviert wird, ist die Ca²⁺-Freisetzung nach Aktivierung der Phospholipase C (PLC-β) (De Esch et al. 2005).

Die Bedeutung des H₄R liegt vor allem in der Vermittlung von Entzündungsvorgängen, was auch seine vorrangige Expression auf hämatopoetischen Zellen, wie Eosinophilen, Mastzellen, dendritischen Zellen, T-Zellen und Monocyten, verdeutlicht (Liu et al. 2001, Morse et al. 2001, Zhu et al. 2001, Dijkstra et al. 2007, Dijkstra et al. 2008). Weitere Zellen, auf denen der H₄R beschrieben wurde, sind Zellen des intestinalen Epithels, der Milz, des Thymus, der Lunge, des Magens, des ZNS, der nasalen Mukosa und enterischer Neurone (Nakamura et al. 2000, Oda et al. 2000, Cogé et al. 2001, Liu et al. 2001, Cianchi et al. 2005, Medina et al. 2006, Medina et al. 2008, Connelly et al. 2009).

Heute bekannte Funktionen des Rezeptors sind beispielsweise eine durch Histamin-Bindung ausgelöste chemotaktische Wirkung auf Eosinophile und Mastzellen, eine IL16-Freisetzung aus CD8⁺-Lymphozyten, eine Rekrutierung von Neutrophilen und die Ca²⁺-Mobilisation in

Mastzellen (Gantner et al. 2002, O'Reilly et al. 2002, Buckland et al. 2003, Hofstra et al. 2003, Takeshita et al. 2003). Dies bietet einen potentiellen Angriffspunkt in der Behandlung inflammatorischer Erkrankungen. Ferner ist bei der Schmerzempfindung, Autoimmunerkrankungen sowie dem Kolon- und Brustkrebs eine Beeinflussung durch den H₄R bekannt (Cianchi et al. 2005, Maslinska et al. 2006, Medina et al. 2006, Medina et al. 2008).

2.2.2.3 Der Histamin-H₄-Rezeptorantagonist – JNJ7777120

Um den H₄R besser zu verstehen, ist die Entwicklung des selektiven Nicht-Imidazol-Antagonisten, JNJ7777120, von Bedeutung, da dieser eine über 1000-fach höhere Selektivität zum H₄R gegenüber den anderen Histamin-Rezeptoren zeigt (Jablonowski et al. 2003, Thurmond et al. 2004). Chemisch handelt es sich um 1-[(5-Chloro-1H-indol-2-yl)carbonyl]-4-methyl-piperazine (Abb. 6). Aufgrund der Funktionen des H₄R könnte der Rezeptorantagonist eine potentielle Rolle in der Behandlung von inflammatorischen Reaktionen spielen (Thurmond et al. 2004). Jedoch ist hinsichtlich einer klinischen Verwendung zu bedenken, dass die orale Bioverfügbarkeit des JNJ7777120 mit 22% und die *in-vivo*-Halbwertszeit von 0,8h sehr gering sind (Venable et al. 2005).

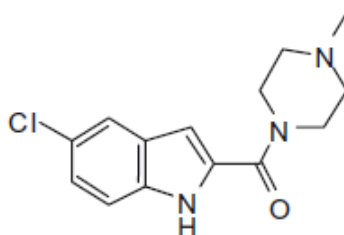


Abb. 6: Strukturformel des Histamin-H₄-Rezeptorantagonisten JNJ7777120 (Leurs et al. 2009)

2.3 Die Rolle von Histamin und dessen Rezeptoren in neoplastischem Gewebe und Zelllinien

Histamin hat nicht nur Auswirkungen auf die Regeneration normaler Zellen, zum Beispiel im Rahmen der Wundheilung, sondern auch auf die Proliferation maligner Zellen.

Experimentelle Studien konnten belegen, dass Histamin in verschiedenen Neoplasien, wie zum Beispiel dem Kolonkarzinom und dem Brustkrebs, nicht nur synthetisiert wird, sondern auch als Wachstumsfaktor die Proliferation beeinflusst (Tutton und Barkla 1983, Garcia-Caballero et al. 1988, Adams et al. 1994, Cricco et al. 1994, Medina et al. 2008). So konnten in diesen Tumorentitäten höhere Histamin-Konzentrationen nachgewiesen werden als im umgebenden, gesunden Gewebe (Garcia-Caballero et al. 1994, Reynolds et al. 1997, Hegyesi et al. 2001, Cianchi et al. 2005, Sieja et al. 2005). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wurden signifikant gesteigerte Konzentrationen des Histamin-synthetisierenden Enzyms in Form von HDC-mRNA, HDC-Protein und eine gesteigerte HDC-Enzymaktivität in zahlreichen Tumoren, unter anderem dem Kolorektal-, dem Brustkrebs, dem kleinzelligem Lungenkarzinom oder dem malignen Melanom, gemessen (Garcia-Caballero et al. 1988, Haak-Frendscho et al. 2000, Graff et al. 2002, Cianchi et al. 2005). Der Einsatz des HDC-Inhibitors, α -Fluoromethylhistidin, konnte bereits eine Reduktion der Histamin-Produktion sowie eine reduzierte Proliferationsrate von Tumormodellen unterschiedlicher Genese zeigen (Bartholeyns und Bouclier 1984, Cricco et al. 1994). Ebenso wurde die Inhibierung der Zellproliferation durch H₂R-Antagonisten wie Cimetidin beobachtet (Tutton und Barkla 1983, Bartholeyns und Bouclier 1984, Tønnesen et al. 1988, Watson et al. 1993, Adams et al. 1994, Hahm et al. 1996, Nielsen et al. 2002).

Die oben genannten Erkenntnisse lassen vermuten, dass Histamin in verschiedenen Tumorentitäten die Proliferation beeinflusst und demzufolge ein Eingriff in die Histamin-Synthese oder den Histamin-Signalweg das Überleben von Patienten mit neoplastischen Erkrankungen positiv beeinflussen kann.

2.3.1 Der Histamin-Einfluss auf Melanomzellen

Nicht nur die Entstehung von malignen Malignomen ist ein komplexer Prozess, auch das Wachstum unterliegt einer Reihe von Zytokinen und der Stimulierung von exprimierten Rezeptoren auf den Melanomzellen. Dieses komplexe Signalnetzwerk, zu dem auch Histamin gehört, ist zum einen verantwortlich für eine autokrine Wachstumsstimulation als auch für

parakrine Faktoren, wie der Schaffung einer Mikroumgebung, in der die Tumorzellen überleben und proliferieren können (Lázár-Molnár et al. 2000).

Es wurde beobachtet, dass Melanomzellen, aber nicht humane Melanozyten, einen hohen Gehalt an Histamin aufweisen können (Falus et al. 2001). So beschreiben Rivera *et al.* nach den Ergebnissen verschiedener Arbeitsgruppen einen intrazellulären Histamin-Gehalt verschiedener Melanomzelllinien von 3-6pmol/10⁶ Zellen und eine Histamin-Ausschüttung von 3-4nM (Rivera et al. 2000). Dieses lokal gebildete Histamin ist in der Lage die DNA-Synthese, Zellproliferation und Chemotaxis von Melanomzelllinien zu stimulieren (Whitehead et al. 1988, Tilly et al. 1990, Uçar 1991).

2.3.2 Die Bedeutung der L-Histidin-Decarboxylase in Melanomzellen

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass maligne Zelllinien und Gewebe das für die Histamin-Synthese notwendige Enzym, die L-Histidin-Decarboxylase, exprimieren und somit in der Lage sind, Histamin aus L-Histidin zu synthetisieren und in den Extrazellularraum abzugeben. Ebenso zeigte sich, dass zahlreiche Melanomzellen die L-Histidin-Decarboxylase in hohem Maß exprimieren (Haak-Frendscho et al. 2000, Hegyesi et al. 2001, Darvas et al. 2003). Wohingegen sich in Nävi und normaler Haut eine 10-25fach geringere HDC-Expression zeigte bzw. in humanen Melanozyten keine HDC-Expression und auch kein HDC-Protein nachweisbar war (Haak-Frendscho et al. 2000). Dies lässt die Vermutung zu, dass Histamin auch bei Melanomzellen die Proliferation auf autokrinem und parakrinem Weg beeinflussen kann (Tilly et al. 1990, Reynolds et al. 1996, Darvas et al. 2003, Hegyesi et al. 2005). Erhärtet wurden diese Vermutungen seitdem Bartholeyns und Bouclier 1984 nachweisen konnten, dass durch eine Inhibierung der L-Histidin-Decarboxylase mit dem irreversiblen Enzymhemmer α -Fluoromethylhistidin das Wachstum maligner Tumore verringert werden konnte (Kollonitsch et al. 1978, Bartholeyns und Bouclier 1984). In nachfolgenden experimentellen Studien an Melanomzelllinien wurde der gleiche Effekt auch mit L-Histidin-Decarboxylase-Antisense-Oligonucleotiden erreicht, die eine funktionelle Aktivität des Enzyms verhinderten (Hegyesi et al. 2001). Somit ist Histamin zum Angriffspunkt weiterer Studien geworden mit dem Hintergrund, neue Therapieoptionen zu entwickeln, speziell im Stadium der infausten Prognose des metastasierten malignen Melanoms.

Nach Darvas *et al.* lassen sich jedoch Unterschiede in der Expression der L-Histidin-Decarboxylase zwischen Primärtumorzellarten und metastasierten Tumorzelllinien feststellen. So konnte eine signifikant gesteigerte Aktivität der L-Histidin-Decarboxylase sowie eine

erhöhte Histamin-Produktion in Primärtumoren gefunden werden, während die Aktivität der HDC in Metastasen deutlich geringer war (Darvas et al. 2003).

2.3.3 Die Expression und Funktion der Histamin-Rezeptoren auf Melanomzellen

Die Expression des H₁R, H₂R, H₃R und H₄R wurde auf Melanomzelllinien nachgewiesen (Whitehead et al. 1988, Tilly et al. 1990, Massari et al. 2011). Es wird jedoch vermutet, dass die verschiedenen Histamin-Rezeptoren unterschiedlichen Einfluss auf die Proliferation haben. In niedrigen Konzentrationen fördert Histamin die Proliferation von Melanomzellen über den H₂R, während hohe Histamin-Konzentrationen (10µM) die Proliferation über den H₁R senken (Abb. 7) (Lázár-Molnár et al. 2002). Falus *et al.* fassten die Wachstumsstimulation beziehungsweise die Wachstumshemmung durch Histamin-Rezeptoren 2001 folgendermaßen zusammen: Die aktuelle Anzahl und Verfügbarkeit von H₁R und H₂R sowie ihr relatives Verhältnis sind Schlüsselfaktoren, die determinieren, ob Histamin das Melanomwachstum stimuliert oder supprimiert (Falus et al. 2001).

Anhand unterschiedlicher maligner Erkrankungen konnte ein positiver Nutzen von H₂-Antihistaminika, die bisher in der Therapie peptischer Ulcera Anwendung finden, belegt werden. Studienergebnisse mehrerer Arbeitsgruppen an humanen Melanomzelllinien lassen schlussfolgern, dass H₂-Antihistaminika, wie Cimetidin oder Ranitidin, sich ebenso positiv auf die Behandlung von Melanomerkrankungen auswirken (Uçar et al. 1991, Reynolds et al. 1996, Szincsák et al. 2002).

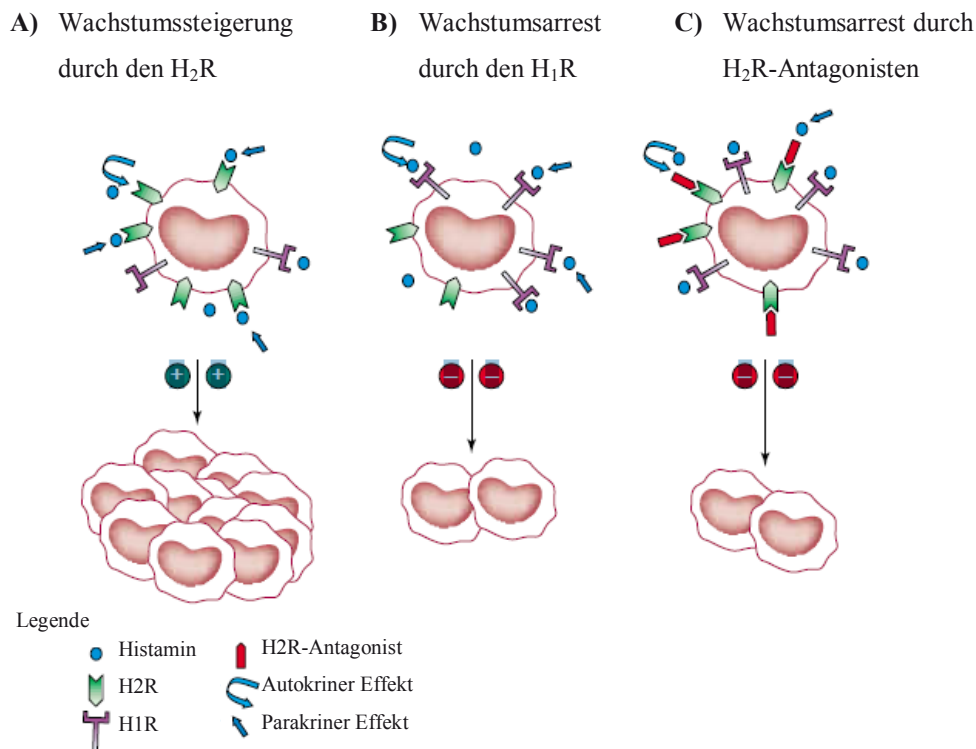


Abb. 7: Darstellung der Proliferationsbeeinflussung durch den H₁R und H₂R. **A)** Stimulation des H₂R mit Stimulation der Melanomzellproliferation, **B)** Stimulation des H₁R mit Hemmung der Wachstumsproliferation, **C)** Hemmung des H₂R durch H₂R-Antagonisten führt zur Inhibierung des proliferierenden Effekts und damit zur Proliferationshemmung (Falus et al. 2001).

In den letzten Jahren konnte erstmalig auch die Expression des H₄R auf Melanomzellen nachgewiesen werden (Massari et al. 2011). Bei der Frage, welchen Einfluss der H₄R auf die Proliferation hat, konnte beobachtet werden, dass Histamin nicht nur bei Brustkrebs die Proliferation durch H₄R-Stimulation senkt (Medina et al. 2008), sondern auch bei Melanomzellen wird ein inhibitorischer Effekt von Histamin auf die Proliferation vermutet (Massari et al. 2011). Massari *et al.* beobachteten anhand einer primären und einer metastasierten Melanomzelllinie, dass der H₄R eine Proliferationshemmung auslöst. Ursächlich konnten Massari *et al.* eine gesteigerte Differenzierung von Melanomzellen mit Zellalterung und Steigerung der Melanogenese nachweisen (Massari et al. 2011). Zu bedenken bleibt, dass es neben der direkten Wachstumsbeeinflussung, zahlreiche Hinweise dafür gibt, dass Histamin zeitgleich durch eine indirekte Wachstumsstimulation mit Einfluss auf das Immunsystems die Proliferation von Melanomzellen beeinflusst.

3 Zielsetzung

Die Entstehung einer Melanomerkrankung umfasst Mechanismen, durch die es den Melanomzellen ermöglicht wird, autonom zu proliferieren. Die Wachstumsautonomie der Tumorzellen wird vor allem durch die gesteigerte Produktion von Wachstumsfaktoren und die Überexpression ihrer Rezeptoren ermöglicht. Es gibt Hinweise, dass das biogene Amin Histamin einer dieser autonomen Wachstumsfaktoren für Melanomzellen sein könnte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss von Histamin auf die Proliferation von Melanomzellen besser einschätzen zu können. Dazu sollte zunächst untersucht werden, welche Bedeutung die autonome Histamin-Sekretion auf die Melanomzellproliferation ausübt. Desweiteren sollte der Einfluss einer externen Histamin-Stimulation auf das Proliferationsverhalten geklärt werden. Folgende Fragestellungen wurden anhand von drei primären und einer metastasierten Melanomzelllinie untersucht:

1. Welche Rezeptoren werden durch die Melanomzelllinien auf RNA-Ebene exprimiert?
2. Exprimieren die Melanomzelllinien das Enzym der Histamin-Synthese, die L-Histidin-Decarboxylase auf Protein-Ebene? Wird von den Melanomzellen autonom Histamin in das umgebende Kultivierungsmedium abgegeben?
3. Ändert sich die Histamin-Sekretion bei Hemmung der L-Histidin-Decarboxylase? Hat eine Hemmung der L-Histidin-Decarboxylase Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Melanomzelllinien?
4. Welche Rolle hat eine externe Histamin-Stimulation auf die Proliferation der Melanomzelllinien?
5. Welche Funktion hat der Histamin-H₄-Rezeptor an der autonomen Melanomzellproliferation? Welche Funktion erfüllt der H₄R an der Proliferation bei externer Histamin-Stimulation?

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

- Axiovert 10 (Mikroskop) Carl Zeiss, Jena, Deutschland
- Brutschrank (CO₂-Inkubator) SANYO Sales & Marketing Europe GmbH, München, Deutschland
- Durchflusszytometer (FACScan) BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
- Durchlichtmikroskop (TELAVAL 3) Carl Zeiss, Jena, Deutschland
- Easypet Pipettierhilfe Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- ELISA-Reader Emax Molecular Devices GmbH, Biberach an der Riss, Deutschland
- Gelträger MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
- Gelelektrophoresekammer MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
- Glass Plates (Spacer Plates) Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
- Glasplatten (7,3cm x 10,1cm) Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
- Heidolph Duomax 1030 Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
- MF-ChemiBIS 3.2 Biostep GmbH, Jahnsdorf, Deutschland
- Mini-Blot[®]-Apparatur Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
- Minigelsystem (Mini-Protean 3) Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
- Neubauer-Zählkammer Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co. KG, Sondheim, Deutschland
- Power Pac 300 Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
- Sterilarbeitsbank (Lamin Air HB 2472) Heraeus, Hanau, Deutschland
- Tank-Blot-System Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
- Thermomixer comfort Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

- Wasserbad GFL – Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
- Zentrifuge 5417 R Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Zentrifuge 5804 Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland

4.1.2 Verbrauchsmaterial

- Cellstar[®], Zellkulturflaschen, 75cm² Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
- Cellstar[®], Serological Pipette, 5ml Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
- Cellstar[®], Serological Pipette, 10ml Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, Deutschland
- FACS-Röhrchen BD - Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Gel Blot Paper, GB004 Whatman Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
- Polyvinylidenfluorid-Transfermembran (PVDF) (Amersham Hybond) GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg, Deutschland

4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

- AEBSF (4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid) AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Aprotinin Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- APS 20% (Ammoniumpersulfat) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Benzamidin Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Essigsäure Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Chymostatin Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- DMSO (Dimethylsulfoxid) Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland

- DNA Loading Dye (6-fach)	Fermentas, Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
- DNA Ladder 100 Basenpaare	New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
- Dulbecco's PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
- EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Ethidiumbromid (10mg/ml)	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe, Deutschland
- FCS (Fetales Kälberserum)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
- First Strand cDNA Synthesis Kit für RT-PCR	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Deutschland
- Formaldehyd Solution 37% (BioChemica)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Gelantine	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Glycerin 87%	Ferak Berlin GmbH, Berlin, Deutschland
- Glycin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Histamin Cell Culture ELISA	Hölzel Diagnostica GmbH, Köln, Deutschland
- Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Kalziumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Ladder (Precision Plus Protein Standards, Kaleidoscope™)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
- Leupeptin	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
- L-Glutamin (2mM)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

- MTT (Methyltetrazolium)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- NP-40 (Nonidet-P40)	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ Primer (0,5µg/µl)	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Penicillin/Streptomycin (10000 IU/ml)	PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Pepstatin A	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- Pierce ECL Western Blotting Substrate (500ml Kit)	Thermo Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
- PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- RNeasy [®] Mini Kit (50)	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- RNase OUT (40U/µl), Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Rotiphorese [®] Gel 30 (37-5:1)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- RPMI 1640 w/o L-Glutamine	Lonza Group Ltd, Basel, Schweiz
- RPMI 1640 w/o L-Glutamine, without PR	Lonza Group Ltd, Basel, Schweiz
- Saponin aus Quillaja Mark	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- SDS (Natriumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland
- SuperScript III, Reverse Transcriptase (200U/µl)	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
- Taq PCR Master Kit	Quiagen GmbH, Hilden, Deutschland
- TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
- TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
- Trypanblau	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz

- Trypsin-EDTA (10x) PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
- UltraPure™ Agarose Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
- 10mM dNTP Mix, PCR Grade Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland

4.1.4 Stimulantien, Antagonisten und Inhibitoren

- JNJ7777120 Tocris Bioscience, Bristol, England
- α -Methyl-DL-Histidin-Dihydrochlorid Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
- Histamin-Dihydrochlorid Alfa Aesar, Karlsruhe, Deutschland

4.1.5 Antikörper

Primäre Antikörper (Westernblot)

- Actin (I-19) Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
- Histidindecaboxylase (H-245) Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA

Sekundäre Antikörper (Westernblot)

- Donkey anti-goat IgG-HRP Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
- HRP-anti-rabbit, 1mg/ml KPL, Gaithersburg, USA

Antikörper (FACS)

- Rabbit IgG Isotype Control, PE conjugated (BS-0295P-PE) BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland
- Rabbit Anti-HDC Polyclonal Antibody, PE Conjugated (BS-1054R-PE) BIOZOL Diagnostica Vertrieb GmbH, Eching, Deutschland

4.1.6 Melanomzelllinien

- Mel G primäre Zelllinie von Dr. J.P. Johnson, Universität München
- Mel Ei primäre Zelllinie von Dr. J.P. Johnson, Universität München
- A375 primäre Zelllinie von Dr. J.P. Johnson, Universität München
- A2058 metastasierte Zelllinie von Dr. G. Taraboletti, Bergamo

4.1.7 Lösungen und Puffer

- | | | |
|--|-----------|--|
| - Lyse-Puffer | 20mM | TRIS |
| | 137mM | Natriumchlorid |
| | 2,7mM | Kaliumchlorid |
| | 1mM | Magnesiumchlorid |
| | 1mM | Kalziumchlorid |
| | 10% (v/v) | Glycerol |
| | 1% (v/v) | NP-40 |
| | 5µg/ml | Leupeptin |
| | 5µg/ml | Pepstatin A |
| | 5µg/ml | Benzamidin |
| | 5µg/ml | Chymostatin |
| | 21µg/ml | Aprotinin |
| | 12µg/ml | AEBSF |
| | 1mM | Na ₃ VO ₄ (Sodium orthovanadate)
vor Zugabe 5min bei 95° erhitzen |
| 1mM | PMSF | |
| - 100bp DNA-Ladder | 4µl | Nuklease-freies Wasser |
| | 1µl | 6x DNA Loading Dye |
| | 1µl | 100bp DNA-Ladder |
| - TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA)
50-fach, 2l, pH=8,0 | 484g | TRIS |
| | 114,2ml | Essigsäure |
| | 200ml | EDTA (0,5mM) |
| | | auffüllen auf 2l <i>aqua dest.</i> |

- Agarosegel 1,5%	1,5g	Agarose
	100ml	TAE-Puffer (1-fach) zum Lösen der Agarose in der Mikrowelle erhitzen
	5µl	Ethidiumbromid
- Sammelgel 5%	1,4ml	<i>aqua dest.</i>
	0,6ml	Sammelgel-Puffer
	0,4ml	Acrylamid Stock Solution
	54µl	APS (20%)
	6µl	TEMED
- Sammelgel-Puffer 4-fach, pH 6,8	0,5M	TRIS
	10%	SDS (w/v Stock)
- Trenngel 10%	3ml	<i>aqua dest.</i>
	1,8ml	Trenngel-Puffer (4-fach)
	2,4ml	Acrylamid Stock Solution
	64µl	APS (20%)
	16µl	TEMED
- Trenngel-Puffer 4-fach, pH 8,8	1,5M	TRIS
	2%	SDS (w/v Stock)
- Elektroden-Puffer 10-fach, pH 8,3	250mM	TRIS
	1,92M	Glycerin
	1%	SDS
- Transfer-Puffer 1-fach, 1l, pH= 8,3-8,4	25mM	TRIS
	192mM	Glycin in 600ml <i>aqua dest.</i> lösen
	200ml	Methanol

- NET-G-Puffer	100mM	TRIS
10-fach, pH= 8,0	1,5M	Natriumchlorid
	50mM	EDTA
	0,5%	Tween 20
	0,5%	Gelatine (2,5g in 100ml <i>aqua dest.</i> lösen)
- MTT-Medium 0,5mg/ml	5mg	MTT
(Methyltetrazolium)	1ml	PBS (MTT in PBS lösen)
	9ml	RPMI 1640 ohne Phenolrot
		Lösung steril filtrieren
- Glycin-Puffer	0,1M	Glycin
100ml, pH= 10,5	0,1M	Natriumchlorid
	100ml	<i>aqua dest.</i>

4.1.8 Software

- Cell Quest Pro 4.0.2
- SlideBook 4.1.0.6
- SoftMaxPro Version 1.1.1
- SPSS 16.0
- TotalLab Quant V11.4

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultivierung

Die Melanomzelllinien wurden in 75cm² Zellkulturflaschen kultiviert. Zur Passage wurden die etwa 80-90% konfluent gewachsenen Zellen alle drei bis vier Tage gesplittet und anschließend mit einer Konfluenz von ca. 20% wieder ausgesät. Zum Splitten der adhärennten Zelllinien wurde Trypsin-EDTA (1x) verwendet und die Zellablösung mit Kultivierungsmedium gestoppt. Der Mediumwechsel und das Splitten der Zellen erfolgten stets unter sterilen Bedingungen. Als Zellkulturmedium diente RPMI Medium, das mit 10% hitzeinaktiviertem FCS, 2mM L-Glutamin, 100mU/ml Penicillin/Streptomycin und 250µg/ml Amphotericin versetzt wurde. Für die Experimente wurden die Passagen 10-50 verwendet. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit).

4.2.2 RNA-Isolierung

Um die in den Melanomzellen vorhandene RNA in cDNA umzuschreiben, musste zunächst die RNA isoliert werden. Dies erfolgte mit Hilfe des *RNeasy Mini Kit (50)* von Qiagen.

Die Zellen wurden zunächst mit Trypsin-EDTA (1x) abgelöst und die Reaktion mit Kultivierungsmedium gestoppt. Die gewonnenen Zellen wurden mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt. Anschließend wurden je Zelllinie 2x10⁶ Zellen mit PBS gewaschen und die Zellen bei 300 x g für 5min zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen und das Pellet in 350µl Lysepuffer vermischt wurde, erfolgte die Überführung des Lysats auf einen *QIAshredder spin column* und die Zentrifugation des Lysats für 2min bei 20.000 x g und Raumtemperatur. Der Überstand wurde vollständig abgenommen und es folgte die Zugabe von 300µl 70% Ethanol zum Zelllysats. Vorsichtig wurden die entstandenen 650µl Überstand in ein *RNeasy spin column* überführt und es konnte erneut die Zentrifugation für 15s bei 8.000 x g und Raumtemperatur erfolgen. Die RNA war nun an die innere Säule des *RNeasy spin column* gebunden, so dass das Durchflussvolumen verworfen wurde. Im nächsten Schritt wurden 700µl RW1-Buffer zugegeben, der *RNeasy spin column* bei 8.000 x g, Raumtemperatur und für 15s zentrifugiert und abschließend das Durchflussvolumen verworfen. Vor dem Eluieren der RNA wurden 500µl RPE-Buffer zugegeben und die *RNeasy spin column* für 2min bei 8.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Abschließend wurde die Säule in ein neues 1,5ml Sammelgefäß überführt und die RNA mit 80µl RNase-freiem

Wasser durch eine 1-minütige Zentrifugation bei 8.000 x g eluiert. Die isolierte RNA wurde bei -80°C gelagert.

4.2.3 Photometrische Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration und der Reinheit der Probe erfolgte durch eine spektrophotometrische Messung. Dabei wurde die Extinktion der RNA-haltigen Lösung bei 230nm, 260nm und 280nm bestimmt. Die Quotienten OD_{260}/OD_{280} und OD_{260}/OD_{230} gaben Aufschluss über die Reinheit der Nukleinsäuren. Ihre Werte sollten für den Quotienten OD_{260}/OD_{280} zwischen 1,7 und 2,0 und für den Quotienten OD_{260}/OD_{230} zwischen 2,0 und 2,2 liegen. Die Konzentration an RNA ergab sich aus folgender Formel:

$$\text{Konzentration (RNA)} = OD_{260} \times \text{Verdünnung} \times 40 [\mu\text{l/ml}]$$

4.2.4 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription ist eine Methode, um aus vorhandener RNA mit Hilfe einer viralen Reversen Transkriptase die komplementäre cDNA zu synthetisieren. Die Synthese erfolgt mit Hilfe eines Oligo-dT-Primers, der an die Poly(A)-Struktur am 3'-Ende der einzelsträngigen RNA hybridisiert. Verwendet wurde das *First Strand cDNA Synthesis Kit für RT-PCR* von Roche.

Im ersten Schritt wurde 100ng Gesamt-RNA jeder Melanomzelllinie in 11µl RNase-freies Wasser gegeben und für 5min bei 65°C inkubiert. Anschließend musste die RNA für 2min bei 4°C gekühlt werden. Im folgenden Schritt erfolgte die Zugabe von je 4µl *1st strand Buffer (5x)*, 1µl DTT und 1µl *RNase Out* zu jeder RNA-Probe und die Inkubation der Proben für 2min auf Eis. Anschließend wurde 1µl der Reversen Transkriptase (200U/µl) jeder Probe zugeben und kurz zentrifugiert. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 42°C über 50min. Um die Reaktion zu stoppen, folgte bei 70°C über 10min die Enzyminaktivierung. Anschließend wurden die Proben auf Eis gekühlt bis im letzten Schritt zu jeder Probe 80µl RNase-freies Wasser gegeben wurde. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei -80°C.

4.2.5 Endpunkt-PCR

4.2.5.1 Primerpaare der Histamin-H₁-, -H₂-, -H₃- und -H₄-Rezeptoren und von RPL27

Tabelle 1: Dargestellt sind die jeweiligen Sequenzen der Primerpaare des Histamin-H₁-, -H₂-, -H₃- und -H₄-Rezeptors und des 60S ribosomales Protein L27 sowie die Länge des DNA-Amplifikats in Basenpaare (bp), die Primerlänge in Basen (b) und die *Annealing*-Temperatur.

Nachweis für	Länge des DNA-Amplifikats	Primer	Sequenz (5'-3')	Primer-Länge (b)	Annealing-Temp.
Histamin - H ₁ -Rezeptor	523bp	H₁R , <i>Forward</i>	CCAAGAGGATGATAGA GAAGTAG	23b	54,7°C
	523bp	H₁R , <i>Reverse</i>	G TTCAGTGTGGAGTTG ATGTAG	23b	54,7°C
Histamin - H ₂ -Rezeptor	331bp	H₂R , <i>Forward</i>	TCGTGTCCTTGGCTATC AC (Yoshida et al. 2000, Kanda und Watanabe 2002)	19b	61,1°C
	331bp	H₂R , <i>Reverse</i>	CCTTGCTGGTCTCGTTC CT (Yoshida et al. 2000, Kanda und Watanabe 2002)	19b	61,1°C
Histamin - H ₃ -Rezeptor	203bp	H₃R , <i>Forward</i>	GAGAAGCGCATGAAGA TGGT (Hegyesi et al. 2005)	20b	58,4°C
	203bp	H₃R , <i>Reverse</i>	AGGAGCCAGAAGGAG GTTTC (Hegyesi et al. 2005)	20b	58,4°C
Histamin - H ₄ -Rezeptor	395bp	H₄R , <i>Forward</i>	GGTACATCCTTGCCAT CACATCAT	24b	61,1°C
	395bp	H₄R , <i>Reverse</i>	ACTTGGCTAATCTCCTG GCTCTAA	24b	61,1°C
60S ribosomales Protein L27 (<i>house-keeping</i>)	109bp	RPL27 , <i>Forward</i>	CATTGATGATGGCACC TCAG	20b	56,4°C
	109bp	RPL27 , <i>Reverse</i>	CTTGGCGATCTTCTTCT TGC	20b	56,4°C

4.2.5.2 PCR-Durchführung

Die Polymerase-Kettenreaktion ist ein Verfahren mit dem definierte DNA-Abschnitte *in vitro* nachgewiesen bzw. selektiv angereichert werden können (Saiki et al. 1985, Saiki et al. 1988). Das Verfahren beruht dabei auf der exponentiellen Amplifikation der DNA nach thermischer Trennung der DNA-Doppelstränge, einer spezifischen Primeranlagerung und einer DNA-Synthese mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase.

Die Primer als Startnukleotide waren dabei sequenzspezifisch für das gewünschte zu amplifizierende Transkript und bestimmen die Länge des DNA-Amplifikats (Tabelle 1).

Zunächst wurde für jedes Primerpaar über einen PCR-Gradienten die optimale *Annealingtemperatur* (Anlagerungstemperatur) bestimmt. Diese ist abhängig von der Primerlänge und ihrem G/C-Gehalt. Bei jedem PCR-Experiment wurde eine Negativkontrolle mitgeführt, diese enthielt die gleichen Volumina an Komponenten, jedoch keine Ziel-DNA.

Die PCR wurde in dieser Arbeit mit einem Volumen von 25µl und folgenden Bestandteilen durchgeführt:

Taq PCR Master Kit	12,5µl
Primer	50pmol/µl
cDNA (100ng/µl)	2µl (Negativkontrolle: 2µl H ₂ O)
H ₂ O (Nuklease-frei)	auf 25µl aufgefüllt
	∑ 25µl

Zu Beginn der PCR erfolgte eine kurze Denaturierungsphase, um die cDNA-Doppelstränge voneinander zu trennen. Erst dann konnten sich die Primer an ihren komplementären cDNA-Einzelstrang anlagern. Mit Hilfe einer thermostabilen DNA-Polymerase wurden an den 3'-OH-Enden der Primer bei 72°C Nukleotide angeheftet. Die für die Elongation benötigte Zeit richtete sich dabei nach der Länge des zu amplifizierenden Amplifikats. Nach jedem dieser Elongationsschritte erfolgte erneut eine Denaturierung der entstandenen Syntheseprodukte, gefolgt von *Annealing* und Elongation der spezifischen Primer. Es kam so während 36 Zyklen zur exponentiellen Anreicherung des gewünschten DNA-Amplifikats.

Folgendes PCR-Programm wurde angewandt (die Schritte 2-4 wurden 36mal wiederholt):

1	Initiale Denaturierung	94°C	5min
2	Denaturierung	94°C	30sec
3	<i>Annealing</i>	je nach Primerpaar (siehe 4.2.5.1)	30sec
4	Elongation	72°C	45sec
5	Finale Elongation	72°C	8min
6	Abkühlung auf 4°C		

4.2.5.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen oder Nukleinsäuren durch eine gerichtete Bewegung von negativ geladenen Ionen im elektrischen Feld. Die Proteine oder Nukleinsäuren wandern in Abhängigkeit von der Größe, der Molekülform und der Agarosekonzentration unterschiedlich schnell durch das Agarosegel und werden aufgetrennt.

Nach Herstellung eines 1,5% Agarosegels wurde das Gel in einer Gelelektrophoresekammer mit 1xTAE-Puffer überschichtet. In die Geltaschen wurden die Negativkontrolle und die amplifizierte PCR-DNA der jeweiligen Zelllinie, die vorher mit Loading Dye vermengt wurde, und der Größenmarker (100bp) gegeben. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 5V/cm (70V). Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente konnte die Analyse des Gels unter UV-Licht (302nm) durchgeführt werden.

4.2.6 Western-Blot

4.2.6.1 Probenvorbereitung

Um im Western-Blot intrazellulär gelegene Proteine zu analysieren, mussten die Melanomzellen zunächst aufgeschlossen werden. Je Probenansatz wurden 1×10^6 Zellen eingesetzt. Diese wurden mit 15µl Lysepuffer (unter anderem NP-40 sowie Protease- und Phosphatase-Inhibitoren) 10min auf Eis inkubiert. Im Anschluss mussten die aufgeschlossenen Zellbestandteile für 15min bei 14.000 x g und 4°C zentrifugiert werden, um unlösliche Bestandteile abzutrennen. Die Überstände mit den zytosolischen und membranständigen Proteinen wurden in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und es

folgte die Zugabe des 5-fachen Probenauftragspuffers. Bei 95°C konnte anschließend das Proteingemisch für 5min denaturiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt werden.

4.2.6.2 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE dient dazu, Proteine entsprechend ihrer Größe in einer Gelmatrix mittels eines elektrischen Feldes aufzutrennen. Dazu wurde das *Mini Protean 3 Cell System* genutzt. Durch zwei Elektroden steht eine Gleichspannungsquelle in direkten Kontakt mit der Gelmatrix, die bei der SDS-PAGE aus Gelen auf Polyacrylamidbasis besteht.

Proteine wandern in einem elektrischen Feld entsprechend ihrer Größe, ihrer Ladung und ihrer Gestalt unterschiedlich schnell. Bei der SDS-Gelelektrophorese besteht das Prinzip darin, alle Proteine mit einer Hülle aus negativ geladenem SDS zu versehen, was Wechselwirkungen mit anderen Proteinen und Lipiden aufhebt. Entsprechend ihrer negativen Ladung wandern die Proteine zur positiv geladenen Anode. Zur Größenbestimmung der aufgetrennten Proteine wird bei jeder Gelelektrophorese ein Proteinstandard (*Precision Plus Protein Standards*) mitgeführt.

Nach einer von Laemmli modifizierten Methode werden die Proteine zunächst in einem Sammelgel (pH 6,8) zwischen Chloridionen hoher Mobilität als Leitton und Glycin niedriger Mobilität als Folgeion aufkonzentriert, was als *Stacking* bezeichnet wird (Laemmli 1970). Erst beim Übertritt in das Trenngel (pH 8,8) wandern die SDS-Protein-Komplexe entsprechend ihrer Größe unterschiedlich schnell. Entsprechend der zu erwartenden Proteingröße wurden 10%ige Trenngele und 5%ige Sammelgele verwendet. Nach deren Herstellung wurden zunächst die Glasplatten mit den Gelen in ein *Mini Protean 3 Cell System* eingespannt und die so entstandene Kammer konnte mit Elektrodenpuffer gefüllt werden. Nach dem Entfernen der Probenkämme aus den Gelen wurden 1×10^6 Zellen je Tasche eingefüllt. Das Aufkonzentrieren der Proben im Sammelgel erfolgte für 10min bei 60mA. Anschließend wurde die Proteintrennung bei 80mA ca. 1h fortgeführt.

4.2.6.3 Western-Blot-Durchführung

Nach dem Auftrennen der Proteine mittels Gelelektrophorese, folgte die Übertragung der Proteinbanden auf eine Polyvinylidenfluorid-Transfermembran (PVDF-Membran). Im Anschluss daran können einzelne Banden mit spezifischen Antikörpern detektiert (Towbin et al. 1979) und über sekundäre Antikörper, die Meerrettich-Peroxidase-konjugiert sind, mittels eines Chemolumineszenzreagenz sichtbar gemacht werden.

Bevor die Nitrozellulosemembran in den Transferstapel eingebaut werden konnte, musste diese zunächst mit Methanol kurz benetzt und im Transfer-Puffer geschwenkt werden. Der Transferstapel bestand aus dem Gel und der Membran, die vom Filterpapier und den Pads sandwichartig umgeben sind. Anschließend wurde der Transferstapel in die Kassette eingespannt, diese in eine Mini-Blot[®]-Apparatur gestellt und mit Transfer-Puffer vollständig bedeckt. Nach dem Proteintransfer bei 50V und 105min wurde die Membran für 1h in Net-G-Puffer geblockt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C und nach 3-maligem Waschen mit Net-G-Puffer wurde der sekundäre Antikörper für 1h zu der Membran gegeben. Erneut musste die Membran 3-mal mit Net-G-Puffer gewaschen werden bevor sie mit dem Chemolumineszenzreagenz benetzt werden konnte, um das emittierte Lumineszenzlicht mit Hilfe des MF-ChemiBIS-Geräts sichtbar zu machen.

4.2.7 MTT-Test (Zellproliferationstest)

Der MTT-Test ist eine Methode zur Bestimmung der Vitalität und des Wachstums von Zellen nach Applikation von bestimmten Reagenzien, die das Wachstum der Zellen anregen oder hemmen. Das schwach gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid (MTT) wird nach Aufnahme von den lebenden Zellen durch die Aktivität mitochondrialer Dehydrogenasen in ein blau-violettes wasserunlösliches Formazansalz umgewandelt. Die Reaktion beruht auf der Übertragung von Wasserstoffionen durch die in metabolisch aktiven Zellen enthaltene mitochondriale Succinatdehydrogenase auf das Tetrazoliumsalz, wodurch der Tetrazoliumring gespalten wird und das wasserunlösliche Formazansalz in den Zellen entsteht (Abb. 8).

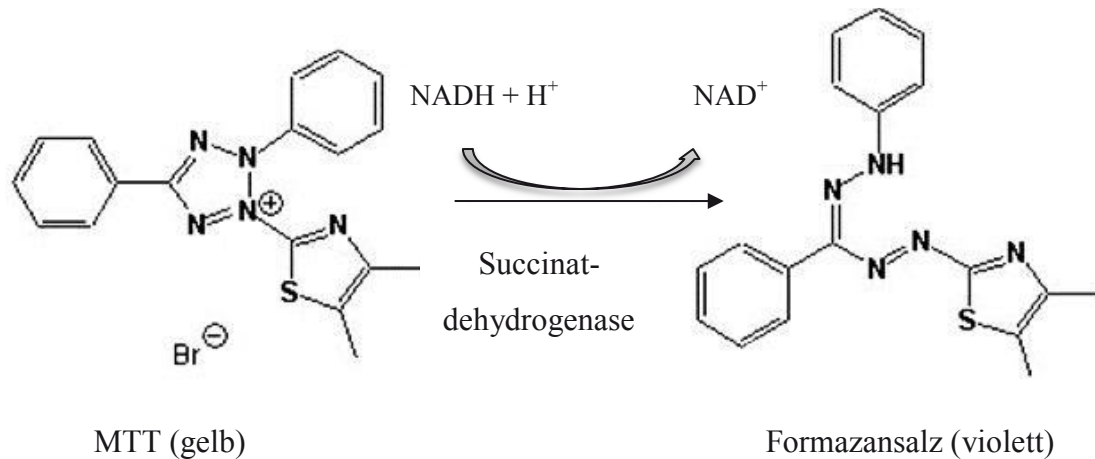


Abb. 8: Darstellung der Reduktion von 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazolium-bromid (MTT) durch mitochondriale Succinatdehydrogenasen in das wasserunlösliche Formazansalz (modifiziert nach Brescia und Banks 2009).

Je mehr vitale Zellen vorhanden sind, umso mehr MTT wird zu Formazansalz umgesetzt. Durch das Detergenz DMSO kann das Formazansalz anschließend aus den Zellen freigesetzt werden und das gelöste Formazansalz wird photometrisch bestimmt.

Für die Durchführung des MTT-Tests wurden die Zelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058 jeweils 8-fach mit 4000 Zellen pro *Well* auf eine 96-*Well*-Zellkulturplatte gesät.

Nach 4h im Kultivierungsmedium mit FCS (mit Phenolrot), in denen die Zellen anheften konnten, wurde das Zellkulturmedium für die nächsten 12h durch Kultivierungsmedium ohne FCS (ohne Phenolrot) ersetzt, um ein besseres Ansprechen der Zellen auf die Reagenzien zu ermöglichen. Dann erfolgte pro Zelllinie in Vierfachbestimmung die Kultivierung der Zellen mit 200µl Kultivierungsmedium mit FCS (ohne Phenolrot) und mit dem entsprechenden Reagenz. Die Inkubation der restlichen 4 *Wells* erfolgte als Kontrolle mit 200µl Kultivierungsmedium mit FCS und ohne Reagenz. Bei den Versuchsdurchläufen mit dem Reagenz JNJ7777120 wurde das Kultivierungsmedium der Kontrolle zusätzlich mit der entsprechenden Menge Ethanol versetzt, da der Histamin-H₄-Rezeptorantagonist JNJ7777120 in Ethanol gelöst werden musste. Bei den Versuchsabläufen, bei denen die Kultivierung der Zellen mit zwei Reagenzien erfolgte (Histamin und JNJ7777120), wurde das Kultivierungsmedium der Kontrolle zusätzlich mit der entsprechenden Menge Ethanol und 10nM Histamin versetzt. Die Zugabe der jeweiligen Konzentration des JNJ7777120 erfolgte dabei 1h vor der Histamin-Zugabe. Es folgte alle 24h der Mediumwechsel. Nach 72h wurde

durch MTT-Zugabe die Kultivierung beendet und die Messung durchgeführt, um eine Wachstumshemmung aufgrund einer vollständigen Konfluenz zu vermeiden.

Es wurden folgende Reagenzien und deren Konzentrationen in 200µl Medium eingesetzt:

- Histamin	10nM, 100nM, 1µM, 10µM
- JNJ7777120	100nM, 1µM, 10µM
- JNJ7777120	100nM, 1µM, 10µM
	mit je 10nM Histamin
- α-Methyl-DL-Histidin	3mM

Ebenso wurden je verwendeter Konzentration Leerwerte in Doppelbestimmungen ohne Zellzugabe, aber mit ansonsten gleicher Behandlung durch Zugabe der jeweiligen Kultivierungsmedien und anschließender MTT-Zugabe mitgeführt, um unspezifische Farbreaktionen auszuschließen.

Zweiundsiebzig Stunden nach der ersten Reagenzien-Zugabe erfolgte die MTT-Messung wie folgt: Das Kultivierungsmedium wurde vollständig aus den *Wells* entfernt, jedes *Well* mit PBS gewaschen und 50µl MTT je *Well* in einer Konzentration von 0,5mg/ml zugegeben.

Nach MTT-Zugabe erfolgte erneut eine Inkubationszeit von 3h bei 37°C, 5% CO₂, in denen das MTT innerhalb der Zellen von den mitochondrialen Dehydrogenasen in Formazan umgewandelt wurde. Vor der Weiterbehandlung der Zellen wurden Photographien in 10-facher Vergrößerung angefertigt. Um die wasserunlöslichen Formazankristalle zu lösen, wurde nach der Inkubation das MTT vollständig entfernt, anschließend ein DMSO/Glycinbuffer-Gemisch (10:1,2) je *Well* zugegeben und die Platte auf einem Plattenschüttler bei Raumtemperatur und 250rpm für 5min geschüttelt. Im ELISA-Reader erfolgte anschließend die photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 550nm und einer Referenzwellenlänge von 650nm.

Die Vitalität der Zellen ergibt sich aus folgender Formel und entspricht der Proliferationsrate der Melanomzellen:

$$\%Vitalität = \frac{OD \text{ (behandelte Zellen)} - OD \text{ (Leerwerte)}}{OD \text{ (unbehandelte Zellen)} - OD \text{ (Leerwerte)}} \times 100$$

Um die Melanomzelllinien aufgrund ihres unterschiedlichen Wachstumsverhaltens untereinander vergleichen zu können, wurden die jeweiligen Werte der unbehandelten Kontrollmessungen (entspricht gleicher Zellzahl jedoch ohne Zugabe von Stimulus oder Hemmstoff) gleich 100% gesetzt. Dementsprechend wurden die Mittelwerte der jeweiligen Messungen verglichen zu den Kontrollmessungen ebenfalls in Prozent angegeben. Eine Ausnahme bildet der Versuch, bei dem die Zellen mit zwei Reagenzien (10nM Histamin und 100nM, 1 μ M oder 10 μ M JNJ7777120) gleichzeitig kultiviert wurden. In diesem Versuchsaufbau wurde die alleinige Stimulation mit 10nM Histamin gleich 100% gesetzt, da die Auswirkungen einer Histamin-H₄-Rezeptorantagonisierung bei externer, gleichbleibender Rezeptorstimulation durch Histamin geprüft werden sollte.

4.2.8 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Analyse von Zelleigenschaften, wie der quantitativen Bestimmung von Oberflächenmolekülen, intrazellulären Proteinen, Peptiden oder DNA. Das Prinzip beruht auf der Detektion von optischen Signalen, die entstehen, wenn Zellen einzeln mit hoher Geschwindigkeit einen fokussierten Laserstrahl passieren. Je nach Form, Struktur und Färbung der Zelle können anhand der optischen Emissionen unterschiedliche Eigenschaften abgeleitet werden. Die Menge des gestreuten Lichts ist dabei abhängig von der Größe und Komplexität der Zelle. So wird das Vorwärtsstreulicht (FSC) von der Größe der Zelle beeinflusst und das Seitwärtsstreulicht (SSC) zum Beispiel von der Granularität, der Größe des Zellkerns und dem Vesikelgehalt der Zelle.

Neben der Detektion des Streulichts ist zusätzlich die separate Messung von Fluoreszenzsignalen möglich. Dabei werden Antikörper eingesetzt, die mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind. Die Farbstoffe sind in der Lage, Licht einer bestimmten Wellenlänge mit einem Anregungsmaximum von 480nm zu absorbieren und mit einem farbstoffabhängigen Emissionsmaximum zu emittieren. Die Messung und Auswertung erfolgt mit dem FACScan, der über einen Argonlaser verfügt und so einen gebündelten Lichtstrahl mit einer Wellenlänge von 488nm erzeugt. Über Photomultiplier werden sowohl das Streulicht als auch die Fluoreszenzsignale erfasst und an das angeschlossene Computerprogramm, Cell-Quest-Pro, weitergegeben und mit dessen Hilfe ausgewertet.

Die relative mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) berechnet sich wie folgt aus der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensität des PE-gekoppelten HDC-Antikörpers und der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensität des PE-gekoppelten Isotyp-Antikörpers:

$$\text{relative MFI} = \frac{\text{mittlere Fluoreszenzintensität des PE-gekoppelten HDC-Antikörper}}{\text{mittlere Fluoreszenzintensität des PE-gekoppelten Isotyp-Antikörper}}$$

Für die Durchführung wurden die Melanomzellen 24h auf 6-Well-Platten unter oben genannten Bedingungen kultiviert und mittels Trypsin-EDTA (1x) von der Zellkulturflasche abgelöst. Diese Reaktion konnte durch Kultivierungsmedium gestoppt und die Zellsuspension für 5min bei Raumtemperatur und 400 x g zentrifugiert werden. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zelllinien in je drei Ansätze mit jeweils 100.000 Zellen und mit 100µl Fixationslösung (4%-Paraformaldehyd) für 15min bei 4°C. Es folgte das Waschen der Zellsuspension mit 0,2% Tween 20 und die Permeabilisierung der Zellen mit 100µl 0,5% Saponin für 15min bei 4°C. Nach erneutem Waschen mit 0,2% Tween 20 wurden durch die Zugabe von 100µl 5% BSA in PBS unspezifische Bindungsstellen geblockt. Die Zellsuspension wurde weitere 30min bei 4°C inkubiert und anschließend gewaschen. Pro Zelllinie konnte anschließend zum 1. Ansatz der PE-gekoppelte Antikörper für die HDC (1:25), zum 2. Ansatz der PE-gekoppelte Antikörper für den Isotyp (1:25) und zum 3. Ansatz kein Antikörper gegeben werden. Unter Lichtausschluss und bei 4°C wurden die Suspensionen weitere 45min inkubiert. Anschließend mussten die nicht gebundenen Antikörper entfernt und die Zellsuspension zur Messung in 300-500µl PBS resuspendiert werden.

Die Messung und Auswertung erfolgte mit dem FACScan und dem Computerprogramm Cell-Quest-Pro. Zunächst wurden die Zellen in einem Streudiagramm dargestellt und dann je nach Zelllinie um die Melanompopulation ein *Gate* gelegt um die Hintergrundsignale zu reduzieren. Pro Messung wurden 5.000 Zellen im *Gate* ausgewertet.

4.2.9 Histamin-ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*)

Der ELISA ist ein Verfahren zum Nachweis und zur quantitativen Analyse der Konzentration von Antigenen, wie z.B. dem Histamin, in einer Probe. Das Testverfahren gehört zu den enzymatischen Immunabsorptionsverfahren.

Das Prinzip des Sandwich-ELISA beruht auf zwei Antikörpern, die beide an unterschiedlichen Epitopen eines Antigens binden. Die zu untersuchende Probe wird auf eine Mikrotiterplatte gegeben, an der ein erster Antikörper fest gebunden ist. Ein zweiter hinzugegebener Antikörper trägt ein Enzym, das in der Lage ist, einen anschließend zugegebenen Farbstoff enzymatisch umzusetzen. Diese Farbreaktion wird photometrisch

gemessen (Abb. 9). Über eine Standardreihe mit bekannten Antigenkonzentrationen und der Ermittlung einer Kalibrierungskurve kann die Konzentration des gesuchten Antigens im Anschluss quantitativ bestimmt werden.

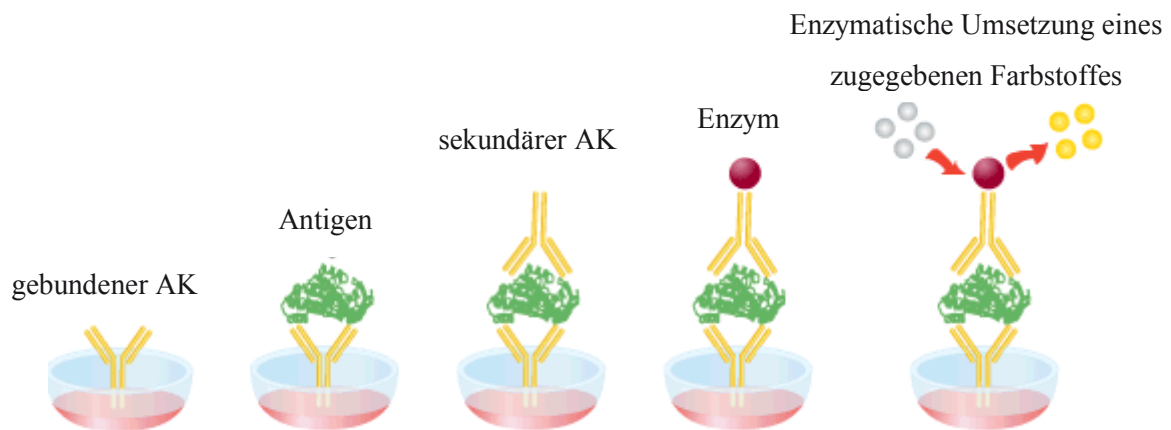


Abb. 9: Schematische Darstellung eines Sandwich-ELISA. Ein erster Antikörper ist fest an die Reaktionsplatte gebunden. Nach Zugabe der zu untersuchenden Probe bindet dieser Antikörper an ein Epitop des nachzuweisenden Proteins. Ein zweiter enzymatisch gekoppelter Antikörper wird der Probe zugegeben und bindet ebenfalls an das zu untersuchende Protein. Das gebundene Enzym ist nun in der Lage einen Farbstoff umzusetzen. Diese Farbreaktion wird mittels ELISA-Reader photometrisch gemessen (modifiziert nach Leinco Technologies, Inc 2013).

Für die Bestimmung der basalen Histamin-Konzentration im Serumüberstand ohne Reagenzienzugabe mittels ELISA wurden die Zelllinien mit einer Zellzahl von initial 120.000 Zellen in Dreifachbestimmung auf 6-Well-Platten kultiviert. Nach einem 4-stündigen Anheften der Zellen, erfolgte über 12h die Inkubation in Kultivierungsmedium ohne FCS bei 37°C und 5% CO₂. Anschließend wurde das Kultivierungsmedium ohne FCS vollständig abgenommen und 1ml Kultivierungsmedium mit FCS zugegeben. Nach 24h wurde das Medium der jeweiligen Dreifachbestimmung abgenommen und bei 500 x g und 4°C über 10min zentrifugiert, um Zellbestandteile zu entfernen. Entsprechend dem MTT-Proliferationstest war eine längere Kultivierungszeit nicht möglich, um ein Wachstum über 90% Konfluenz zu vermeiden. Bis zur Messung wurde das abgenommene Medium bei -20°C aufbewahrt.

Zur Bestimmung der Histamin-Konzentration nach Hemmung der L-Histidin-Decarboxylase mittels α -Methyl-DL-Histidin, wurden die Zelllinien ebenfalls mit einer Zellzahl von initial 120.000 Zellen in Dreifachbestimmungen auf 6-Well-Platten über 72h kultiviert. Die

Kultivierung erfolgte erneut nach einem 4-stündigen Anheften der Zellen und einer 12h Inkubationsphase in Kultivierungsmedium ohne FCS. Anschließend wurden 3 *Wells* mit 3mM des HDC-Inhibitors und 3 *Wells* ohne den Inhibitor kultiviert. Das Medium wurde alle 24h erneuert. Nach 72h konnte das Medium der jeweiligen Dreifachbestimmungen abgenommen und wie das abgenommene Medium der basalen Histaminkonzentration bei 500 x g und 4°C über 10min zentrifugiert werden. Bis zur Messung erfolgte die Aufbewahrung des abgenommenen Mediums ebenfalls bei -20°C.

Für die ELISA-Messung wurden zunächst in die Acetylierungsplatte (*Reaction Plate*) je 100µl der mitgelieferten Standardkonzentrationen, der Qualitätskontrolle (gebrauchsfertige Histamin-Lösung in vorgegebener Konzentration), des Leerwertes (Waschpuffer) und der Zellkulturüberstände in Dreifachbestimmung pipettiert. Nach Zugabe von 25µl des Acylierungsreagenz und 200µl des Acylierungspuffers in jedes *Well* erfolgte die Inkubation für 15min bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler. Anschließend wurden 25µl je *Well* der Acetylierungsplatte auf die ELISA-Mikrotiterplatte gegeben und 100µl Antiserum hinzu pipettiert. Nach 30-minütiger Inkubation auf dem Plattenschüttler, wurden die Vertiefungen dreimal mittels Waschpuffer gewaschen. Es folgten die Zugabe von 100µl Enzymkonjugat (10-minütige Inkubation) und ein erneuter dreimaliger Waschschrift, um nicht gebundenes Enzymkonjugat vor der Zugabe des Farbstoffes (100µl) auszuwaschen. Dieser wurde in einer 15-minütigen Inkubation unter Lichtausschluss enzymatisch umgesetzt bis die Reaktion mittels 100µl Stopplösung je *Well* endete und der Farbumschlag im ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450nm (Referenzwellenlänge 650nm) gemessen werden konnte.

Die Berechnung der Ergebnisse der Histamin-Konzentrationen erfolgte durch Abzug der Werte, die im Zellkulturmedium mit bzw. ohne Zusatz des HDC-Inhibitors und ohne initiale Zell-Zugabe gemessen wurden. Vermieden werden konnten somit Messfehler aufgrund der bereits im Kultivierungsmedium vorhanden Histamin-Konzentration nach Zugabe von fetalem Kälberserum.

4.2.10 Statistische Auswertung

Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte als Mittelwerte \pm Standardabweichung. Für die statistische Analyse der Signifikanzen wurden der *Student's t-Test* oder die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) durchgeführt. Verwendung fand das Datenanalyseprogramm SPSS.

Im MTT-Proliferationstest wurden mittels *Student's* t-Test die Ergebnisse einer Zelllinie nach Stimulanzien- bzw. Inhibitor-Zugabe auf statistische signifikante Unterschiede im Proliferationsverhalten verglichen mit der Kontrollmessung überprüft. Anschließend erfolgte durch einfaktorielle Varianzanalyse und Bonferroni-Adjustierung der Vergleich der Zelllinien untereinander auf statistische Signifikanzen und damit auf Unterschiede im Proliferationsverhalten.

Die Auswertung des Histamin-ELISAs erfolgte durch den Vergleich der basalen Histamin-Sekretion einer Zelllinie mit der Histaminausschüttung nach Zugabe des HDC-Inhibitors durch den *Student's* t-Test. Die einfaktorielle Varianzanalyse und Bonferroni-Korrektur wurden beim Vergleich der Zelllinien untereinander in ihrer Histamin-Sekretion nach Zugabe des HDC-Inhibitors angewendet.

Beim Vergleich der Zelllinien auf Unterschiede im HDC-Gehalt mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie wurden die Zelllinien untereinander durch die einfaktorielle Varianzanalyse und anschließende Bonferroni-Korrektur auf statistische Signifikanzen überprüft.

Signifikante Ergebnisse wurden dabei folgendermaßen gekennzeichnet: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant.

5 Ergebnisse

5.1 Histamin-Rezeptornachweis mittels Endpunkt-PCR

Die RNA-Expression der vier Histamin-Rezeptoren für die Zelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058 wurde mittels Endpunkt-PCR untersucht. Zunächst erfolgte die Isolation der RNA aller vier Zelllinien von jeweils 2×10^6 Zellen, die mit Hilfe der Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden konnte. Mittels spezifischer Oligonukleotide wurde diese anschließend in der nachfolgenden PCR amplifiziert und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Die Ergebnisse der RNA-Rezeptorexpression sind in Abbildung 10 dargestellt. Abbildung 10A zeigt die Expression des Histamin- H_1 -Rezeptors (H_1R), der nach gelelektrophoretischer Auftrennung bei einer Proteingröße von 523bp bei den Zelllinien Mel Ei, A375 und A2058 zu erkennen ist. Die Zelllinie Mel G exprimiert den H_1R nicht. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 10B bei allen Zelllinien auf Höhe von 331bp eine Bande zu erkennen. Somit weisen alle Zelllinien den Histamin- H_2 -Rezeptor (H_2R) auf. Der Histamin- H_3 - und Histamin- H_4 -Rezeptor (H_3R , H_4R) werden ebenfalls nur von den Zelllinien Mel Ei, A375 und A2058 exprimiert. Der H_3R mit einer Bande bei 203bp und der H_4R mit einer Bande von 395bp sind bei der Zelllinie Mel G nicht nachweisbar (Abbildung 10C und 10D).

Aufgrund der RNA-Expression der Histamin-Rezeptoren wurden alle Zelllinien in den nachfolgenden Experimenten verwendet.

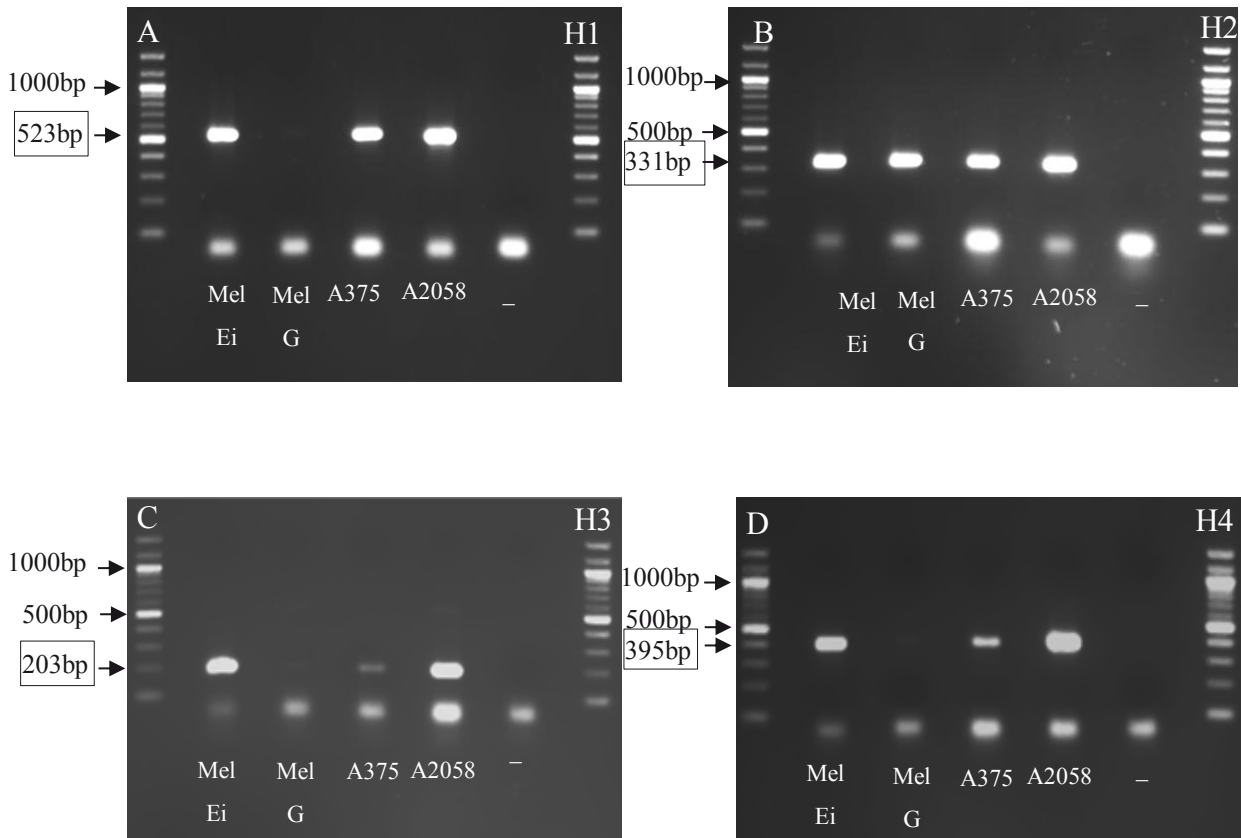


Abb. 10: Analyse der RNA der Histamin-Rezeptoren in den Zelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058 mittels Endpunkt-PCR: (A) Histamin-H₁-Rezeptor mit einer Bande bei 523bp, (B) Histamin-H₂-Rezeptor mit einer Bande bei 331bp, (C) Histamin-H₃-Rezeptor mit einer Bande bei 203bp und (D) Histamin-H₄-Rezeptor mit einer Bande bei 395bp. (-) bezeichnet die Negativkontrolle mit Nuklease-freiem Wasser. Repräsentative Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Versuchsdurchläufen erzielt.

5.2 Nachweis der L-Histidin-Decarboxylase mittels Western-Blot und Durchflusszytometrie

Die Bestimmung der intrazellulären L-Histidin-Decarboxylase erfolgte zunächst mittels Western-Blot. Hierbei wurden je Probenansatz 1×10^6 Zellen eingesetzt.

Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse der Western-Blot-Analyse nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine entsprechend ihrer Größe und nach Markierung des HDC-Proteins mittels spezifischer Antikörper. Entsprechend einer Proteingröße der HDC von 74kDa war bei allen Zelllinien eine Bande und somit das HDC-Protein nachweisbar.

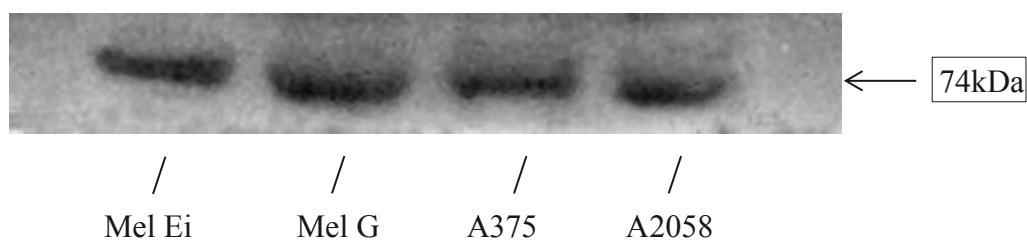


Abb. 11: Nachweis des intrazellulären HDC-Proteins mittels Western-Blot. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine, entsprechend ihrer Größe, wurde die HDC mit Hilfe eines primären Antikörpers markiert und anschließend über einen zweiten Antikörper mit einem Chemolumineszenzreagenz sichtbar gemacht. Dargestellt sind die Zelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058 mit jeweils einer HDC-Bande bei 74kDa. Repräsentative Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Versuchsdurchläufen erzielt.

Zusätzlich zum HDC-Nachweis im Western-Blot erfolgte der HDC-Nachweis mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie. Dazu wurden die Zellen der vier Melanomzelllinien mit einem PE-gekoppeltem IgG-Kontrollantikörper bzw. mit einem PE-gekoppeltem Anti-HDC-IgG-Antikörper inkubiert.

Abbildung 12A zeigt die Ergebnisse als Histogramme, in denen eine Messung jeder Zelllinie repräsentativ dargestellt ist. Die horizontale Achse gibt dabei die Intensität der Einzelmessungen wieder, die vertikale Achse die Zellanzahl. Bei fluoreszenzmarkierten Antikörpern, wie den PE-gekoppelten Antikörpern ist die Fluoreszenzintensität direkt proportional zur Anzahl vorhandener Bindungsstellen. Die Isotyp-Kontrolle entspricht dabei den auftretenden unspezifischen Bindungsstellen des Antikörpers. Zu erkennen war, dass alle Zelllinien intrazellulär die L-Histidin-Decarboxylase exprimieren, da sich eine höhere Anzahl an HDC-Bindungsstellen durch eine stärkere Intensität der Einzelmessungen darstellen ließ. Abbildung 12B stellt die Ergebnisse als Mittelwert aus den Quotienten der Fluoreszenzsignale

des PE-gekoppeltem Anti-HDC-IgG-Antikörpers und der Signale des PE-gekoppeltem IgG-Kontrollantikörpers dar. Die Werte der relativen mittleren Fluoreszenzintensitäten lagen zwischen 1,23 und 1,38. Es ließen sich jedoch mittels Post hoc (Bonferroni)-Analyse keine statistisch signifikanten Unterschiede in den relativen mittleren Fluoreszenzintensitäten zwischen den Zelllinien nachweisen (Tabelle 2).

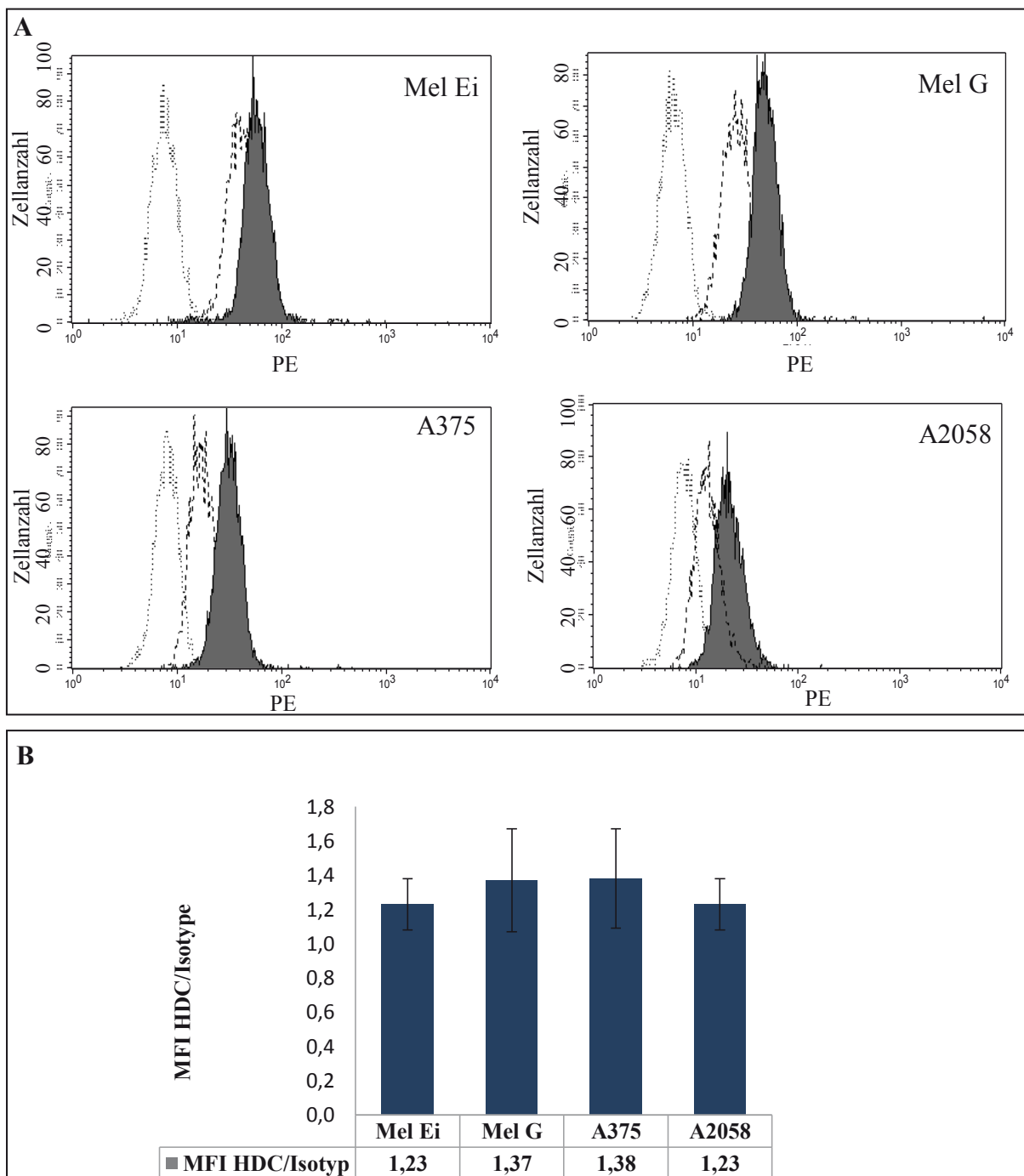


Abb. 12: (A) Nachweis der HDC in den Melanomzelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058. Dargestellt sind die Histogramme der ungekoppelten (gepunktete Linie), der Isotypgekoppelten (gestrichelte Linie) und der HDC-positiven (durchgezogene Linie, grau schattiert) Melanomzellen, die jeweils übereinander gelegt wurden. Die Melanomzellen wurden zeitgleich ohne bzw. mit dem PE-gekoppeltem IgG-Kontrollantikörper und dem PE-gekoppeltem anti-HDC-IgG-Antikörper markiert. Ein Peak entspricht 5.000 Zellen im *Gate*. Je mehr vorhandene Bindungsstellen die Zellen aufweisen, umso stärker ist die Intensität der Einzelmessungen. Repräsentative Ergebnisse wurden in drei unabhängigen Versuchsdurchläufen erzielt.

(B) Nachweis der intrazellulären HDC-Bildung mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie. Dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung ($N=3$) aus den Quotienten der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) des PE-gekoppeltem Anti-HDC-IgG-Antikörpers und der MFI des PE-gekoppeltem IgG-Kontrollantikörpers. Dieser ergibt sich aus drei Einzelmessungen, die je Zelllinie in drei unabhängigen Versuchsreihen erhoben wurden.

Tabelle 2: Vergleich der Zelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058 untereinander mittels Post hoc (Bonferroni)-Analyse auf statistisch signifikante Unterschiede der relativen mittleren Fluoreszenzintensität.

Post hoc (Bonferroni)-Analyse	<i>p-value*</i>
Mel Ei ↔ Mel G	0,575
Mel Ei ↔ A375	0,650
Mel Ei ↔ A2058	1,000
Mel G ↔ A375	1,000
Mel G ↔ A2058	1,000
A375 ↔ A2058	1,000

*= $p < 0,05$ ist signifikant

5.3 Die basale Histamin-Sekretion und Auswirkungen einer reversiblen Inhibierung der HDC

Um die basale Histamin-Sekretion der Zellen in das umgebende Kultivierungsmedium und den Einfluss des HDC-Hemmers, α -Methyl-DL-Histidin, auf die Histamin-Produktion bzw. die Histamin-Abgabe zu analysieren, erfolgte die Bestimmung der Histamin-Konzentration im Mediumüberstand mittels ELISA. Somit wurde die autonome Histamin-Abgabe durch die Melanomzellen als Voraussetzung für eine Wachstumsbeeinflussung umgebender Zellen geprüft.

Abbildung 13 zeigt die Histamin-Konzentration nach 72h Wachstum und 24h nach dem letzten Mediumwechsel, die die jeweiligen Zelllinien nach Kultivierung in An- und Abwesenheit des reversiblen HDC-Hemmers, α -Methyl-DL-Histidin (3mM), ins Serum abgegeben haben. Zu erkennen war, dass bei allen Zelllinien eine basale Histamin-Sekretion mit Werten von 0,26ng/ml (A375), 0,28ng/ml (A2058), 0,30ng/ml (Mel Ei) und 0,48ng/ml (Mel G) nachgewiesen werden konnte.

Nach 72-stündiger Hemmung der HDC wies die primäre Zelllinie Mel Ei eine signifikant geringere Histamin-Konzentration im Serumüberstand auf (0,20ng/ml, $p < 0,01$) als die unstimulierte Kontrolle mit einer basalen Histamin-Sekretion von 0,30 ng/ml. Ebenso war eine signifikant geringere Histamin-Konzentration bei der Zelllinie A375 mit einem Abfall der basalen Histamin-Konzentration von 0,26ng/ml auf 0,06ng/ml ($p < 0,01$) zu beobachten. Sowohl die Zelllinie Mel G als auch die Zelllinie A2058 zeigten hingegen keine signifikante Auswirkung auf die Histamin-Abgabe nach Hemmung der HDC über 72h (Abbildung 13).

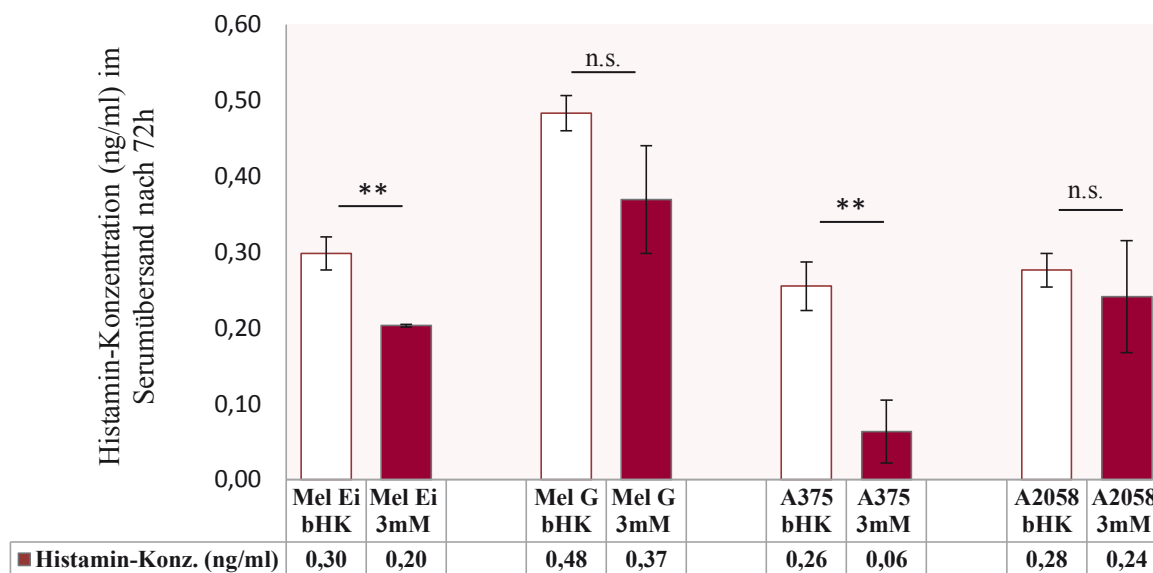


Abb. 13: Dargestellt ist die basale Histamin-Sekretion (bHK) der Zelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058 sowie die Histamin-Sekretion nach Zugabe des HDC-Inhibitors, α -Methyl-DL-Histidin, in der Konzentration 3mM. Die Inkubation erfolgte 72h auf 6-Well-Platten. Anschließend wurde das überstehende Medium abgenommen und mittels ELISA die Histamin-Konzentration bestimmt. Die Ergebnisse der Histamin-Konzentrationen wurden als Mittelwerte (N=3) in ng/ml angegeben. Die Mittelwerte ergeben sich jeweils aus drei unabhängigen Versuchsabläufen, die in Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Verglichen mit der basalen Histamin-Konzentration sind die signifikanten Ergebnisse folgendermaßen gekennzeichnet: ** $p < 0,01$, n.s. = nicht signifikant.

In Tabelle 3 ist der statistische Post hoc (Bonferroni)-Vergleich der Zelllinien untereinander in Bezug auf die Histaminabgabe unter HDC-Hemmung für 72h dargestellt. Bei der Zelllinie A375 konnte beobachtet werden, dass sie sich mit der stärksten Absenkung der Histamin-Sekretion verglichen zur basalen Histamin-Sekretion von den drei anderen Zelllinien signifikant unterscheidet. Hingegen wiesen die Zelllinien Mel Ei, Mel G und A2058 untereinander keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Histamin-Sekretion nach HDC-Hemmung mit 3mM α -Methyl-DL-Histidin auf.

Tabelle 3: Vergleich der Zelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058 untereinander mittels Post hoc (Bonferroni)-Analyse auf statistisch signifikante Unterschiede in der Histamin-Sekretion nach Hemmung der HDC mit 3mM α -Methyl-DL-Histidin über 72h.

Post hoc (Bonferroni)-Analyse	<i>p-value</i> *
A375 ↔ Mel Ei	0,016
A375 ↔ Mel G	0,005
A375 ↔ A2058	0,002
Mel Ei ↔ Mel G	1,000
Mel Ei ↔ A2058	0,535
Mel G ↔ A2058	1,000

*= $p < 0,05$ ist signifikant

5.4 MTT-Test (Zellproliferationstest)

Um die Auswirkung verschiedener Stimuli, die in die Histamin-Synthese bzw. den Histamin-Signalweg eingreifen, auf das Wachstum von Melanomzellen zu überprüfen, wurden die Zelllinien über 72h mit den entsprechenden, unterschiedlichen Konzentrationen der Stimuli bzw. Inhibitoren kultiviert.

5.4.1 Stimulation mit Histamin

Um die Auswirkungen einer externen Histamin-Zugabe auf die Melanomzellproliferation zu überprüfen, wurde Histamin in verschiedenen Konzentrationen (10nM, 100nM, 1 μ M und 10 μ M) dem Zellkultivierungsmedium zugegeben.

Abbildung 14 stellt die durchschnittliche Proliferationssteigerung nach Histamin-Stimulation graphisch dar. Während bei der Zugabe von 10nM Histamin bei allen vier Melanomzelllinien eine signifikante Zellproliferation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle (100%) nachgewiesen werden konnte mit 161% Mel Ei ($p < 0,01$), 153% Mel G ($p < 0,01$), 131% A375 ($p < 0,05$) und 149% A2058 ($p < 0,001$), zeigten nur die drei Zelllinien: Mel Ei (158%, $p < 0,001$), Mel G (151%, $p < 0,05$) und A2058 (138%, $p < 0,001$) eine signifikante Wachstumssteigerung bei 100nM. Ebenso konnte bei den Zelllinien Mel Ei (130%, $p < 0,01$) und A2058 (130%, $p < 0,05$) durch Stimulation mit 1 μ M Histamin eine signifikante Proliferationssteigerung beobachtet werden. Bei Stimulation mit 10 μ M Histamin zeigte nur die Zelllinie A2058 weiterhin eine signifikante Wachstumssteigerung mit einer durchschnittlichen Proliferation von 135% ($p < 0,001$).

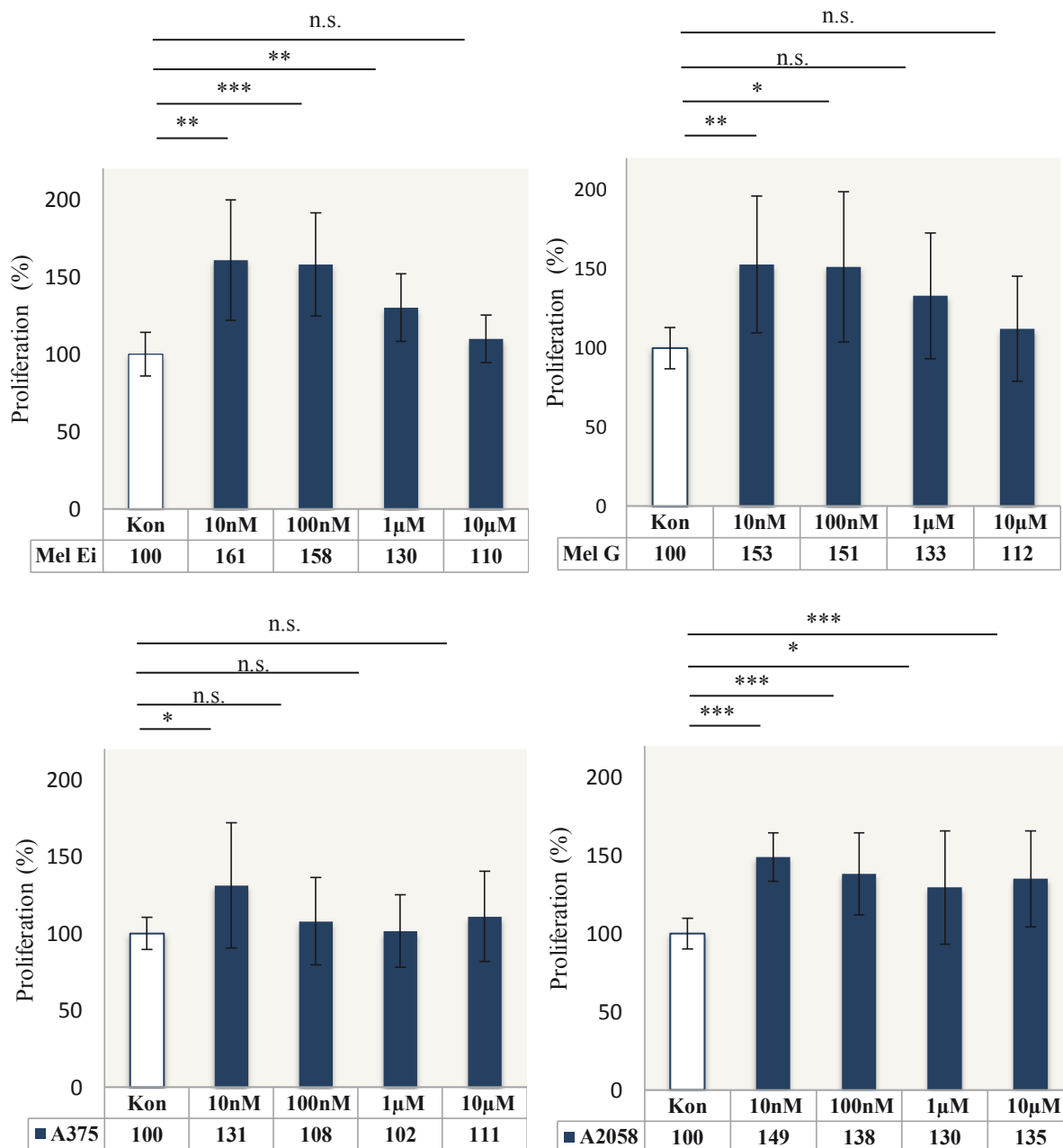


Abb. 14: Dargestellt ist die durchschnittliche Proliferation der Zelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058 nach Zugabe von Histamin in den Konzentrationen von 10nM, 100nM, 1µM und 10µM verglichen mit der unstimulierten Kontrolle. Inkubiert wurden die Zellen in 96-Well-Platten, dabei erfolgte alle 24h ein Mediumwechsel. Nach 72h wurde MTT hinzugegeben, die Zellen 3h inkubiert (unter Standardbedingungen) und anschließend erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 550nm (Referenzwellenlänge von 650nm) die Messung des gebildeten Formazansalzes. Die Ergebnisse der unstimulierten Kontrollmessungen wurden als 100% angegeben. Alle Messungen wurden als Mittelwerte (N=3) und Standardabweichung je Konzentration dargestellt. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Versuchsabläufen, die jeweils als Vierfachbestimmungen durchgeführt wurden. Verglichen mit der unstimulierten Kontrolle sind die signifikanten Ergebnisse folgendermaßen gekennzeichnet: * p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001; n.s. = nicht signifikant.

Ein statistischer Vergleich der Zelllinien untereinander auf Unterschiede im Proliferationsverhalten mittels Post hoc (Bonferroni)-Analyse ergab, dass bei Zugabe von 100nM die Zelllinien Mel Ei und Mel G signifikant stärker als die ebenfalls primäre Zelllinie A375 proliferierten (Tabelle 4). Die metastasierte Zelllinie A2058 zeigte bei 100nM keine statistisch signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten verglichen mit den drei primären Zelllinien. Die Konzentrationen 1µM und 10µM Histamin ergaben wie die Zugabe von 10nM keine signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten beim Vergleich der Zelllinien untereinander (Tabellen nicht dargestellt).


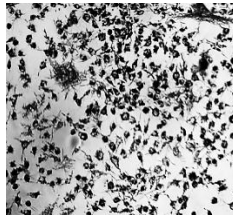
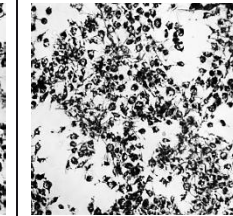
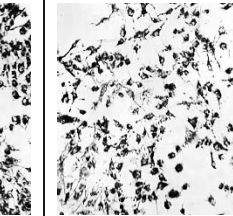
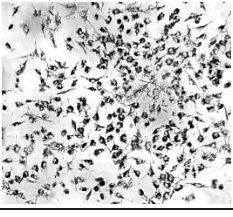
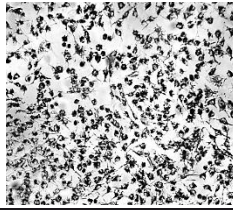
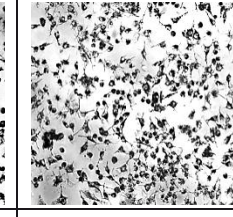
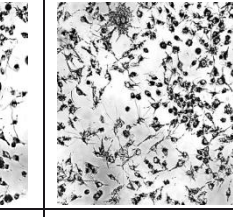
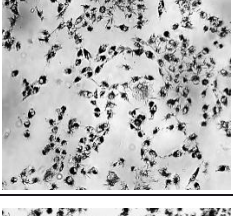
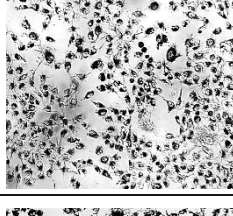
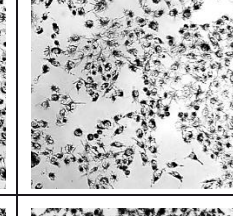
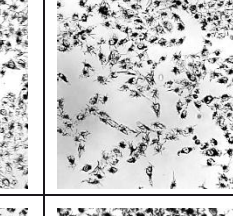
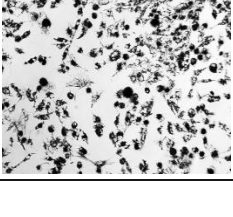

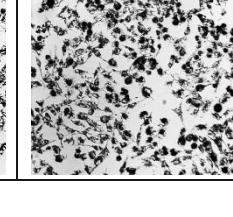
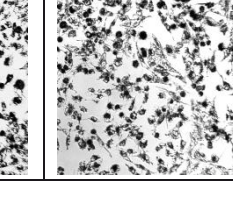
Tabelle 4: Vergleich der Zelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058 untereinander mittels Post hoc (Bonferroni)-Analyse auf statistisch signifikante Unterschiede in der Proliferation nach Stimulation mit 100nM Histamin.

Post hoc (Bonferroni)-Analyse	<i>p-value</i> *
Mel Ei ↔ A375	0,007
Mel G ↔ A375	0,040
Mel Ei ↔ Mel G	1,000
Mel Ei ↔ A2058	0,995
Mel G ↔ A2058	1,000
A375 ↔ A2058	0,169

*= $p < 0,05$ ist signifikant

Um die Proliferationsbeeinflussung durch Histamin zu verdeutlichen, erfolgte kurz nach der dreistündigen Inkubation der Zellen mit MTT die mikroskopische Darstellung (Axiovert 10) in 10-facher Vergrößerung. Tabelle 5 zeigt die vier Zelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058 mit den Photographien der Kontrollmessungen. Repräsentativ wurden Photographien einer 10nM, 1µM und 10µM Histaminstimulation angefertigt. Die Bilder zeigen deutliche Dichteunterschiede der Zelllinien bei konzentrationsabhängiger Stimulation mit Histamin im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle.

Tabelle 5: 10-fache Vergrößerung der Zelllinien nach 3-stündiger Inkubation mit MTT. Die Zelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058 wurden mit einer Zellzahl von 4.000 Zellen je *Well* ausgesät. Nach 72-stündiger Inkubation ohne bzw. mit Histamin in den Konzentrationen 10nM, 1µM und 10µM sowie 3-stündiger Inkubation mit MTT unter Standardbedingungen, wurden die Zelllinien mittels Mikroskop (Axiovert 10) in 10-facher Vergrößerung fotografiert. Das zugegebene MTT wurde bereits von den metabolisch aktiven Zellen in das unlösliche Formazansalz umgewandelt (hier zu erkennen an den schwarzen Zytoplasmaeinlagerungen).

	Kontrolle	10nM Histamin	1µM Histamin	10µM Histamin
Mel Ei				
Mel G				
A375				
A2058				

5.4.2 Hemmung der HDC mit dem reversiblen Inhibitor α -Methyl-DL-Histidin

Um den Einfluss des Histamin-produzierenden Enzyms, der L-Histidin-Decarboxylase, auf die Melanomzellproliferation zu überprüfen, erfolgte die Hemmung des Enzyms mit dem reversiblen Antagonisten α -Methyl-DL-Histidin in der Konzentration von 3mM. Somit wird Einfluss auf die mögliche autonome Proliferation genommen.

Wie in Abbildung 15 dargestellt, bewirkte eine Konzentration von 3mM eine signifikante Proliferationssenkung der primären Zelllinie Mel G. Die Zelllinien Mel Ei, A375 und A2058 zeigten keine signifikante Wachstumshemmung nach Zugabe von 3mM α -Methyl-DL-Histidin.

Der Vergleich der Zelllinien untereinander auf statistisch signifikante Unterschiede im Proliferationsverhalten nach Hemmung der HDC zeigte kein unterschiedliches Proliferationsverhalten der Zelllinien (Tabelle nicht abgebildet).

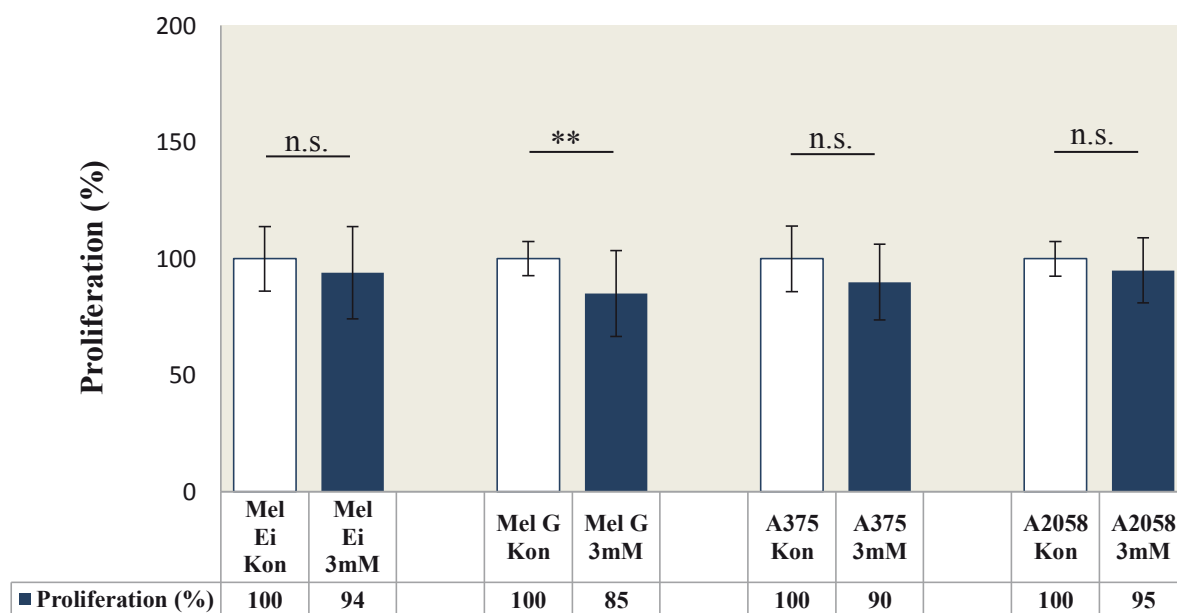


Abb. 15: Dargestellt ist die photometrisch gemessene Absorption von wasserunlöslichem Formazan entsprechend der durchschnittlichen Proliferation der Zelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058 nach Zugabe von α -Methyl-DL-Histidin (3mM) verglichen mit der unstimulierten Kontrolle (Kon). Die Ergebnisse der unstimulierten Kontrollmessungen wurden als 100% angegeben. Alle Messungen wurden als Mittelwerte (N=3) und Standardabweichung je Konzentration dargestellt. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Versuchsabläufen, die jeweils als Vierfachbestimmungen durchgeführt wurden. Verglichen mit der unstimulierten Kontrolle sind die signifikanten Ergebnisse folgendermaßen gekennzeichnet: ** $p < 0,01$; n.s. = nicht signifikant.

5.4.3 Hemmung des Histamin-H₄-Rezeptors mit dem Antagonisten JNJ7777120

Der Histamin-H₄-Rezeptorantagonist JNJ7777120 hat eine über 1000-fach höhere Selektivität für den H₄R gegenüber den anderen Histamin-Rezeptoren und wurde in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 100nM, 1 μ M und 10 μ M. Durch eine H₄R-Hemmung wurde Einfluss auf eine mögliche Beteiligung an der autonomen Melanomzellproliferation genommen.

In Abbildung 16 ist ersichtlich, dass keine der Zelllinien bei einer Hemmung des Histamin-H₄-Rezeptors eine signifikante Beeinflussung des Wachstums verglichen zur Kontrollmessung ohne JNJ7777120-Zugabe aufwies. Ebenso konnten mittels Post hoc

(Bonferroni)-Test keine statistisch signifikanten Unterschiede im Proliferationsverhalten beim Vergleich der Zelllinien untereinander beobachtet werden (Tabellen nicht abgebildet).

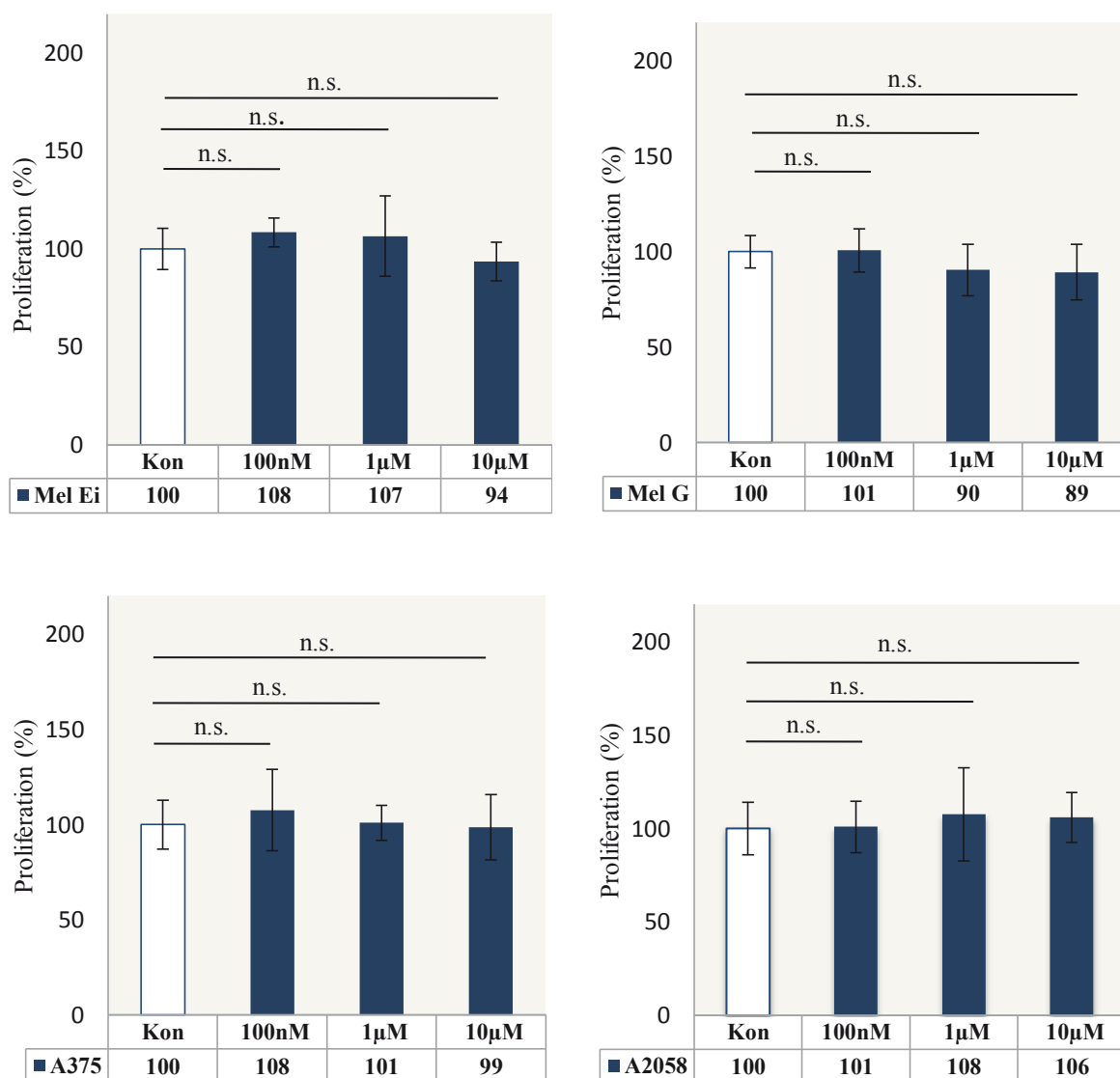
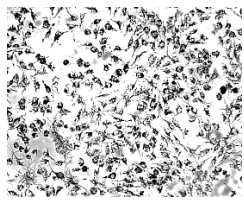
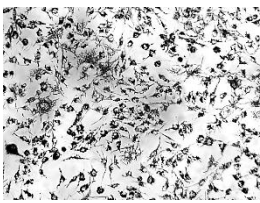
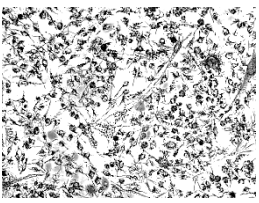
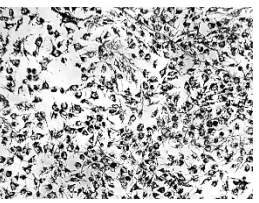


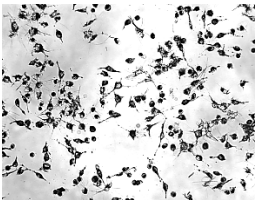

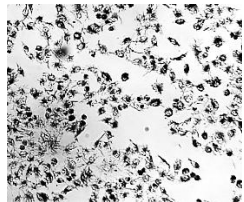
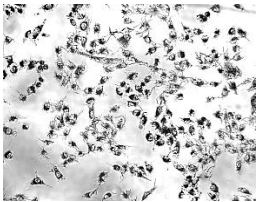
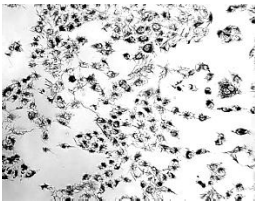
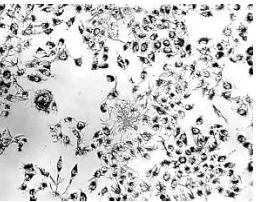
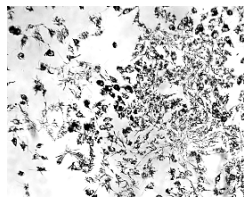
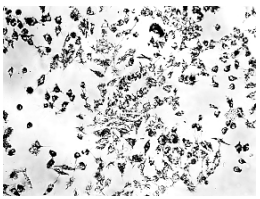
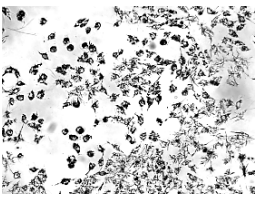
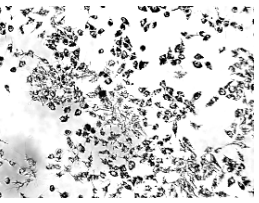


Abb. 16: Dargestellt ist die photometrisch gemessene Absorption von wasserunlöslichem Formazan entsprechend der durchschnittlichen Proliferation der Zelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058 nach Zugabe des Histamin-H₄-Rezeptorantagonisten JNJ777120 (100nM, 1µM, 10µM) verglichen mit der unstimulierten Kontrolle. Die Ergebnisse der unstimulierten Kontrollmessungen wurden als 100% angegeben. Alle Messungen wurden als Mittelwerte (N=3) und Standardabweichung je Konzentration dargestellt. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Versuchsabläufen, die jeweils als Vierfachbestimmungen durchgeführt wurden. Verglichen mit der unstimulierten Kontrolle sind die signifikanten Ergebnisse folgendermaßen gekennzeichnet: n.s. = nicht signifikant.

Das Proliferationsverhalten der primären Melanomzelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und der metastatischen Zelllinie A2058 nach Zugabe des Histamin-H₄-Rezeptorantagonisten JNJ7777120 wird verdeutlicht anhand von Bildausschnitten, die nach 3-stündiger Inkubation mit MTT von den 96-Well-Platten in 10-facher Vergrößerung mit dem Mikroskop (Axiovert 10) gemacht wurden (Tabelle 6). Ein Vergleich der Bilder nach MTT-Inkubation zeigte, dass die vier Zelllinien nach Zugabe des JNJ7777120 in den Konzentrationen 100nM, 1µM und 10µM keine Veränderungen der Zelldichte verglichen mit der Kontrolle ohne JNJ7777120-Zugabe aufwiesen.

Tabelle 6: 10-fache Vergrößerung der Zelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058 nach 72-stündiger JNJ7777120-Zugabe und 3-stündiger MTT-Inkubation. Die Zelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058 wurden mit einer Zelldichte von 4000 Zellen je *Well* ausgesät. Alle Zelllinien wurden nach 72-stündiger Inkubation ohne bzw. mit dem Histamin-H₄-Rezeptorantagonisten JNJ7777120 in den Konzentrationen 100nM, 1µM und 10µM sowie 3-stündiger Inkubation mit MTT unter Standardbedingungen unter 10-facher Vergrößerung mit dem Mikroskop (Axiovert 10) fotografiert. Das zugegebene MTT wurde bereits von den metabolisch aktiven Zellen in das unlösliche Formazansalz umgewandelt (hier zu erkennen an den schwarzen Zytoplasmeeinlagerungen).

	Kontrolle	100nM JNJ7777120	1µM JNJ7777120	10µM JNJ7777120
Mel Ei				
Mel G				
A375				
A2058				

5.4.4 Beteiligung des Histamin-H₄-Rezeptors bei Histamin-Stimulation

Zusätzlich zur Stimulation der Melanomzellen mit dem Histamin-H₄-Rezeptorantagonisten JNJ7777120 in den Konzentrationen 100nM, 1µM und 10µM erfolgte die Zugabe von 10nM Histamin zu jeder Konzentration JNJ7777120, da sich bei dieser Histamin-Konzentration die höchste Proliferationsrate bei allen Zelllinien gezeigt hat. Somit erfolgte eine Blockade der Histamin-Wirkung am H₄R bei gleichzeitiger Histamin-Stimulation an den anderen Histaminrezeptoren. Als Kontrollmessung dienten unter gleichen Bedingungen die unstimulierten Melanomzelllinien und die Stimulation der Zelllinien mit 10nM Histamin ohne Zugabe des Histamin-H₄-Rezeptorantagonisten (100%).

Abbildung 17 stellt die folgenden Ergebnisse graphisch dar. Die Zelllinie Mel Ei zeigte bei einer Konzentration von 10µM eine signifikante Proliferationshemmung auf 76% ($p < 0,001$) verglichen zur Kontrollmessung. Ebenfalls unter 10µM JNJ7777120-Zugabe konnte bei der Zelllinie A375 eine Proliferationshemmung auf 85% ($p < 0,05$) und bei der Zelllinie A2058 eine Proliferationshemmung auf 79% ($p < 0,01$) beobachtet werden. Es waren bei der Zelllinie Mel G keine signifikanten Proliferationsauswirkungen erkennbar. Die Konzentrationen 100nM und 1µM des Histamin-H₄-Rezeptorantagonisten bewirkten bei keiner Zelllinie eine signifikante Beeinflussung der Proliferation.

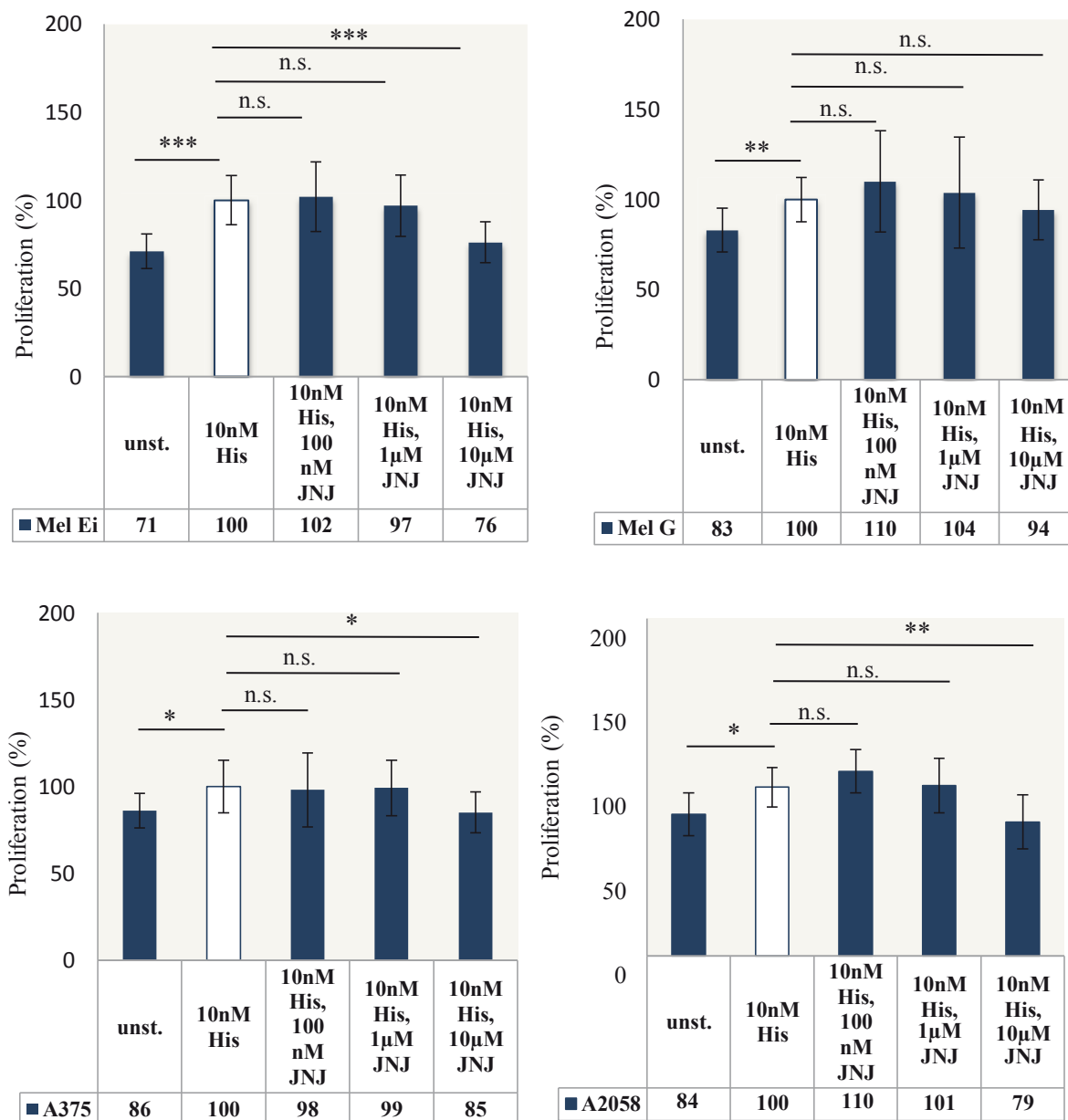


Abb. 17: Dargestellt ist die photometrisch gemessene Absorption von wasserunlöslichem Formazan entsprechend der durchschnittlichen Proliferation der Zelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058. Die Messungen erfolgten an unstimulierten Zellen (unst.) sowie nach Zugabe des Histamin- H_4 -Rezeptorantagonisten JNJ777120 (100nM, 1µM, 10µM) mit gleichzeitiger Gabe von 10nM Histamin bzw. Stimulation mit 10nM Histamin ohne JNJ777120-Zugabe. Die Ergebnisse der Stimulation mit 10nM Histamin ohne JNJ777120-Zugabe wurden als Kontrollmessung mit 100% angegeben. Alle Messungen wurden als Mittelwerte (N=3) und Standardabweichung je Konzentration dargestellt. Die Mittelwerte ergeben sich aus drei unabhängigen Versuchsabläufen, die jeweils als Vierfachbestimmungen durchgeführt wurden. Verglichen mit der unstimulierten Kontrolle sind die signifikanten Ergebnisse folgendermaßen gekennzeichnet: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; n.s. = nicht signifikant.

Tabelle 7 zeigt den Post hoc (Bonferroni)-Vergleich der Zelllinien untereinander bei Zugabe von 10 μ M JNJ7777120 und 10nM Histamin. Nur bei der Zelllinie Mel Ei konnte verglichen mit der Zelllinie Mel G ein signifikanter Unterschied im Proliferationsverhalten beobachtet werden (Post hoc-Analyse für 100nM und 1 μ M nicht dargestellt).

Tabelle 7: Vergleich der Zelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058 untereinander mittels Post hoc (Bonferroni)-Analyse auf statistisch signifikante Unterschiede in der Proliferation nach Hemmung des H₄R mit 10 μ M JNJ7777120 bei zeitgleicher 10nM Histamin-Stimulation.

Post hoc (Bonferroni)-Analyse	<i>p-value</i> *
Mel Ei ↔ Mel G	0,016
Mel Ei ↔ A375	0,780
Mel Ei ↔ A2058	1,000
Mel G ↔ A375	0,676
Mel G ↔ A2058	0,104
A375 ↔ A2058	1,000

*= $p < 0,05$ ist signifikant

6 Diskussion

Das maligne Melanom ist eine Tumorerkrankung, die im Stadium der Metastasierung eine infauste Prognose aufweist. Es ist daher wichtig, die regulierenden Mechanismen zu verstehen, die eine Proliferation von Melanomzellen fördern. Die Melanomentstehung schließt Mechanismen ein, die es den Melanomzellen ermöglichen, autonom zu proliferieren. Außerdem sind sie in der Lage, sich vor regulativen, physiologischen Mechanismen des Körpers, die eine autonome Proliferation verhindern, zu schützen. Die Wachstumsautonomie der Tumorzellen wird vor allem durch die Produktion von Wachstumsfaktoren und die Überexpression ihrer Rezeptoren ermöglicht (Shih und Herlyn 1993, Lázár-Molnár et al. 2000, Satyamoorthy und Herlyn 2002). Zusätzlich gibt es Mechanismen, die sie vor dem Einfluss physiologischer Wachstumsinhibitoren schützen. Bereits gut charakterisierte Wachstumsfaktoren von Melanomzellen sind der basische Fibroblasten-Wachstumsfaktor (bFGF) und CXC-Chemokine, wie *Gro α* (*growth regulated oncogene α*) oder Interleukin-8 (Becker et al. 1989, Schadendorf et al. 1993, Luan et al. 1997). Ein weiterer dieser Wachstumsfaktoren, dem eine Beteiligung an der Proliferation von Melanomzellen zugeschrieben wird, ist das biogene Amin Histamin. Im menschlichen Organismus ist Histamin als Gewebshormon und Neurotransmitter an der Regulation zahlreicher physiologischer Funktionen beteiligt. Dass Histamin jedoch nicht nur im Rahmen physiologischer Prozesse eine Rolle spielt, sondern auch als Wachstumsfaktor die Proliferation verschiedener Neoplasien, wie dem Kolon- und dem Mammakarzinom beeinflussen kann, konnte bereits nachgewiesen werden (Tutton und Barkla 1983, Garcia-Caballero et al. 1988, Adams et al. 1994, Cricco et al. 1994, Medina et al. 2008). Weiterhin kann durch den Nachweis, dass sich Melanomzellen im Histamin-Gehalt sowie in der Expression der Histamin-Rezeptoren von Melanozyten unterscheiden, vermutet werden, dass Histamin auch bei Melanomzellen als autonomer Wachstumsfaktor fungiert (Falus et al. 2001, Hegyesi et al. 2005). Es gibt jedoch Widersprüche bezüglich der Auswirkungen einer Proliferationsbeeinflussung. Während durch Histamin in niedrigen Konzentrationen (10nM) eine Proliferationssteigerung über den H₂R beschrieben wurde, scheint der H₁R bei Stimulation mit hohen Histamin-Konzentrationen (10 μ M) an einer Proliferationshemmung beteiligt zu sein (Lázár-Molnár et al. 2002). Die Beteiligung des H₄R an einer autonomen Proliferation der Melanomzellen durch Histamin ist bisher weitgehend ungeklärt.

Damit Histamin als autonomer Wachstumsfaktor bei der Melanomzellproliferation fungieren kann, müssten Melanomzellen in der Lage sein, ohne externen Stimulus Histamin zu produzieren und an ihre Mikroumgebung abzugeben. Die Arbeitsgruppe um Haak-Frendscho *et al.* konnte die Protein-Expression der L-Histidin-Decarboxylase in Melanomzellen nachweisen, nicht jedoch in Melanozyten. Dabei wiesen die Melanomzelllinien primärer Abstammung eine signifikant höhere Expression des HDC-Proteins auf als Zelllinien metastasierter Abstammung (Haak-Frendscho *et al.* 2000, Darvas *et al.* 2003). Der in dieser Arbeit durchgeführte HDC-Protein-Nachweis mittels Western-Blot und fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie bestätigte, dass alle vier Melanomzelllinien die HDC intrazellulär exprimieren. Ein Vergleich der mittleren relativen Fluoreszenzintensitäten zwischen den Zelllinien erbrachte jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede. Somit unterschied sich in dieser Arbeit die metastasierte Zelllinie A2058 entgegen den Beobachtungen der Arbeitsgruppen um Haak-Frendscho *et al.* sowie Darvas *et al.* in ihrem HDC-Protein-Gehalt nicht signifikant von den primären Melanomzelllinien.

Durch den Nachweis des Histamin-synthetisierenden Enzyms, der L-Histidin-Decarboxylase, kann vermutet werden, dass Melanomzellen in der Lage sind, Histamin intrazellulär zu bilden. Um zu überprüfen, ob die Zelllinien ohne externen Stimulus in der Lage sind, Histamin in das umgebende Kultivierungsmedium abzugeben, wurde die Histamin-Konzentration 24h nach dem letzten Wechseln des Zellkulturmediums gemessen. Hierbei konnte davon ausgegangen werden, dass eine höhere Histamin-Konzentration im Medium auf eine höhere Histamin-Produktion zurückzuführen ist, da in der Literatur beschriebene Beobachtungen zeigten, dass Melanomzellen Histamin nicht speichern (Darvas *et al.* 2003). Mittels ELISA war eine basale Histamin-Sekretion bei allen vier Zelllinien nachweisbar. Bei den im Kultivierungsmedium gemessenen Werten der Histamin-Konzentration ist ferner zu bedenken, dass Dy *et al.* Histamin-abbauende Enzyme im fetalen Kälberserum (FCS) nachweisen konnten. FCS ist ein Bestandteil des Kultivierungsmediums, so dass die in dieser Arbeit gemessene basale Histamin-Sekretion geringer sein kann als die von den Melanomzellen tatsächlich abgegebene Histamin-Menge (Dy *et al.* 1982).

Bei nachgewiesener Histamin-Produktion müssen jedoch als weitere Bedingung einer autonomen Melanomzellproliferation die Zelllinien Histamin-Rezeptoren exprimieren. Vorausgegangene Arbeiten konnten die mRNA-Expression von Histamin-Rezeptoren anhand von Melanomzellen und Melanomgewebe nachweisen. Dabei zeigte sich das Vorkommen

verschiedener Expressionsmuster und -häufigkeiten, die jeweils in Abhängigkeit von der untersuchten Zelllinie variierten (Lázár-Molnár et al. 2002, Szincsák et al. 2002, Hegyesi et al. 2005, Massari et al. 2011). In dieser Arbeit konnte die RNA-Expression von allen vier Histamin-Rezeptoren durch die primären Zelllinien Mel Ei und A375 sowie durch die metastasierte Zelllinie A2058 nachgewiesen werden. Im Unterschied zu diesen Zelllinien exprimierte die primäre Zelllinie Mel G nur den Histamin-H₂-Rezeptortyp auf RNA-Ebene.

Der Nachweis, dass der H₄R von Melanomzellen und Melanomgewebe auf RNA-Ebene exprimiert wird, erfolgte erstmals im Jahr 2011 durch die Forschungsgruppe Massari *et al.*, die den H₄R anhand von Melanomgewebe sowie einer primären und einer metastasierten Melanomzelllinie nachweisen konnte (Massari et al. 2011). In dieser Arbeit exprimierten auf RNA-Ebene drei der vier Zelllinien (Mel Ei, A375, A2058) den H₄R.

Aufgrund des Nachweises der RNA-Expression von Histamin-Rezeptoren in Melanomzelllinien, kann man vermuten, dass die Voraussetzungen gegeben sind, dass sowohl von den Melanomzellen selbst produziertes Histamin als auch eine externe Histamin-Stimulation Einfluss auf deren Proliferationsverhalten nehmen könnten. Welchen Einfluss eine Hemmung der Histamin-Synthese auf die Proliferation von Karzinomen hat, konnten bisherige experimentelle Studien verdeutlichen. Die Hemmung der L-Histidin-Decarboxylase durch den irreversiblen Enzyminhibitor α -Fluoromethylhistidin verursachte in verschiedenen Tumormodellen eine Proliferationshemmung (Bartholeyns und Bouclier 1984). Ebenso konnte mit dem Einsatz spezifischer Antisense-Oligonukleotide in Melanomzelllinien eine Proliferationshemmung bewirkt werden (Hegyesi et al. 2001). Eine Hemmung der HDC erfolgte in dieser Arbeit mit dem reversiblen Enzyminhibitor α -Methyl-DL-Histidin. Francis *et al.* wiesen die Wirksamkeit des Inhibitors in einer Konzentration von 3mM anhand einer signifikanten Proliferationshemmung maligner Zelllinien (Gallengangskarzinome) nach (Francis et al. 2012). Nach 72-stündiger Inkubation mit 3mM α -Methyl-DL-Histidin führte eine Hemmung der HDC und somit der autonomen Histamin-Produktion bei der Zelllinie Mel G zu einer signifikant geringeren Proliferation. Die Zelllinien Mel Ei, A375 und A2058 zeigten jedoch keine signifikante Proliferationshemmung. Ergänzend sollte die Durchführung eines Histamin-ELISA aufzeigen, ob eine HDC-Hemmung Einfluss auf die autonome Histamin-Sekretion ausübt. Nur bei den beiden primären Zelllinien Mel Ei und A375 konnte eine signifikante Abnahme der autonomen Histamin-Sekretion nachgewiesen werden. Es kann angenommen werden, dass bei beiden Zelllinien die Abnahme der Histamin-Sekretion auf eine verminderte intrazelluläre Histamin-Produktion zurückgeführt werden kann. Die

signifikant geringeren Histamin-Sekretionen beider Zelllinien spiegelten sich nicht in einer Proliferationshemmung wider. Dies lässt vermuten, dass die autonome Histamin-Produktion der Melanomzelllinien keinen direkten Effekt auf das Proliferationsverhalten ausübt. Ferner könnte ein Grund des unterschiedlichen Ansprechens im Sekretions- und Proliferationsverhalten in der Kultivierungszeit liegen, die aufgrund der hohen Wachstumsrate auf 72h beschränkt werden musste. Man könnte mutmaßen, dass nach längerer Kultivierungsdauer eine Proliferationshemmung bei allen Zelllinien zu beobachten gewesen wäre. Weitere Gründe für das unterschiedliche Wachstums- und Sekretionsverhalten könnten in der Reversibilität des eingesetzten Hemmstoffes und der unterschiedlichen Aktivität der HDC von Zelllinie zu Zelllinie begründet liegen.

Bisherige Beobachtungen durch Lázár-Molnár *et al.* lassen vermuten, dass eine externe Histamin-Zugabe die Proliferation von Melanomzellen beeinflusst. In niedrigen Konzentrationen (10nM) konnte Histamin über den H₂R eine Proliferationssteigerung von Melanomzellen bewirken, während in höheren Histamin-Konzentrationen (10µM) eine Proliferationshemmung über den H₁R berichtet wurde (Lázár-Molnár *et al.* 2002). Entsprechend diesen Beobachtungen wurden im Rahmen dieser Arbeit Proliferationstests mit Histamin-Konzentrationen von 10nM bis 10µM durchgeführt. Eine Stimulation mit 10nM Histamin über einen Zeitraum von 72h führte bei allen Melanomzelllinien zu einer signifikanten Proliferationssteigerung mit Werten von 131% (A375) bis 161% (Mel Ei) verglichen zur Kontrollmessung ohne externe Histamin-Stimulation (100%). Mit ansteigenden Histamin-Konzentrationen verhielten sich die Zelllinien jedoch zunehmend unterschiedlich hinsichtlich einer signifikanten bzw. nicht signifikanten Proliferationssteigerung. Die vorliegenden Ergebnisse entsprechen damit den bisherigen Beobachtungen, dass eine Histamin-Stimulation in Konzentrationen von 10nM die Proliferation von Melanomzellen fördert. Nach Lázár-Molnár *et al.* ist die Proliferationssteigerung über den H₂R bedingt (Lázár-Molnár *et al.* 2002). Diese Auswirkung einer Rezeptor-Stimulation durch Histamin kann in dieser Arbeit ebenfalls vermutet werden, da die Zelllinie Mel G, die nur den H₂R exprimiert, sich im Proliferationsverhalten nicht von den anderen Zelllinien unterscheidet und ebenfalls eine signifikante Proliferationssteigerung aufweist.

Die durch Lázár-Molnár *et al.* beschriebenen Auswirkungen einer Proliferationshemmung bei Histamin-Konzentrationen von 10µM konnten anhand der Ergebnisse dieser Arbeit nicht gemacht werden, da bei keiner Zelllinie eine direkte Proliferationshemmung verglichen zur unstimulierten Kontrolle beobachtet werden konnte. Jedoch konnten bei den Zelllinien Mel

Ei, Mel G und A375 fehlende Proliferationssteigerungen bei Zunahme der Histamin-Konzentration festgestellt werden. Mögliche Ursachen könnten in kompensatorischen Adaptationsmechanismen oder der Möglichkeit der Rezeptorinternalisierung liegen. Bei den Zelllinien Mel Ei, A375 und A2058, die im Vergleich zur Zelllinie Mel G die RNA aller vier Histamin-Rezeptoren exprimieren, sollte jedoch ferner bedacht werden, dass Histamin über jeden der Rezeptoren auf die Proliferation einwirken könnte. Somit könnten die unterschiedlichen intrazellulären Signalwege der Rezeptoren zeitlich mehrere Proliferations-effekte ausüben. In diesem Zusammenhang wäre denkbar, dass die Unterschiede der Zelllinien bezüglich der Proliferationssteigerung auf quantitative Unterschiede im Expressionsverhalten der einzelnen Histamin-Rezeptoren zurückgeführt werden könnten.

Die Rolle des H₄R am Proliferationsverhalten der Melanomzellen wurde durch die Arbeitsgruppe um Massari *et al.* im Jahr 2011 das erste Mal beschrieben. Es wurde die Präsenz des H₄R in einer primären und einer metastasierten Melanomzelllinien nachgewiesen und mittels Histamin-H₄-Rezeptoragonisten (VUF 8430, Clobenpropit) eine Proliferationshemmung beschrieben. Die Proliferationshemmung durch H₄R-Agonisten begründen Massari *et al.* mit der Auslösung einer gesteigerten Zelldifferenzierung und Melanogenese mit Zellalterung (Massari et al. 2011). Um den Einfluss des H₄R auf das autonome Proliferationsverhalten der Zelllinien Mel Ei, Mel G, A375 und A2058 zu überprüfen, wurden die Zelllinien über 72h mit dem H₄R-Antagonisten JNJ7777120 inkubiert. Der H₄R-Antagonist JNJ7777120 zeichnet sich durch seine hohe Affinität und Selektivität zum humanen H₄R aus. Die Ergebnisse dieser Proliferationstests nach Zugabe von 100nM, 1µM und 10µM JNJ7777120 zeigen, dass keine signifikanten Änderungen im Proliferationsverhalten der vier Zelllinien beobachtet werden konnten. Eine Hemmung des H₄R hat somit unter den Bedingungen einer autonomen Histamin-Produktion keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der hier verwendeten Zelllinien.

Um zu überprüfen, ob dem H₄R bei externer Histamin-Stimulation eine Rolle im Proliferationsverhalten zuteil wird, erfolgte bei gleichzeitiger Hemmung des Histamin-H₄-Rezeptors, die Stimulation mit 10nM Histamin. Wie erwartet, lassen sich bei der Zelllinie Mel G in den Ergebnissen aufgrund des Fehlens des H₄R keine signifikanten Proliferationsunterschiede nachweisen. Im Vergleich zur alleinigen Histamin-Stimulation konnte bei den Zelllinien Mel Ei, A375 und A2058 nur bei der höchsten von uns eingesetzten Konzentration des Histamin-H₄-Rezeptorantagonisten (10µM) eine signifikante Proliferationshemmung beobachtet werden. Eine Ursache, warum der Rezeptorantagonist erst in der höchsten von uns

eingesetzten Konzentration ($10\mu\text{M}$) wirkt, könnte in der hohen Histamin-Affinität liegen, die Histamin zu dem H_4R aufweist. Somit kann der Rezeptorantagonist erst in hohen Konzentrationen das Histamin aus seiner Rezeptorbindung verdrängen (Lim et al. 2010).

Entgegen den Beobachtungen von Massari *et al.*, in denen der H_4R eine Proliferationshemmung verursachte, kann in dieser Arbeit geschlussfolgert werden, dass Histamin in Konzentrationen, die die autonome Histamin-Sekretion übersteigt, über eine H_4R -Stimulation eine Proliferationssteigerung bewirkt. Ein Grund für die unterschiedlichen Beobachtungen könnte im Versuchsaufbau begründet sein. Während in dieser Arbeit der H_4R -Antagonist JNJ7777120 eingesetzt wurde, erfolgte durch Massari *et al.* der Einsatz von H_4R -Agonisten mit anderen Affinitäten und Selektivitäten am Rezeptor.

Die oben genannten Ergebnisse legen nahe, dass Histamin unter autonomen Bedingungen nur einen geringen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der untersuchten Melanomzelllinien ausübt. Erst unter Histamin-Stimulation ist ein signifikanter Proliferationszuwachs zu verzeichnen, der sowohl die H_2R -Funktion als auch den H_4R einbezieht. In diesem Zusammenhang ist zu bedenken, dass Histamin physiologisch in hohen Konzentrationen von Mastzellen abgegeben werden kann. Neuere Studien belegen, dass Mastzellen vor allem im umgebenden Gewebe maligner Melanome akkumulieren (Duncan et al. 1998, Ribatti et al. 2003). Somit kann vermutet werden, dass Mastzellen mit ihrer Fähigkeit der Histamin-Abgabe in der Lage sind, die Proliferation und Progression von Melanomzellen zu beeinflussen.

7 Schlussfolgerung

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Analyse einer autonomen und induzierten Proliferationsbeeinflussung maligner Melanomzellen durch das körpereigene Gewebshormon und den Neurotransmitter Histamin.

Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen, dass alle vier Zelllinien die Voraussetzungen einer autonomen Histamin-Sekretion und damit die Möglichkeit einer autokrinen und parakrinen Beeinflussung umgebender Zellen erfüllen. Zu diesen Voraussetzungen zählen der Nachweis der RNA-Expression von Histamin-Rezeptoren sowie die Expression des Histamin-synthetisierenden Enzyms, der L-Histidin-Decarboxylase, und eine autonome Histamin-Sekretion. Ein Vergleich der Zelllinien untereinander ergibt, dass sowohl der HDC-Gehalt, als auch die basale Histamin-Sekretion und die Rezeptor-Expression nicht von ihrer Abstammung aus einem Primärtumor oder einer metastasierten Melanomzelllinie abhängig sind.

Die externe Histamin-Stimulation ergibt in Übereinstimmung mit bereits vorhandenen Daten, dass ein Proliferationszuwachs bei allen vier Melanomzelllinien durch die Histamin-Konzentration von 10nM, die die autonome Histamin-Produktion übersteigt, nachgewiesen werden kann (Lázár-Molnar et al. 2002). Dagegen bewirkt die reversible Hemmung der Histamin-Synthese unterschiedliche Ergebnisse der Histamin-Sekretion und Proliferation im Vergleich der vier Zelllinien untereinander. Während bei drei Zelllinien das Proliferationsverhalten nicht beeinflusst werden kann, sinkt die Histamin-Sekretion bei zwei dieser Zelllinien signifikant ab. Dieser Effekt der Abnahme der Histamin-Sekretion wirkt sich somit bei einer reversiblen HDC-Hemmung nicht auf das Proliferationsverhalten aus. Die Proliferationsbeeinflussung durch das von Melanomzellen autonom produzierte Histamin ist damit als gering einzuschätzen und rückt anhand unserer Daten als mögliche Therapieoption in den Hintergrund. Es bleibt jedoch zu bedenken, dass Melanomzellen unter anderem durch die Möglichkeit der autonomen Histamin-Sekretion in der Lage sind, auf parakrinem Weg ihre Mikroumgebung so zu beeinflussen, dass diese den Tumorzellen ein Überleben und Wachstum ermöglicht. Denkbare Angriffspunkte sind dabei die Modulation des Immunsystems, die Angiogenese oder die Adhäsion bzw. Metastasenformatierung.

Bei der Frage, welche Rolle der Histamin-H₄-Rezeptor im Rahmen der direkten Proliferation ausübt, kann beobachtet werden, dass eine H₄R-Antagonisierung unter den Bedingungen der autonomen Histamin-Sekretion keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten der Melanomzelllinien ausübt. Somit kommt unter autonomen Wachstumsbedingungen dem H₄R

keine Bedeutung im Rahmen der direkten Wachstumsbeeinflussung zu. Das Proliferationsverhalten kann erst beeinflusst werden, indem neben der H₄R-Antagonisierung gleichzeitig eine externe Histamin-Stimulation mit Konzentrationen von 10nM Histamin durchgeführt wird. Unter diesen Bedingungen bewirkt eine Rezeptorhemmung eine Proliferationsabnahme. Im Rahmen der Proliferation kommt somit dem H₄R unter hoher Histamin-Stimulation die Funktion der Proliferationssteigerung zu. Damit entsprechen die Ergebnisse nicht den bisher in der Literatur beschriebenen Daten, die dem H₄R die Funktion einer Proliferationshemmung nachweisen (Massari et al. 2011).

Zusammenfassend verdeutlichen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Histamin als direkter Wachstumsfaktor die Proliferation von Melanomzellen steigern kann. Jedoch wirkt sich eine Beeinflussung der Histamin-Synthese sowie des H₄R-Signalweges unter den Bedingungen einer autonomen Histamin-Produktion nicht auf eine Wachstumsbeeinflussung aus. Doch auch wenn die direkte Wachstumsbeeinflussung durch Histamin unter autonomer Histamin-Produktion nur eine untergeordnete Rolle spielt, sollte künftig weiterhin experimentell untersucht werden, ob Histamin und dessen H₄R im Rahmen der indirekten Wachstumsbeeinflussung durch Modulation des Immunsystems von entscheidender Rolle für das Tumorwachstum von Melanomzellen ist und somit einen Angriffspunkt in den Therapieoptionen des malignen Melanoms darstellt.

8 Literaturverzeichnis

Ackermann D. 1910. Über den Ursprung der Basen bei der Verwesung. *Z Physiol Chem*, 60:482–501.

Adams WJ, Lawson JA, Morris DL. 1994. Cimetidine inhibits in vivo growth of human colon cancer and reverses histamine stimulated in vitro and in vivo growth. *Gut*, 35(11):1632-1636.

Altmeyer P, Paech V. 2011. *Enzyklopädie Dermatologie Allergologie Umweltmedizin*. Zweite Auflage. Berlin: Springer-Verlag.

Ang KK, Peters LJ, Weber RS, Morrison WH, Frankenthaler RA, Garden AS, Goepfert H, Ha CS, Byers RM. 1994. Postoperative radiotherapy for cutaneous melanoma of the head and neck region. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 30(4):795-798.

Armstrong BK, Krickler A. 1994. Cutaneous melanoma. *Cancer Surv*, 19-20:219-240.

Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. 1983. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H₃) of histamine receptor. *Nature*, 302(5911):832-837.

Ash AS, Schild HO. 1966. Receptors mediating some actions of histamine. *Br J Pharmacol Chemother*, 27:427-439.

Attoub S, Moizo L, Sobhani I, Laigneau JP, Lewin MJ, Bado A. 2001. The H₃ receptor is involved in cholecystokinin inhibition of food intake in rats. *Life Sci*, 69(4):469-478.

Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, Buzaid AC, Cochran AJ, Coit DG, Ding S, Eggermont AM, Flaherty KT, Gimotty PA, Kirkwood JM, McMasters KM, Mihm MC Jr, Morton DL, Ross MI, Sober AJ, Sondak VK. 2009. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, 27(36):6199-6206.

Ballo MT, Strom EA, Zagars GK, Bedikian AY, Prieto VG, Mansfield PF, Lee JE, Gershenwald JE, Ross MI. 2002. Adjuvant irradiation for axillary metastases from malignant melanoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 52(4):964-972.

Barger G, Dale HM. 1910. The presence in ergot and physiological activity of B-iminazoylethylamine. *J Physiol Paris*, 40:38–40.

- Bartholeyns J, Bouclier M. 1984. Involvement of histamine in growth of mouse and rat tumors: antitumoral properties of monofluoromethylhistidine, an enzyme-activated irreversible inhibitor of histidine decarboxylase. *Cancer Res*, 44(2):639-645.
- Bartholeyns J, Fozard JR. 1985. Role of histamine in tumor development. *Trends Pharmacol*, 6:123-125.
- Becker D, Meier CB, Herlyn M. 1989. Proliferation of human malignant melanomas is inhibited by antisense oligodeoxynucleotides targeted against basic fibroblast growth factor. *EMBO J*, 8:2685-3691.
- Best CH, Dale HH, Dudley HW, Thorpe WV. 1927. The nature of the vaso-dilator constituents of certain tissue extracts. *J Physiol*, 62(4):397-417.
- Black JW, Duncan WA, Durant CJ, Ganellin CR, Parsons EM. 1972. Definition and antagonism of histamine H₂-receptors. *Nature*, 236(5347):385-390.
- Brescia P, Banks P. 2009. Quantifying Cytotoxicity of Thiostrepton on Mesothelioma Cells using MTT Assay and the Epoch™ Microplate Spectrophotometer. BioTek Instruments, Inc. USA: 1-3.
- Buckland KF, Williams TJ, Conroy DM. 2003. Histamine induces cytoskeletal changes in human eosinophils via the H(4) receptor. *Br J Pharmacol*, 140(6):1117-1127.
- Burmeister BH, Smithers BM, Poulsen M, McLeod GR, Bryant G, Tripcony L, Thorpe C. 1995. Radiation therapy for nodal disease in malignant melanoma. *World J Surg*, 19(3):369-371.
- Büttner P, Garbe C, Bertz J, Burg G, d'Hoedt B, Drepper H, Guggenmoos-Holzmann I, Lechner W, Lippold A, Orfanos CE, et al. 1995. Primary cutaneous melanoma. Optimized cutoff points of tumor thickness and importance of Clark's level for prognostic classification. *Cancer*, 75(10):2499–2506.
- Cameron W, Doyle K, Rocklin RE. 1986. Histamine type I (H₁) receptor radioligand binding studies on normal T cell subsets, B cells, and monocytes. *J Immunol*, 136(6):2116-2120.
- Cameron DA, Cornbleet MC, Mackie RM, Hunter JA, Gore M, Hancock B, Smyth JF. 2001. Adjuvant interferon alpha 2b in high risk melanoma - the Scottish study. *Br J Cancer*, 84(9):1146-1149.

- Casale TB, Rodbard D, Kaliner M. 1985. Characterization of histamine H₁ receptors on human peripheral lung. *Biochem Pharmacol*, 34(18):3285-3292.
- Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML, Saxman S, Destro AN, Panageas KS, Begg CB, Agarwala SS, Schuchter LM, Ernstoff MS, Houghton AN, Kirkwood JM. 1999. Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol*, 17(9):2745-2751.
- Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA. 2011. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*, 364(26):2507-2516.
- Chiarion Sileni V, Nortilli R, Aversa SM, Paccagnella A, Medici M, Corti L, Favaretto AG, Cetto GL, Monfardini S. 2001. Phase II randomized study of dacarbazine, carmustine, cisplatin and tamoxifen versus dacarbazine alone in advanced melanoma patients. *Melanoma Res*, 11(2):189-196.
- Cianchi F, Cortesini C, Schiavone N, Perna F, Magnelli L, Fanti E, Bani D, Messerini L, Fabbroni V, Perigli G, Capaccioli S, Masini E. 2005. The role of cyclooxygenase-2 in mediating the effects of histamine on cell proliferation and vascular endothelial growth factor production in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 11:6807-6815.
- Clapham J, Kilpatrick GJ. 1992. Histamine H₃ receptors modulate the release of [³H]-acetylcholine from slices of rat entorhinal cortex: evidence for the possible existence of H₃ receptor subtypes. *Br J Pharmacol*, 107(4):919-923.
- Clark WH, From L, Bernardino EA, Mihm MC. 1969. The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res*, 29(3):705-727.
- Clark MA, Korte A, Egan RW. 1993. Guanine nucleotides and pertussis toxin reduce the affinity of histamine H₃ receptors on AtT-20 cells. *Agents Actions*, 40(3-4):129-134.
- Clark EA, Hill SJ. 1996. Sensitivity of histamine H₃ receptor agonist-stimulates [³⁵S]GTP gamma[S] binding to pertussis toxin. *Eur J Pharmacol*, 296(2):223-225.
- Cogé F, Guénin SP, Rique H, Boutin JA, Galizzi JP. 2001. Structure and expression of the human histamine H₄-receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 284(2):301-309.

Connelly WM, Shenton FC, Lethbridge N, Leurs R, Waldvogel HJ, Faull RL, Lees G, Chazot PL. 2009. The histamine H4 receptor is functionally expressed on neurons in the mammalian CNS. *Br J Pharmacol*, 157(1):55–63.

Cricco GP, Davio CA, Martin G, Engel N, Fitzsimons CP, Bergoc RM, Rivera ES. 1994. Histamine as an autocrine growth factor in experimental mammary carcinomas. *Agents Actions*, 43(1-2):17-20.

Dale HH, Laidlaw PP. 1910. The physiological action of beta-imidazoylethylamine. *J Physiol*, 41(5):318–344.

Darvas Z, Sakurai E, Schwelberger HG, Hegyesi H, Rivera E, Ohtsu H, Watanabe T, Pállinger E, Falus A. 2003. Autonomous histamine metabolism in human melanoma cells. *Melanoma Res*, 13(3):239–246.

De Backer MD, Gommeren W, Moereels H, Nobels G, Van Gompel P, Leysen JE, Luyten WH. 1993. Genomic cloning, heterologous expression and pharmacological characterization of a human histamine H₁ receptor. *Biochem Biophys Res Commun*, 197(3):1601-1608.

De Esch IJ, Thurmond RL, Jongejan A, Leurs R. 2005. The histamine H4 receptor as a new therapeutic target for inflammation. *Trends Pharmacol Sci*, 26(9):462–469.

Dijkstra D, Leurs R, Chazot P, Shenton FC, Stark H, Werfel T, Gutzmer R. 2007. Histamine downregulates monocyte CCL2 production through the histamine H4 receptor. *J Allergy Clin Immunol*, 120(2):300-307.

Dijkstra D, Stark H, Chazot PL, Shenton FC, Leurs R, Werfel T, Gutzmer R. 2008. Human inflammatory dendritic epidermal cells express a functional histamine H4 receptor. *J Invest Dermatol*, 128(7):1696-1703.

Dorval T, Négrier S, Chevreau C, Avril MF, Baume D, Cupissol D, Oskam R, de Peuter R, Vinke J, Herrera A, Escudier B. 1999. Randomized trial of treatment with cisplatin and interleukin-2 either alone or in combination with interferon-alpha-2a in patients with metastatic melanoma: a Federation Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer Multicenter, parallel study. *Cancer*, 85(5):1060-1066.

Duncan L, Richards L, Mihm Jr M. 1998. Increased mast cell density in invasive melanoma. *J Cutan Pathol*, 25:11-15.

- Dy M, Lebel B, Schneider E. 1982. Presence of histaminase in fetal calf sera. *Journal of Immunological Methods*, 48: 261-265.
- Endou M, Poli E, Levi R. 1993. Histamine H₃-receptor signaling in the heart: possible involvement of G_i/G_o proteins and N-type Ca⁺⁺ channels. *J Pharmacol Exp Ther*, 269(1):221-229.
- Eton O, Legha SS, Bedikian AY, Lee JJ, Buzaid AC, Hodges C, Ring SE, Papadopoulos NE, Plager C, East MJ, Zhan F, Benjamin RS. 2002. Sequential biochemotherapy versus chemotherapy for metastatic melanoma: results from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol*, 20(8):2045-2052.
- Falkson CI, Ibrahim J, Kirkwood JM, Coates AS, Atkins MB, Blum RH. 1998. Phase III trial of dacarbazine versus dacarbazine with interferon alpha-2b versus dacarbazine with tamoxifen versus dacarbazine with interferon alpha-2b and tamoxifen in patients with metastatic malignant melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group study. *J Clin Oncol*, 16(5):1743-1751.
- Falus A, Hegyesi H, Lázár-Molnár E, Pócs Z, László V, Darvas Z. 2001. Paracrine and autocrine interactions in melanoma: histamine is a relevant player in local regulation. *Trends Immunol*, 22(12):648–652.
- Francis H, DeMorrow S, Venter J, Onori P, White M, Gaudio E, Francis T, Greene JF Jr, Tran S, Meininger CJ, Alpini G. 2012. Inhibition of histidine decarboxylase ablates the autocrine tumorigenic effects of histamine in human cholangiocarcinoma. *Gut*, 61(5):753-764.
- Fuhrmann D, Lippold A, Borrosch F, Ellwanger U, Garbe C, Suter L. 2001. Should adjuvant radiotherapy be recommended following resection of regional lymph node metastases of malignant melanomas? *Br J Dermatol*, 144(1):66-70.
- Fukui H, Fujimoto K, Mizuguchi H, Sakamoto K, Horio Y, Takai S, Yamada K, Ito S. 1994. Molecular cloning of the human histamine H₁ receptor gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 201(2):894-901.
- Gantner F, Sakai K, Tusche MW, Cruikshank WW, Center DM, Bacon KB. 2002. Histamine h(4) and h(2) receptors control histamine-induced interleukin-16 release from human CD8(+) T cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 303(1):300-307.

- Gantz I, Schäffer M, DelValle J, Logsdon C, Campbell V, Uhler M, Yamada T. 1991. Molecular cloning of a gene encoding the histamine H₂ receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(2):429-433.
- Garbe C, Büttner P, Weiss J, Soyer HP, Stocker U, Krüger S, Roser M, Weckbecker J, Panizzon R, Bahmer F, et al. 1994. Risk factors for developing cutaneous melanoma and criteria for identifying persons at risk: multicenter case-control study of the Central Malignant Melanoma Registry of the German Dermatological Society. *J Invest Dermatol*, 102(5):695-699.
- Garcia-Caballero M, Neugebauer E, Campos R, Nunez de Castro I, Vara-Thorbeck C. 1988. Increased histidine decarboxylase (HDC) activity in human colorectal cancer: results of a study on ten patients. *Agents Actions*, 23(3-4):357-360.
- Garcia-Caballero M, Neugebauer E, Rodriguez F, Nuñez de Castro I, Vara-Thorbeck C. 1994. Histamine synthesis and content in benign and malignant breast tumours. Its effects on other host tissues. *Surg Oncol*, 3(3):167-173.
- Giovannini MG, Bartolini L, Bacciottini L, Greco L, Blandina P. 1999. Effects of histamine H₃ receptor agonists and antagonists on cognitive performance and scopolamine-induced amnesia. *Behav Brain Res*, 104(1-2):147-155.
- Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. 2006. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol*, 126(1):154-160.
- Graff L, Frungieri M, Zanner R, Pohlinger A, Prinz C, Gratzl M. 2002. Expression of histidine decarboxylase and synthesis of histamine by human small cell lung carcinoma. *Am J Pathol*, 160(5):1561-1565.
- Greene MH, Clark WH Jr, Tucker MA, Kraemer KH, Elder DE, Fraser MC. 1985. High risk of malignant melanoma in melanoma-prone families with dysplastic nevi. *Ann Intern Med*, 102(4):458-465.
- Grob JJ, Gouvernet J, Aymar D, Mostaque A, Romano MH, Collet AM, Noe MC, Diconstanzo MP, Bonerandi JJ. 1990. Count of benign melanocytic nevi as a major indicator of risk for nonfamilial nodular and superficial spreading melanoma. *Cancer*, 66(2):387-395.

- Grob JJ, Dreno B, de la Salmonière P, Delaunay M, Cupissol D, Guillot B, Souteyrand P, Sassolas B, Cesarini JP, Lionnet S, Lok C, Chastang C, Bonerandi JJ. 1998. Randomised trial of interferon alpha-2a as adjuvant therapy in resected primary melanoma thicker than 1.5 mm without clinically detectable node metastases. French Cooperative Group on Melanoma. *Lancet*, 351(9120):1905–1910.
- Guerriere-Kovach PM, Hunt EL, Patterson JW, Glembocki DJ, English JC 3rd, Wick MR. 2004. Primary melanoma of the skin and cutaneous melanomatous metastases: comparative histologic features and immunophenotypes. *Am J Clin Pathol*, 122(1):70-77.
- Haak-Frendscho M, Darvas Z, Hegyesi H, Kárpáti S, Hoffman RL, László V, Bencsáth M, Szalai C, Fűrész J, Timár J, Bata-Csörgő Z, Szabad G, Pivarsci A, Pállinger E, Kemény L, Horváth A, Dobozy A, Falus A. 2000. Histidine decarboxylase expression in human melanoma. *J Invest Dermatol*, 115(3):345-352.
- Hahm KB, Park IS, Kim HC, Lee KJ, Kim JH, Cho SW, Lee SI. 1996. Comparison of antiproliferative effects of 1-histamine-2 receptor antagonists, cimetidine, ranitidine, and famotidine, in gastric cancer cells. *Int J Immunopharmacol*, 18(6-7):393-399.
- Håkanson R, Owman C. 1967. Concomitant histochemical demonstration of histamine and catecholamines in enterochromaffin-like cells of gastric mucosa. *Life Sci*, 6(7):759-766.
- Hayashi H. 1995. Pyridoxal enzymes: mechanistic diversity and uniformity. *J Biochem*, 118(3):463-473.
- Hegyesi H, Somlai B, Varga VL, Toth G, Kovacs P, Molnar EL, Laszlo V, Karpáti S, Rivera E, Falus A, Darvas Z. 2001. Suppression of melanoma cell proliferation by histidine decarboxylase specific antisense oligonucleotides. *J Invest Dermatol*, 117(1):151-153.
- Hegyesi H, Horváth B, Pállinger E, Pós Z, Molnár V, Falus A. 2005. Histamine elevates the expression of Ets-1, a protooncogen in human melanoma cell lines through H2 receptor. *FEBS Lett*, 579(11):2475–2479.
- Hill SJ. 1990. Distribution, properties, and functional characteristics of three classes of histamine receptor. *Pharmacol Rev*, 42(1):45-83.
- Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H, Schwartz JC, Shankley NP, Young JM, Schunack W, Levi R, Haas HL. 1997. International Union of Pharmacology. XIII. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev*, 49(3):253-278.

- Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbe C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urba WJ. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*, 363(8):711-723.
- Hofstra CL, Desai PJ, Thurmond RL, Fung-Leung WP. 2003. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis and calcium mobilization of mast cells. *J Pharmacol Exp Ther*, 305(3):1212–1221.
- Holly EA, Kelly JW, Shpall SN, Chiu SH. 1987. Number of melanocytic nevi as a major risk factor for malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol*, 17(3):459-468.
- Itoh E, Fujimiya M, Inui A. 1999. Thioperamide, a histamine H₃ receptor antagonist, powerfully suppresses peptide YY-induced food intake in rats. *Biol Psychiatry*, 45(4):475–481.
- Jablonowski JA, Grice CA, Chai W, Dvorak CA, Venable JD, Kwok AK, Ly KS, Wei J, Baker SM, Desai PJ, Jiang W, Wilson SJ, Thurmond RL, Karlsson L, Edwards JP, Lovenberg TW, Carruthers NI. 2003. The first potent and selective non-imidazole human histamine H4 receptor antagonists. *J Med Chem*, 46(19):3957–3960.
- Johnson CL, Weinstein H, Green JP. 1979. Studies on histamine H₂ receptors coupled to cardiac adenylate cyclase. Blockade by H₂ and H₁ receptor antagonists. *Mol Pharmacol*, 16(2):417-428.
- Jones W, Harman R, Ng AK, Shaw JH. 1999. Incidence of malignant melanoma in Auckland, New Zealand: highest rates in the world. *World J Surg*, 23(7):732-735.
- Kaatsch P, Spix C, Katalinic A, Hentschel S. 2012. *Krebs in Deutschland 2007/2008*. Achte Auflage. Berlin: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V.
- Kalivas PW. 1982. Histamine-induced arousal in the conscious and pentobarbital-pretreated rat. *J Pharmacol Exp Ther*, 222(1):37-42.
- Kanba S, Richelson E. 1984. Histamine H₁ receptors in human brain labelled with [³H]doxepin. *Brain Res*, 304(1):1-7.

- Kanda N, Watanabe S. 2002. Histamine inhibits the production of interferon-induced protein of 10 kDa in human squamous cell carcinoma and melanoma. *J Invest Dermatol*, 119(6):1411-1419.
- Kawaguchi-Nagata K, Watanabe T, Maeyama K, Yamatodani A, Okamura H, Tamura T, Shoji K, Kitamura Y. 1988. Increase of histidine decarboxylase activity in murine myelomonocytic leukemia cells (WEHI-3B) in parallel to their differentiation into macrophages. *Biochim Biophys Acta*, 972(3):249-256.
- Kirkwood JM, Strawderman MH, Ernstoff MS, Smith TJ, Borden EC, Blum RH. 1996. Interferon alfa-2b adjuvant therapy of high-risk resected cutaneous melanoma: the Eastern Cooperative Oncology Group Trial EST 1684. *J Clin Oncol*, 14(1):7-17.
- Kirova YM, Chen J, Rabarijaona LI, Piedbois Y, Le-Bourgeois JP. 1999. Radiotherapy as palliative treatment for metastatic melanoma. *Melanoma Res*, 9(6):611-613.
- Klein MC, Gertner SB. 1981. Evidence for a role of endogenous histamine in central cardiovascular regulation: inhibition of histamine-N-methyltransferase by SKF 91488. *J Pharmacol Exp Ther*, 216(2):315-320.
- Kollonitsch J, Perkins LM, Patchett AA, Doldouras GA, Marburg S, Duggan DE, Maycock AL, Aster SD. 1978. Selective inhibitors of biosynthesis of aminergic neurotransmitters. *Nature*, 274(5674):906-908.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259):680-685.
- Laitinen JT, Jokinen M. 1998. Guanosine 5'-(gamma-[³⁵S]thio)triphosphate autoradiography allows selective detection of histamine H₃ receptor-dependent G protein activation in rat brain tissue sections. *J Neurochem*, 71(2):808-816.
- Lasithiotakis KG, Leiter U, Eigentler T, Breuninger H, Metzler G, Meier F, Garbe C. 2007. Improvement of overall survival of patients with cutaneous melanoma in Germany, 1976-2001: which factors contributed? *Cancer*, 109(6): 1174-1182.
- László V, Rothe G, Hegyesi H, Szeberényi JB, Orsó E, Schmitz G, Falus A. 2001. Increased histidine decarboxylase expression during in vitro monocyte maturation; a possible role of endogenously synthesised histamine in monocyte/macrophage differentiation. *Inflamm Res*, 50(8):428-434.

- Lázár-Molnár E, Hegyesi H, Tóth S, Falus A. 2000. Autocrine and paracrine regulation by cytokines and growth factors in melanoma. *Cytokine*, 12(6):547-554.
- Lázár-Molnár E, Hegyesi H, Pállinger E, Kovács P, Tóth S, Fitzsimons C, Cricco G, Martin G, Bergoc R, Darvas Z, Rivera ES, Falus A. 2002. Inhibition of human primary melanoma cell proliferation by histamine is enhanced by interleukin-6. *Eur J Clin Invest*, 32(10):743-749.
- Le Coniat M, Traiffort E, Ruat M, Arrang JM, Berger R. 1994. Chromosomal localization of the human histamine H₁-receptor gene. *Hum Genet*, 94(2):186-188.
- Leinco Technologies, Inc. 2013. St. Louis, Missouri (www.leinco.com/sandwich_elisa).
- Leurs R, Smit MJ, Timmerman H. 1995. Molecular pharmacological aspects of histamine receptors. *Pharmacol Ther*, 66(3):413-463.
- Leurs R, Chazot PL, Shenton FC, Lim HD, de Esch IJ. 2009. Molecular and biochemical pharmacology of the histamine H₄ receptor. *Br J Pharmacol*, 157(1):14-23.
- Lim HD, de Graaf C, Jiang W, Sadek P, McGovern PM, Istyastono EP, Bakker RA, de Esch IJ, Thurmond RL, Leurs R. 2010. Molecular determinants of ligand binding to H₄R species variants. *Mol Pharmacol*, 77(5):734-743.
- Liu C, Ma X, Jiang X, Wilson SJ, Hofstra CL, Blevitt J, Pyati J, Li X, Chai W, Carruthers N, Lovenberg TW. 2001. Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor (H₄) expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol*, 59(3):420-426.
- Lovenberg TW, Roland BL, Wilson SJ, Jiang X, Pyati J, Huvar A, Jackson MR, Erlander MG. 1999. Cloning and functional expression of the human histamine H₃ receptor. *Mol Pharmacol*, 55(6):1101-1107.
- Luan J, Shattuck-Brandt RL, Haghnegahdar H, Owen JD, Strieter R, Burdick M, Nirodi C, Beauchamp D, Johnson KN, Richmond A. 1997. Mechanism and biological significance of constitutive expression of MGSA/GRO chemokines in malignant melanoma tumor progression. *J Leukoc Biol*, 62:588-597.
- Maintz L, Bieber T, Novak N. 2006. Die verschiedenen Gesichter der Histamintoleranz; Konsequenzen für die Praxis. *Dtsch Arztebl*, 103(51–52):A3477–3483.

- Masini E, Di Bello MG, Raspanti S, Ndisang JF, Baronti R, Cappugi P, Mannaioni PF. 1998. The role of histamine in platelet aggregation by physiological and immunological stimuli. *Inflamm Res*, 47(5):211-220.
- Maslinska D, Laure-Kamionowska M, Maslinski KT, Deregowski K, Szewczyk G, Maslinski S. 2006. Histamine H(4) receptors on mammary epithelial cells of the human breast with different types of carcinoma. *Inflamm Res*, 55(1):S77-78.
- Massari NA, Medina VA, Martinel Lamas DJ, Cricco GP, Croci M, Sambuco L, Bergoc RM, Rivera ES. 2011. Role of H4 receptor in histamine-mediated responses in human melanoma. *Melanoma Res*, 21(5):395-404.
- Medina V, Cricco G, Nuñez M, Martín G, Mohamad N, Correa-Fiz F, Sanchez-Jimenez F, Bergoc R, Rivera ES. 2006. Histamine-mediated signaling processes in human malignant mammary cells. *Cancer Biol Ther*, 5(11):1462–1471.
- Medina V, Croci M, Crescenti E, Mohamad N, Sanchez-Jiménez F, Massari N, Nuñez M, Cricco G, Martin G, Bergoc R, Rivera E. 2008. The role of histamine in human mammary carcinogenesis. H3 and H4 receptors as potential therapeutic targets for breast cancer treatment. *Cancer Biol Ther*, 7(1):28-35.
- Monti JM, Jantos H, Boussard M, Altier H, Orellana C, Olivera S. 1991. Effects of selective activation or blockade of the histamine H₃ receptor on sleep and wakefulness. *Eur J Pharmacol*, 205(3):283-287.
- Moon JH, Gailani S, Cooper MR, Hayes DM, Rege VB, Blom J, Falkson G, Maurice P, Brunner K, Glidewell O, Holland JF. 1975. Comparison of the combination of 1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea (BCNU) and vincristine with two dose schedules of 5-(3,3-dimethyl-1-triazino) imidazole 4-carboxamide (DTIC) in the treatment of disseminated malignant melanoma. *Cancer*, 35(2):368-371.
- Morse KL, Behan J, Laz TM, West RE Jr, Greenfeder SA, Anthes JC, Umland S, Wan Y, Hipkin RW, Gonsiorek W, Shin N, Gustafson EL, Qiao X, Wang S, Hedrick JA, Greene J, Bayne M, Monsma FJ Jr. 2001. Cloning and characterization of a novel human histamine receptor. *J Pharmacol Exp Ther*, 296(3):1058–1066.

Nakamura T, Itadani H, Hidaka Y, Ohta M, Tanaka K. 2000. Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R. *Biochem Biophys Res Commun*, 279(2):615–620.

Nguyen T, Shapiro DA, George SR, Setola V, Lee DK, Cheng R, Rauser L, Lee SP, Lynch KR, Roth BL, O'Dowd BF. 2001. Discovery of a novel member of the histamine receptor family. *Mol Pharmacol*, 59(3):427-433.

Nielsen HJ, Christensen IJ, Moesgaard F, Kehlet H. 2002. Ranitidine as adjuvant treatment in colorectal cancer. *Br J Surg*, 89(11):1416-1422.

Nowak JZ, Ferrario E, Lebrecht U. 1979. Dimaprit-induced hypothermia in normal rats: its attenuation by cimetidine and by tricyclic antidepressant drugs. *Neuropharmacology*, 18(10):783-789.

Oda T, Morikawa N, Saito Y, Masuho Y, Matsumoto S. 2000. Molecular cloning and characterization of a novel type of histamine receptor preferentially expressed in leukocytes. *J Biol Chem*, 275(47):36781-36786.

O'Day SJ, Maio M, Chiarion-Sileni V, Gajewski TF, Pehamberger H, Bondarenko IN, Queirolo P, Lundgren L, Mikhailov S, Roman L, Verschraegen C, Humphrey R, Ibrahim R, de Pril V, Hoos A, Wolchok JD. 2010. Efficacy and safety of ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a multicenter single-arm phase II study. *Ann Oncol*, 21(8):1712-1717.

Okayama M, Baraniuk JN, Hausfeld JN, Merida M, Kaliner MA. 1992. Characterization and autoradiographic localization of histamine H₁ receptors in human nasal turbinates. *J Allergy Clin Immunol*, 89(6):1144-1150.

O'Reilly M, Alpert R, Jenkinson S, Gladue RP, Foo S, Trim S, Peter B, Trevethick M, Fidock M. 2002. Identification of a histamine H₄ receptor on human eosinophils – role in eosinophil chemotaxis. *J Recept Signal Transduct Res*, 22(1-4):431-448.

Orfanos CE, Jung EG, Rassner G, Wolff HH, Garbe C. 1994. Position and recommendations of the Malignant Melanoma Committee of the German Society of Dermatology on diagnosis, treatment and after-care of malignant melanoma of the skin. *Status* 1993/1994. *Hautarzt*, 45(5):285-291.

Pehamberger H, Soyer HP, Steiner A, Kofler R, Binder M, Mischer P, Pachinger W, Auböck J, Fritsch P, Kerl H, Wolff K. 1998. Adjuvant interferon-alpha2a treatment in resected primary stage II cutaneous melanoma. Austrian Malignant Melanoma Cooperative Group. *J Clin Oncol*, 16(4):1425–1429.

Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R. 2008. *Duale Reihe Biochemie*. Zweite Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 638.

Reynolds JL, Akhter J, Morris DL. 1996. In vitro effect of histamine and histamine H1 and H2 receptor antagonists on cellular proliferation of human malignant melanoma cell lines. *Melanoma Res*, 6(2):95–99.

Reynolds JL, Akhter J, Adams WJ, Morris DL. 1997. Histamine content in colorectal cancer. Are there sufficient levels of histamine to affect lymphocyte function? *Eur J Surg Oncol*, 23(3):224-227.

Ribas A, Kim KB, Schuchter LM, Gonzalez R, Pavlick AC, Weber JS, McArthur GA, Hutson TE, Flaherty KT, Moschos SJ, Lawrence DP, Hersey P, Kefford RF, Chmielowski B, Puzanov I, Li J, Nolop KB, Lee RJ, Joe AK, Sosma JA. 2011. BRIM-2: an open-label, multicenter phase II study of vemurafenib in previously treated patients with BRAFV600E mutation-positive melanoma [Abstract]. *J Clin Oncol (ASCO Annual Meeting Abstracts)*, 29:8509.

Ribatti D, Ennas M, Vacca A ,et al. 2003. Tumor vascularity and tryptase-positive mast cells correlate with a poor prognosis in melanoma. *Eur J Clin Invest*, 33:420-425.

Ridolfi R, Chiarion-Sileni V, Guida M, Romanini A, Labianca R, Freschi A, Lo Re G, Nortilli R, Brugnara S, Vitali P, Nanni O. 2002. Cisplatin, dacarbazine with or without subcutaneous interleukin-2, and interferon alpha-2b in advanced melanoma outpatients: results from an Italian multicenter phase III randomized clinical trial. *J Clin Oncol*, 20(6):1600-1607.

Rivera ES, Cricco GP, Engel NI, Fitzsimons CP, Martín GA, Bergoc RM. 2000. Histamine as an autocrine growth factor: an unusual role for a widespread mediator. *Semin Cancer Biol*, 10(1):15-23.

Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., Hrsg. 2012. *Krebs in Deutschland 2007/2008*. Achte Auflage. Berlin.

- Rusciani L, Petraglia S, Alotto M, Calvieri S, Vezzoni G. 1997. Postsurgical adjuvant therapy for melanoma. Evaluation of a 3-year randomized trial with recombinant interferon-alpha after 3 and 5 years of follow-up. *Cancer*, 79(12):2354–2360.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230(4732):1350-1354.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839):487-491.
- Satyamoorthy K, Herlyn M. 2002. Cellular and molecular biology of human melanoma. *Cancer Biol*, 9:807-812.
- Schadendorf D, Möller A, Algermissen B, Worm M, Sticherling M, Czarnetzki BM. 1993. IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. *J Immunol*, 151(5):2667-2675.
- Schayer RW, Kennedy J, Smiley RL. 1953. Studies on histamine-metabolizing enzymes in intact animals. II. *J Biol Chem*, 205(2):739-748.
- Schayer RW, Karjala SA. 1956. Ring N methylation; a major route of histamine metabolism. *J Biol Chem*, 221(1):307-313.
- Schayer RW. 1959. Catabolism of physiological quantities of histamine in vivo. *Physiol Rev*, 39(1):116-126.
- Schlicker E, Betz R, Göthert M. 1988. Histamine H₃ receptor-mediated inhibition of serotonin release in the rat brain cortex. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 337(5):588-590.
- Schlicker E, Fink K, Hinterthaler M, Göthert M. 1989. Inhibition of noradrenaline release in the rat brain cortex via presynaptic H₃ receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 340(6):633-638.
- Schwartz JC, Arrang JM, Garbarg M, Pollard H, Ruat M. 1991. Histaminergic transmission in the mammalian brain. *Physiol Rev*, 71(1):1–51.
- Shih IM, Herlyn M. 1993. Role of growth factors and their receptors in the development and progression of melanoma. *J Invest Dermatol*, 100:196-203.

- Sieja K, Stanosz S, von Mach-Szczypiński J, Olewniczak S, Stanosz M. 2005. Concentration of histamine in serum and tissues of the primary ductal breast cancers in women. *Breast*, 14(3):236–241.
- Sinha JN, Gupta ML, Bhargava KP. 1969. Effect of histamine and antihistaminics on central vasomotor loci. *Eur J Pharmacol*, 5(3):235-238.
- Smit MJ, Hoffmann M, Timmerman H, Leurs R. 1999. Molecular properties and signalling pathways of the histamine H₁ receptor. *Clin Exp Allergy*, 29(Suppl 3):19-28.
- Soll AH, Lewin KJ, Beavan MA. 1981. Isolation of histamine-containing cells from rat gastric mucosa: biochemical and morphologic differences from mast cells. *Gastroenterology*, 80(4):717-727.
- Swerdlow AJ, English J, MacKie RM, O'Doherty CJ, Hunter JA, Clark J, Hole DJ. 1986. Benign melanocytic naevi as a risk factor for malignant melanoma. *Br Med J (Clin Res Ed.)*, 292(6535):1555-1559.
- Szeberényi JB, László V, Pállinger E, Orsó E, Rothe G, Schmitz G, Falus A. 2001. Intracellular histamine content increases during in vitro dendritic cell differentiation. *Inflamm Res*, 50(Suppl 2):112-113.
- Szinczák N, Hegyesi H, Hunyadi J, Falus A, Juhász I. 2002. Different h₂ receptor antihistamines dissimilarly retard the growth of xenografted human melanoma cells in immunodeficient mice. *Cell Biol Int*, 26(9):833–836.
- Szinczák N, Hegyesi H, Hunyadi J, Martin G, Lázár-Molnár E, Kovács P, Rivera E, Falus A, Juhász I. 2002. Cimetidine and a tamoxifen derivate reduce tumour formation in SCID mice xenotransplanted with a human melanoma cell line. *Melanoma Res*, 12(3):231–240.
- Takeshita K, Sakai K, Bacon KB, Gantner F. 2003. Critical role of histamine H₄ receptor in leukotriene B₄ production and mast cell-dependent neutrophil recruitment induced by zymosan in vivo. *J Pharmacol Exp Ther*, 370(3):1072-1078.
- Thurmond RL, Desai PJ, Dunford PJ, Fung-Leung WP, Hofstra CL, Jiang W, Nguyen S, Riley JP, Sun S, Williams KN, Edwards JP, Karlsson L. 2004. A potent and selective histamine H₄ receptor antagonist with anti-inflammatory properties. *J Pharmacol Exp Ther*, 309(1):404-413.

- Tilly BC, Tertoolen LG, Remorie R, Ladoux A, Verlaan I, de Laat SW, Moolenaar WH. 1990. Histamine as a growth factor and chemoattractant for human carcinoma and melanoma cells: action through Ca²⁺(+)-mobilizing H1 receptors. *J Cell Biol*, 110(4):1211–1215.
- Toda N. 1987. Mechanism of histamine action in human coronary arteries. *Circ Res*, 61(2):280-286.
- Tønnesen H, Knigge U, Bülow S, Damm P, Fischerman K, Hesselfeldt P, Hjortrup A, Pedersen IK, Pedersen VM, Siemssen OJ. 1988. Effect of cimetidine on survival after gastric cancer. *Lancet*, 2(8618):990-992.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76(9):4350-4354.
- Toyota H, Dugovic C, Koehl M, Laposky AD, Weber C, Ngo K, Wu Y, Lee DH, Yanai K, Sakurai E, Watanabe T, Liu C, Chen J, Barbier AJ, Turek FW, Fung-Leung WP, Lovenberg TW. 2002. Behavioral characterization of mice lacking histamine H₃ receptors. *Mol Pharmacol*, 62(2):389-397.
- Traiffort E, Vizuete ML, Tardivel-Lacombe J, Souil E, Schwartz JC, Ruat M. 1995. The guinea pig histamine H₂ receptor: gene cloning, tissue expression and chromosomal localization of its human counterpart. *Biochem Biophys Res Commun*, 211(2):570-577.
- Tutton PJ, Barkla DH. 1983. Comparison of the tumor inhibiting effects of three histamine H₂-receptor antagonists. *Anticancer Res*, 3(1):7-10.
- Uçar K. 1991. The effects of histamine H₂ receptor antagonists on melanogenesis and cellular proliferation in melanoma cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun*, 177(1):545–550.
- Venable JD, Cai H, Chai W, Dvorak CA, Grice CA, Jablonowski JA, Shah CR, Kwok AK, Ly KS, Pio B, Wei J, Desai PJ, Jiang W, Nguyen S, Ling P, Wilson SJ, Dunford PJ, Thurmond RL, Lovenberg TW, Karlsson L, Carruthers NI, Edwards JP. 2005. Preparation and biological evaluation of indole, benzimidazole, and thienopyrrole piperazine carboxamides: potent human histamine h(4) antagonists. *J Med Chem*, 48(26):8289-8298.
- Villemain FM, Bach JF, Chatenoud LM. 1990. Characterization of histamine H1 binding sites on human T lymphocytes by means of ¹²⁵I-iodobolpyramine. Preferential expression of H1 receptors on CD8 T lymphocytes. *J Immunol*, 144(4):1449-1454.

- Watanabe T, Yamatodani A, Maeyama K, Wada H. 1990. Pharmacology of alpha-fluoromethylhistidine, a specific inhibitor of histidine decarboxylase. *Trends Pharmacol Sci*, 11(9):363-367.
- Watson AS, Wilkinson LJ, Robertson JF, Hardcastle JD. 1993. Effect of histamine on the growth of human gastrointestinal tumours: reversal by cimetidine. *Gut*, 34(8):1091-1096.
- Weber J, Thompson JA, Hamid O, Minor D, Amin A, Ron I, Ridolfi R, Assi H, Maraveyas A, Berman D, Siegel J, O'Day SJ. 2009. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase II study comparing the tolerability and efficacy of ipilimumab administered with or without prophylactic budesonide in patients with unresectable stage III or IV melanoma. *Clin Cancer Res*, 15(17):5591-5598.
- Whitehead RJ, Taylor DJ, Evanson JM, Hart IR, Woolley DE. 1988. Demonstration of histamine H₂ receptors on human melanoma cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 151(1):518-523.
- Willmore-Payne C, Holden JA, Tripp S, Layfield LJ. 2005. Human malignant melanoma: detection of BRAF- and c-kit-activating mutations by high-resolution amplicon melting analysis. *Hum Pathol*, 36(5):486-493.
- Windaus A, Vogt W. 1907. Synthese des Imidazolyl-äthylamins. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 40:3691–3695.
- Wolchok JD, Neyns B, Linette G, Negrier S, Lutzky J, Thomas L, Waterfield W, Schadendorf D, Smylie M, Guthrie T Jr, Grob JJ, Chesney J, Chin K, Chen K, Hoos A, O'Day SJ, Lebbé C. 2010. Ipilimumab monotherapy in patients with pretreated advanced melanoma: a randomized, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet Oncol*, 11(2):155-164.
- Yamashita M, Fukui H, Sugama K, Horio Y, Ito S, Mizuguchi H, Wada H. 1991. Expression cloning of a cDNA encoding the bovine histamine H₁ receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88(24):11515-11519.
- Yamauchi K, Sekizawa K, Suzuki H, Nakazawa H, Ohkawara Y, Katayose D, Ohtsu H, Tamura G, Shibahara S, Takemura M, Maeyama K, Watanabe T, Sasaki H, Shirato K, Takishima T. 1994. Structure and function of human histamine N-methyltransferase: critical enzyme in histamine metabolism in airway. *Am J Physiol*, 267(3 Pt 1):342-349.

Yoshida M, Takahashi Y, Inoue S. 2000. Histamine induces melanogenesis and morphologic changes by protein kinase A activation via H2 receptors in human normal melanocytes. *J Invest Dermatol*, 114(2):334-342.

Zhu Y, Michalovich D, Wu H, Tan KB, Dytko GM, Mannan IJ, Boyce R, Alston J, Tierney LA, Li X, Herrity NC, Vawter L, Sarau HM, Ames RS, Davenport CM, Hieble JP, Wilson S, Bergsma DJ, Fitzgerald LR. 2001. Cloning, expression, and pharmacological characterization of a novel human histamine receptor. *Mol Pharmacol*, 59(3):434–441.

9 Anhang

9.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Stefanie Gerlach
Anschrift: Häßlerstraße 9
99096 Erfurt
Geburtsdatum: 31.07.1988
Geburtsort: Erfurt
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulausbildung

1995 – 1999 Grundschule 25, Erfurt
1999 – 2003 Evangelisches Ratsgymnasium, Erfurt
2003 – 2007 Landesschule Pforta, Schulpforte
07/2007 Abschluss Abitur

Studium

2007 – 2013 Studium der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
11/2013 Abschluss Staatsexamen

Beruflicher Werdegang

seit 02/2014 Ärztin in Weiterbildung an den Ilm-Kreis-Kliniken Arnstadt-Ilmenau
gGmbH, Klinik für Innere Medizin Bereich 1 Arnstadt

9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. med. J. Norgauer, Frau N. Krieg,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Jena, den

Stefanie Gerlach

9.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Johannes Norgauer für die freundliche Vergabe des Dissertationsthemas danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Nadine Krieg, die mich über die gesamte Promotionsphase begleitet und mich stets bei der inhaltlichen und methodischen Durchführung der experimentellen Arbeiten sowie der Schreibphase unterstützt hat. Danke für die Motivation, die Anregungen und die kritischen Kommentare, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Dermatologie III für die freundliche Aufnahme in das Team, die professionelle Unterstützung und die Hilfsbereitschaft während meiner Tätigkeit im Institut.

Meiner Familie und meinen Freunden danke ich dafür, dass sie mich immer unterstützt, mir Mut zugesprochen und mich zu jeder Zeit in meiner Arbeit bestärkt haben.