

**Induktion von Apoptose bei zwei Melanomzellreihen durch das
Indolderivat Malassezin**

meiner Mutter und meinem Bruder

**Induktion von Apoptose bei zwei Melanomzellreihen durch
das Indolderivat Malassezin**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Gwen-Jana Töppler
aus Heidenheim an der Brenz

Gießen 2011

Am Zentrum für Dermatologie und Andrologie
Komm. Leiter: Prof. Dr. med. U. Gieler
Des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH
Standort Gießen

Gutachter: Prof. Dr. med. Peter Mayser

Gutachter: Prof. Dr.med. Norbert Katz

Tag der Disputation: 20.06.2012

Folgender Teil dieser Arbeit wurde bereits veröffentlicht:

Abstract/ Vortrag:

Töppler, G.-J, Krämer, H.-J., Lang, S.-K., Mayser, P.: The indolocarbazol malassezin causes apoptosis in two melanoma cell lines. *Mycoses* 51:393, 2008

1. Einleitung und Fragestellung	9
1.1 Einleitung	9
2. Fragestellung	10
3.1 Das maligne Melanom	11
3.1.1 Entstehung	11
3.1.2 Inzidenz und Ätiologie	11
3.1.3 Prognose und Therapie-Optionen	11
3.2 Apoptose	13
3.2.1 Definition und Allgemeines	13
3.2.3 Molekulare Mechanismen des Apoptose Signalweges	14
3.2.3.1 Caspasen als zentraler Initiator und Ausführer der Apoptose.....	14
3.2.3.2 Extrinsischer Apoptose-Weg/ Typ I.....	15
3.2.3.3 Intrinsischer Apoptose-Weg/ Typ II	15
3.2.3.4 Die Mitochondrien sind zentraler Regulator der intrinsischen Apoptose	16
3.2.3.5 Die Bcl-2 Familie.....	16
3.2.3.6 Regulationsmöglichkeit der Apoptose u.a. durch IAP`s.....	17
4. Material und Methoden	19
4.1 Material	19
4.1.1 Zellen.....	19
4.1.1.1 Besonderheiten der Zellreihen	20
4.1.1.2 MeWo.....	20
4.1.1.3 WM115	21
4.1.2 Kulturverfahren	21
4.1.2.1 Anzucht der Zellkultur	22
4.1.2.3 Passagieren der Zellen.....	22
4.1.2.4 Einfrieren der Zellen	23
4.1.2.5 Auftauen der Zellen.....	23
4.1.3 verwendetes Kulturmedium	23
4.1.3.1 Medienzusätze.....	24
4.1.3.2 Phenolrot zur pH-Wert Erkennung	24

4.1.4	Verwendete Substanzen	24
4.1.4.1	Malassezin.....	24
4.1.4.2	Trypanblau	26
4.1.4.3	Staurosporin	26
4.1.4.4	Alpha-Naphtoflavon.....	26
4.2	Verwendete Methoden	27
4.2.1	Vorbereitung der Zellen für die Versuche	27
4.2.1.1	Zählkammer	27
4.2.2	Aussäen der Zellen in Zellkulturplatten.....	28
4.2.3	Freisetzung der LDH als Maß für Zellnekrosen (Laktat-Dehydrogenase-Assay).....	28
4.2.3.1	Bestimmung der optimalen Zellzahl/ well mittels LDH-Vorversuch....	29
4.2.3.2	Bestimmung der LDH nach Zugabe der zu untersuchenden Substanzen	30
4.2.4	Differenzierung von Apoptose und Nekrose mittels Facs-Analytik.....	31
4.2.4.1	Einstellung des Facs-Gerätes und graph. Darstellung der Ergebnisse-und Darstellung des Facs-Gerätes.....	33
4.2.5	RNA-Isolation.....	34
4.2.5.2	RNA-Isolation aus den beiden Melanomzell-Reihen MeWo und WM115	34
4.2.5.3	Enzymatischer DNA-Abbau direkt auf der Säule.....	35
4.2.5.5	Bestimmung der DNase Konzentration in Lösung	36
4.2.5.5	Messung der optischen Dichte von RNA und cDNA im Spektrophotometer	37
4.2.6	Molekulargenetische Methoden	38
4.2.6.1	Kontrolle auf gDNA.....	38
a) PCR.....		38
4.2.6.2	Reinheitskontrolle der RNA.....	41
4.2.7.1	Hintergrund der RT-PCR.....	42
4.2.7.2	cDNA-Synthese und Bestücken der RT-PCR Platte Version 1	46
4.2.7.3	cDNA-Synthese und Bestücken der RT-PCR Platte Version 3.....	47
4.2.8	RT-PCR.....	48

4.2.8.1 Auswertung nach der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode	49
4.2.8.2 Mathematische Erklärung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode.....	50
5. Ergebnisse	51
5.1. Freisetzung der LDH als Maß für Zellnekrosen	51
5.1.1 Bestimmung der optimalen Zellzahl/ well mittels LDH-Vorversuch.....	51
5.2 LDH bei den untersuchten Substanze	52
5.2.1 LDH bei Inkubation mit Malassezin.....	52
5.2.2 LDH im Vergleich zwischen Malassezin und Staurosporin	54
5.2.3 LDH im Vergleich zwischen Malassezin und α -Naphthoflavin	55
5.3 Differenzierung von Apoptose und Nekrose mittels FacScan-Analyse.....	58
5.3.1 Facs-Analytik: Zytotoxizität von α -Naphthoflavin.....	68
5.3.2 Facs-Analytik: Zytotoxizität von Staurosporin.....	71
5.4 Fotos der Zellkultur.....	73
5.5 Molekulargenetische Methoden	75
5.5.1 Bestimmung der DNase Konzentration in Lösung und Reinheitskontrolle deren RNA	75
5.5.2 Agarose-Gel-Elektrophorese des PCR-Produktes (Kontrolle auf gDNA) 76	
5.5.3 Reinheitskontrolle der RNA.....	77
5.5.4 Ergebnisse der optischen Dichte Messung von RNA und cDNA.....	77
5.6 Resultate der RT-PCR.....	79
5.6.1 RT-PCR-Vorversuche	79
5.6.2 MeWo, 3h Inkubationszeit mit 12,5 μM Malassezin.....	80
5.6.3 MeWo, 9h Inkubationszeit mit 12,5 μM Malassezin.....	82
5.6.4 WM115, 9h Inkubationszeit mit 12,5 μM Malassezin.....	84
5.6.5 WM115, 9h Inkubationszeit mit 25 μM Malassezin.....	85
Bei der Zellreihe WM115 werden im Vergleich ur MeWo Reihe deutlich weniger Gene reguliert. Ebenfalls wird das HRK als proapoptotische Bcl-2-Mitglied. Jedoch zeigt sich keine signifikante Regulation von Todes-Promotoren. Jedoch kommt es zu einer Herunterregulation der IAP`s.	86
5.7 Einfluß des verwendeten Lösungsmittels DMSO auf die Parameter.....	87
5.7.2 Facs, DMSO-Kontrolle	89
6. Diskussion.....	91

7. Zusammenfassung.....	100
8. Summary	102
9. Verzeichnisse	104
9.1 Abbildungen.....	104
9.2 Abkürzungen	106
9.2.1 Abkürzungen allgemein	106
9.2.2 Abkürzungen der Gene	108
9.3 Fotos.....	111
9.4 Tabellen....	112
9.5 Tabellen im Tabellenanhang.....	113
9.6 Literatur.....	116
10. Tabellenanhang	125
11. Danksagung.....	184
12. Ehrenwörtliche Erklärung	185

1. Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

Das maligne Melanom ist eine in seiner Häufigkeit weltweit zunehmende Krebserkrankung. Insbesondere stieg in den letzten Jahren die Inzidenz in hellhäutigen und stark lichtexponierten Bevölkerungsgruppen (17, 21, 81).

Über 90% der malignen Melanome werden vor ihrer Metastasierung erstmals diagnostiziert (24). Im Verhältnis zu seiner Tumormasse hat der sog. schwarze Hautkrebs die Tendenz zur frühen Metastasierung. Sobald Metastasen (regionäre und Fernmetastasen) vorliegen ist fast nur noch ein palliativer Therapieansatz möglich. Mit mehr als 90% besitzt er die höchste Mortalität aller Hautkrebserkrankungen (31). Obwohl es intensive wissenschaftliche Aktivitäten zur Entwicklung neuer Therapien des malignen Melanoms gibt, existieren derzeit keine sicher kurativen Behandlungsmöglichkeiten für diesen aggressiven Tumor im metastasierten Stadium (Stadium IV) (22). Die mittlere Überlebenszeit von Patienten im metastasierten Stadium beträgt ungefähr ein Jahr, die Chancen eines Langzeitüberlebens liegen unterhalb 10% (6). Zahlreiche Chemo- und Immuntherapieprotokolle sind zur Behandlung des malignen Melanoms entwickelt worden. Obwohl einige dieser Protokolle Ansprechraten von bis zu 60% erreichen können, sind Remissionen meist nur von kurzer Dauer. Ferner ist die Toxizität dieser Therapien hoch und bislang ist kein sicherer Effekt auf die Überlebenszeit der behandelten Patienten nachweisbar gewesen (16, 26). Ergänzend zur klassischen Behandlung ist die Immuntherapie (26, 10). Das Konzept der Immuntherapie beruht darauf, über die Zufuhr von Interferonen und Interleukinen die körpereigene Immunabwehr gegen Melanome zu verstärken. Langzeitergebnisse stehen noch aus.

Es wird angenommen, dass ein polygener Erbgang und starke Lichtexposition sowohl im Kindes- als auch Erwachsenenalter eine Rolle in der Tumorentstehung spielen. Trotzdem ist der genaue Pathomechanismus, der für die Mutation und damit für die Auslösung des Tumorwachstums verantwortlich ist, bisher ungeklärt.

Problematisch ist das vermehrte Auftreten Chemotherapie-resistenter Melanomzellreihen in den letzten Jahren (z.B. Sublinien der Zellreihe MeWo sind gegen Cisplatin und Etoposid resistent) (30). Klinisch ist insbesondere die starke Toxizität der eingesetzten Therapeutika ein Grund des Behandlungsabbruches.

2. Fragestellung

2003 wurde von Fr. Dr. med Wiebke Thoma ein Tryptophanmetabolit namens Malassezin aus der Hefe *Malassezia furfur* isoliert (87) und in Zusammenarbeit mit dem Institut für organische Chemie der LMU München analysiert (96). Bereits bei *Malassezia furfur* finden sich im Gegensatz zu anderen Hefen besondere Eigenschaften, wie obligate Lipiddependenz (57), hohe mechanische Stabilität, Osmoresistenz und Enzymaktivitäten (34).

In der Promotionsarbeit von Frau Dr. med Monika Podobinska wurde bereits gezeigt, dass dieses Malassezin in primären humanen Melanozyten Apoptose auslösen kann (44).

Diese Arbeit möchte klären, in wieweit das Indoloderivat Malassezin auch in den beiden humanen Melanomzellreihen MeWo und WM115 Apoptose auslösen kann. Hieraus könnte sich ein neuer Ansatz für die Therapie gerade auch des fortgeschrittenen Melanoms ergeben ähnlich wie Antikörpertherapien, die bereits in gängige Chemotherapieschemata mit integriert wurden.

3.1 Das maligne Melanom

3.1.1 Entstehung

Die Erstbeschreibung des malignen Melanoms als eigene Krankheit geht auf den Franzosen Rene Laennec um 1806 zurück. Er führte den Begriff „melanosis“ (griechisch für schwarz) ein.

Das maligne Melanom ist ein Tumor, der sich zu über 90% der Fälle als ein Primärtumor der Haut, ausgehend von den Melanozyten der basalen Epidermisschichten, entwickelt.

3.1.2 Inzidenz und Ätiologie

In Mitteleuropa beträgt die Inzidenz 10-12 Fälle/ 100.000 Einwohner pro Jahr, in den USA 10-15 Fälle/ 100.000 Einwohner pro Jahr. Die höchste Inzidenz wird mit 50-60 Fällen/ 100.000 Einwohner pro Jahr aus Australien berichtet. In Bevölkerungen mit stärkerer Pigmentierung (Asiaten, Afrikaner) ist das Melanom hingegen selten und nahezu ausschließlich im Schleimhautbereich oder palmoplantar lokalisiert (6, 39).

Zwar gehört das maligne Melanom nicht zu den häufigsten bösartigen Tumorerkrankungen des Menschen, allerdings ist das Melanom der Tumor mit einer rasant ansteigenden Inzidenz (90). Neben konstitutionellen Faktoren nimmt unter den exogenen Einflußgrößen die UV-Belastung eine zentrale Rolle ein (95).

3.1.3 Prognose und Therapie-Optionen

Die Prognose hängt hauptsächlich vom Stadium ab, welches mit Hilfe der TNM-Klassifikation eingeteilt wird. Hierbei kommt insbesondere der Tumordicke, der Mitoserate, sowie dem Vorhandensein von Ulcerationen eine prognostisch wichtige Bedeutung zu (5).

Therapeutisch steht eine radikale chirurgische Exzision im Vordergrund. Sobald ein metastasiertes Stadium vorliegt, sind die therapeutischen Optionen begrenzt. Neben Chemotherapien mit Dacarbazin, Temozolomid und Fotemosid, gibt es die Möglichkeit der begleitenden Immuntherapie mit Inteferon- α und Strahlentherapie (23).

Die Forschung fokussiert sich auf spezifische Target-Therapien. Mittlerweile konnte in der Seronin-Threonin-Kinase BRAF eine Mutation V600E nachgewiesen werden, die bei ca. 50% aller Melanome vorkommt (71). Eine daraufhin durchgeführte Phase III-Studie mit dem Multikinase-Inhibitor Sorafenib mußte vorzeitig abgebrochen werden, da der primäre Endpunkt einer Verbesserung des progressionsfreien Überlebens nicht erreicht werden konnte (2). Ein neuer Therapieansatz befindet sich momentan in einer Phase I-Studie. Ein kleines Molekül, das oral verabreicht werden kann, soll selektiv die mutierte Form des BRAF-Proteins hemmen. Bisherige Ergebnisse zeigen hauptsächlich eine partielle Response, sowie vereinzelt sogar eine komplette Response (19).

3.2 Apoptose

3.2.1 Definition und Allgemeines

Unter Apoptose versteht man den kontrollierten, durch Genexpression gesteuerten, „Selbstmord“ der Zelle. Im Gegensatz zur Nekrose wird kein Zellplasma freigesetzt und keine Entzündungsreaktion ausgelöst.

Der Begriff Apoptose zur Beschreibung eines morphologischen Prozesses, der zu kontrollierter zellulärer Selbstzerstörung führt, wurde erstmals von Kerr 1972 verwendet.

Zellen, deren geschädigte DNA nicht adäquat repariert werden kann, werden z.B. durch Apoptose eliminiert.

Apoptose ist ein aktiver Prozess der Zelle, und somit Teil ihres Stoffwechselweges. Die Besonderheit der Apoptose liegt darin, dass proteolytisch aktive Enzyme, die sog. Caspasen, eine zentrale Rolle in ihrem Ablauf spielen.

Für die Apoptose sind folgende Veränderungen charakteristisch:

- Schrumpfung der Zelle
- Bildung von blasenförmigen Ausbuchtungen an der Zelloberfläche
- Aufhebung des Zell-Zell-Kontaktes zur gesunden Nachbarzelle
- Schrittweise Kondensation und Degradierung der DNA durch Endonukleasen
- Abbau der Mitochondrien mit Freisetzung von Cytochrom C
- Fragmentierung der Zelle in kleine membranumhüllte Teilstücke (Apoptosekörper, beinhalten: Zytosol, kondensiertes Chromatin und Zellorganellen)
- Exposition des Phospholipids Phosphatidylserin an der Zelloberfläche

Phosphatidylserin wird von Rezeptoren der Makrophagen erkannt, welche die Zellfragmente phagozytieren und dabei Zytokine sezernieren.

Im Vergleich dazu schwillt bei der Nekrose die Zelle an, die Plasmamembran wird zerstört. Als Folge kommt es zu lokalen Entzündungen im umgebenden Gewebe, da Cytoplasma und Zellorganellen in den Extrazellularraum freigesetzt werden, welche durch Makrophagen beseitigt werden.

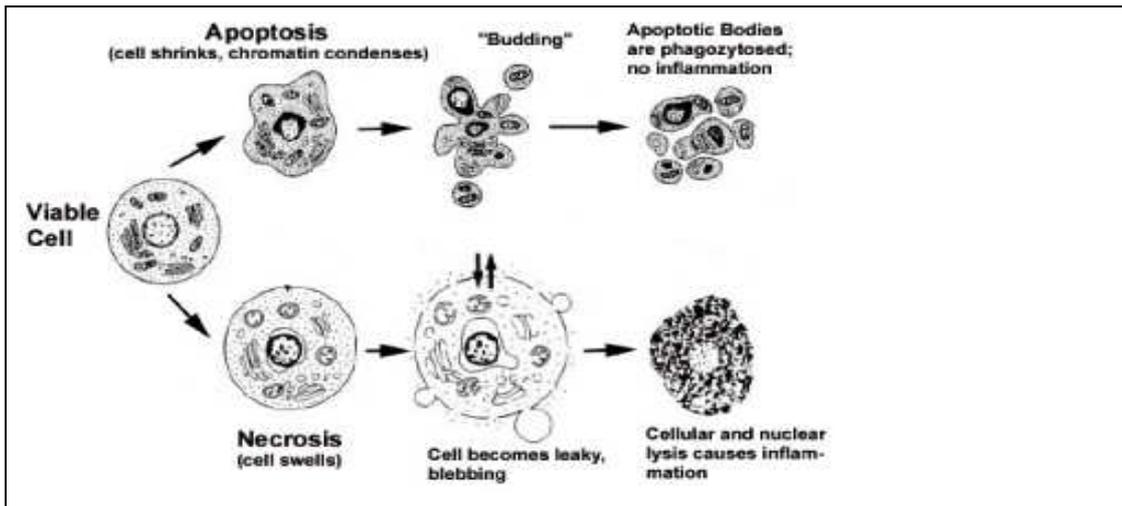


Abbildung 1: Kennzeichen des apoptotischen und nekrotischen Prozesses des Zelltodes (13)

3.2.3 Molekulare Mechanismen des Apoptose Signalweges

Apoptose kann durch verschiedene Stimuli, die außerhalb oder innerhalb der Zelle ablaufen, ausgelöst werden, z.B. durch DNA Schädigung, durch Behandlung mit zytotoxischen Substanzen oder Bestrahlung.

3.2.3.1 Caspasen als zentraler Initiator und Ausführer der Apoptose

Die Caspasen (Cystein-abhängige Asparat-spezifische Protease) sind von zentraler Bedeutung im apoptotischen Signalnetzwerk, die in den meisten Fällen den apoptotischen Zelltod aktivieren (9). Caspasen werden als proapoptische Mediatoren in Form von sog. Zymogen synthetisiert. Diese Procaspasen werden in zwei Gruppen unterteilt.

Die Initiator-Caspasen bestehend aus Procaspasen 2, 8, 9 und 10. Procaspase 8 und 10 besitzen eine lange Prodomain, die eine Death effector domain DED enthält, während Procaspase 2 und 9 Caspase recruitment death domains CARD besitzen. Über ihre Prodomains können die Initiator Caspasen eine Signalkaskade auslösen (1), als Antwort auf die Ligation eines Todesrezeptors an der Zelloberfläche (extrinsischer Weg) oder als Antwort auf ein Signal, das seinen Ursprung im inneren der Zelle hat (intrinsischer Weg).

Die Executioner Caspasen beinhalten Procaspase 3, 6 und 7.

3.2.3.2 Extrinsischer Apoptose-Weg/ Typ I

Der extrinsische Weg wird durch Bindung eines Liganden (FasL, TNF- α , TRAIL) an einen Todesrezeptor aus der TNF-Rezeptor-Familie eingeleitet (79).

Durch Trimerisierung des Rezeptors werden Adaptermoleküle rekrutiert, die an die entsprechende zytoplasmatische Todesdomäne DD binden. Neben der Todesdomäne beinhalten die Adaptermoleküle (FADD, TRADD) noch eine Todeseffektordomäne DED. Die DED bindet an Procaspase 8. Procaspase 8 wird durch autoproteolytische Spaltung aktiviert und Caspase 8 entsteht, die der Aktivator für Caspase 3, 6 und 7 ist. Die Apoptose kann nun ablaufen (16).

Dieser Caspase-abhängige Apoptose-Weg wird auch Typ I genannt.

3.2.3.3 Intrinsischer Apoptose-Weg/ Typ II

In Typ II reicht das Signal, welches vom aktivierten Rezeptor stammt, nicht aus, eine Caspase-Kaskade auszulösen, die stark genug ist den Zelltod einzuleiten. In diesem Fall muß das Signal über einen Mitochondrien-abhängigen Weg amplifiziert werden. Die Verbindung zwischen der Caspase-Signal-Kaskade und dem mitochondrialen Weg wird durch BID (BH 3-interacting domain death agonist), ein Mitglied der Bcl-2 Familie, sichergestellt. BID wird durch Caspase 8 in eine weniger aktive Form gespalten und zu den Mitochondrien transloziert. In Verbindung mit den proapoptotischen Bcl-2 Mitgliedern BAX((Bcl-2 associated X protein) und BAK (Bcl-2 antagonist/killer) führt es dort zur Induktion von Cytochrom c und weiteren mitochondrialen proapoptotischen Faktoren ins Zytosol (51). Ausgelöst durch einen apoptotischen Stimulus wird von den Mitochondrien Cytochrom C freigesetzt. Das Apoptosom entsteht (78). Zur Konformation des Apoptosoms kommt es durch Bindung von Cytochrom C und dATP (Desoxyadenosintriphosphat) an Apaf-1 (apoptotic protease activating factor 1). Das Apoptosom hat eine heptamere, rad-ähnliche Struktur. Procaspase 9 bindet an die innere Region der Apoptosomen. Über Apoptosome wird Caspase 9 aktiviert. Deren Aktivierung führt zu einer Herunterregulation der Effektor Caspasen 3, 6 und 7 und letztendlich zum Zelltod (80).

3.2.3.4 Die Mitochondrien sind zentraler Regulator der intrinsischen Apoptose

Die meisten Apoptose-induzierenden Bedingungen beinhalten die Zerstörung des inneren mitochondrialen Membranpotentials ebenso wie eine plötzlich auftretende erhöhte Stabilität der inneren mitochondrialen Membranpermeabilität. Da die fein abgestimmten mitochondrialen Mechanismen leicht gestört werden können, sind diese ein wichtiger Regulator beim Ablauf einer Apoptose.

3.2.3.5 Die Bcl-2 Familie

Die Bcl-2 Familie hat pro- und antiapoptotische Mitglieder. BAX alleine kann nur eine leichte Apoptose verursachen. BAK alleine zeigt keine Effekte. Der doppelte Knockout von BAX und BAK resultiert in einem dramatischen Anstieg der Apoptose in vielen Geweben.

Zusätzlich sind Zellen, die von BAX/BAK-Mäusen stammen, unempfindlich gegenüber Behandlungen mit Etoposid oder Bestrahlung (50, 92).

BAX ist ein zytosolisches Monomer in lebenden Zellen, das während der Apoptose seine Konformation ändert, sich in die äußere Mitochondrienmembran integriert und oligomerisiert (66).

Hinsichtlich des Mechanismus der BAX/ BAK Oligomere wird kontrovers diskutiert, ob er die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran schwächt oder stabilisiert. Bcl-2 oder Bcl-xL sind starke Inhibitoren der Apoptose, d.h. sie sorgen für das Überleben der Zelle.

Zusammenfassend kann die Regulation der Apoptose durch Mitglieder der Bcl-2 Familie wie folgt beschrieben werden:

Spezifische apoptotische Stress-Signale triggern die Aktivierung einer Subdomäne, die mit antiapoptotischen Mitgliedern an der Außenseite der Mitochondrienmembran interagiert. Dies führt zur Freisetzung „BAX-like“ proapoptotischer Faktoren. Die antiapoptotischen Faktoren werden einer Konformationsänderung unterzogen und fügen sich in die äußere Mitochondrienmembran ein, die zu einer Permeabilitätsveränderung führt. Apoptotische Faktoren werden freigesetzt (8).

3.2.3.6 Regulationsmöglichkeit der Apoptose u.a. durch IAP`s

IAP`s (Inhibitor of apoptosis proteins) sind eine Familie antiapoptotischer Proteine, deren Prototyp ursprünglich in einem Baculovirus beschrieben wurde. Bisher wurden acht menschliche IAP`s identifiziert. Alle IAP`s enthalten baculovirale IAP sich wiederholende Domänen (BIR). Ein Hauptbestandteil aus 80 Aminosäuren ist für die antiapoptotische Beschaffenheit der IAP`s verantwortlich. Es wird angenommen, dass die Interaktion zwischen der BIR Domäne und den Caspasen die antiapoptotische Aktivität der IAP`s überträgt.

Trotz der Schematisierung der Apoptose und ihre Gliederung in zwei Kaskaden wäre die Vorstellung von zwei unabhängig voneinander ablaufenden Reaktionen falsch (s.a. Abbildung 2). So aktiviert beispielsweise die Caspase 8 (Initiator der extrinsischen Apoptosekaskade) das proapoptotische Bcl-2-Protein BID und dieses wiederum aktiviert BAX, welches die Cytochrom c Freisetzung stimuliert (49, 53).

Die gemeinsame Endstrecke beider Apoptosekaskaden stellt die Aktivierung der Effektorcaspasen 3, 6 und 7 dar. Es ist anzunehmen, dass nach Apoptoseinduktion, gleich durch welchen „pathway“, letztendlich alle Caspasen und die meisten proapoptotischen Faktoren in der untergehenden Zelle aktiviert werden.

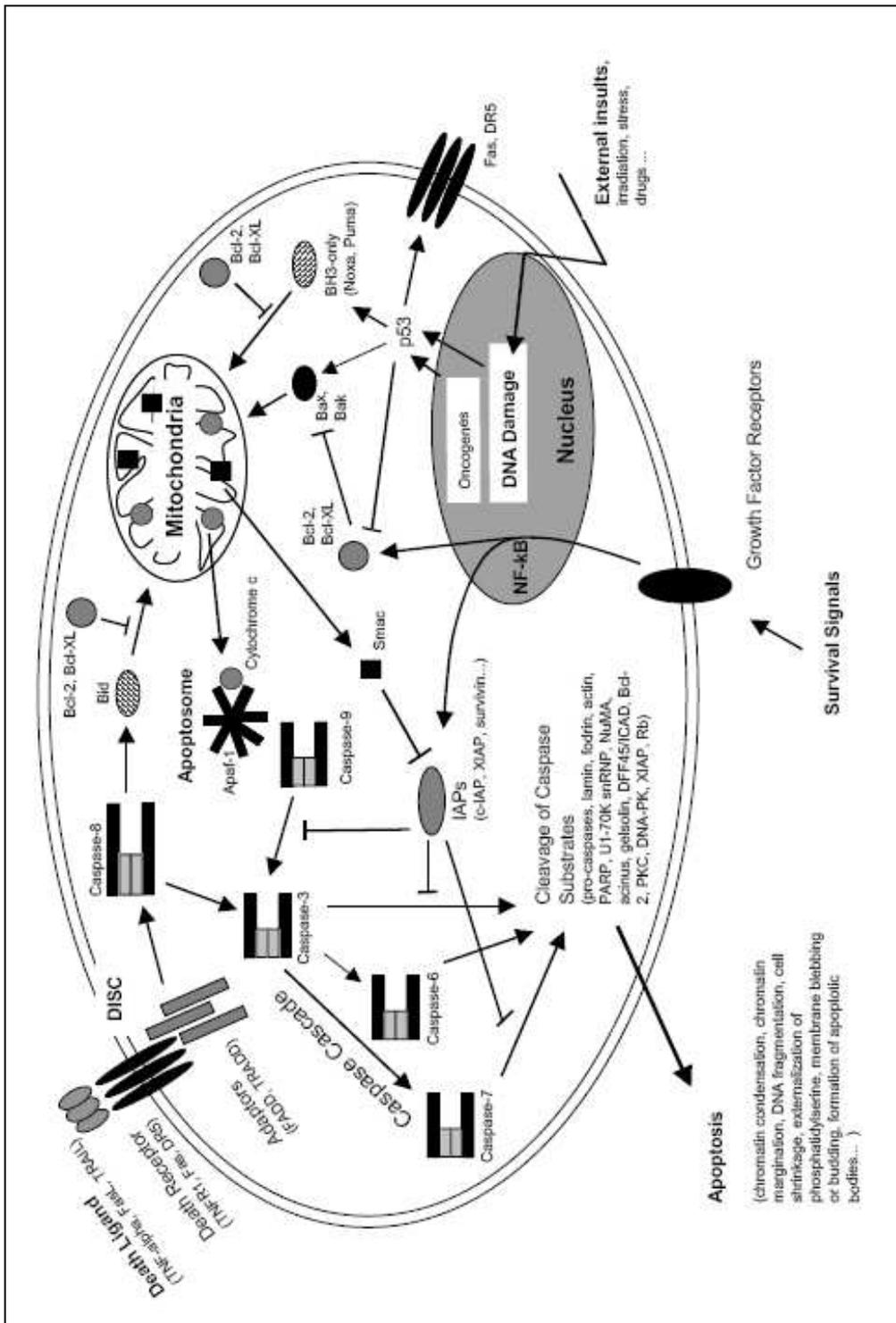


Abbildung 2: Schematische Darstellung einiger wichtiger apoptotischer Signal-Transduktionswege (28)

Ziel der vorgelegten Arbeit ist es Apoptose, ausgelöst durch Malassezin, in den Tumorzelllinien nachzuweisen und genauere Rückschlüsse über den dabei ablaufenden Signaltransduktionsweg zu erhalten.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zellen

Für die Versuche wurden ausschließlich die humanen Melanom-Zellreihen MeWo (European Collection of Cell Culture, ECACC-No. 93082609) und WM115 (European Collection of Cell Culture, ECACC-No. 91061232), die aus Großbritannien bezogen wurden, verwendet.

Bei beiden handelt es sich um humane Melanomzellreihen mit unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften.

Tabelle 1: Charakteristika der Zelllinien MeWo und WM115

Zelllinie	MeWo Humanes malignes Melanom	WM115 Humanes Melanom
Beschreibung	Granuläre Fibroblasten, Zellen unterstützen Wachstum von Viren, insbesondere das von Varizella Zoster	Zellreihe wurde aus einem epithelialen Tumor herauspräpariert. Expressieren Proteoglycan Antigen, das für Melanome charakteristisch ist
Spezies	Mensch	Mensch
Gewebe	Haut	Haut
Morphologie	Fibroblasten	Epithelial
Produkte	Melanin	Proteoglycan Antigen

4.1.1.1 Besonderheiten der Zellreihen

Melanomzellen sind das neoplastische Gegenstück der Melanozyten. Ontogenetisch stammen Melanomzellen aus der embryonalen Neuralleiste.

Diese Melanomzellreihen sind recht widerstandsfähig, vervielfältigen sich rasch und haben eine unbegrenzte Lebensspanne (75). Im Unterschied dazu ist die Vermehrungsfähigkeit natürlich vorkommender menschlicher Zellen (z.B. Darmepithelzellen) nach einer definierten Anzahl an Vermehrungszyklen erschöpft.

4.1.1.2 MeWo

Studien von Grose und Brunell zeigen, dass die pigment-produzierende Zellreihe MeWo anfällig für eine Infektion mit dem Varizella-Zoster Virus ist. Im Gegensatz zu gewöhnlichen Zellsystemen wie z.B. embryonale Lungenfibroblasten ist das Virus vorwiegend Zell-assoziiert. Nur ein geringer Teil des Virus` erscheint im zellfreien Kulturmedium (29). In Versuchen, bei denen menschliche Melanomzellen Mäusen xenotransplantiert wurden, konnte gezeigt werden, dass bei MeWo nur mäßig häufig Lungenmetastasen auftreten. Der Marker L1 (Zell-Adhäsionsmolekül CD171), der in klinischen Studien zur Beurteilung von Metastasen herangezogen wird, wird bei den MeWo`s besonders häufig exprimiert, während die Aktivität von HPA (Helix promatia agglutinin) und CEACAM 1 (Carcino-embryonic antigen-like cell adhesion molecule 1) vernachlässigbar gering ist (86).

Ebenso reagiert die Zelllinie MeWo auf aktive Vitamin-D-Analoga (1,25(OH) 2D3) mit einem antiproliferativen Effekt (74).

Es sind bereits Sublinien der Zellreihe MeWo bekannt, die gegen Etoposid bzw. Cisplatin in unterschiedlicher Ausprägung resistent geworden sind. Der Verlust der Zellen durch Apoptose unterzugehen, führt zur Resistenz gegen diese Chemotherapeutika (41).

4.1.1.3 WM115

Die Melanomzelllinie WM115 besitzt eine Aktivität, die laut Studien von Westermarck, Johnsson et. al die Bindung von ¹²⁵I-markiertem PDGF (platelet-derived-growth-factor) an menschliche Fibroblasten verhindert. Die Aufnahme von ³H-Thymidin in die Fibroblasten wird durch WM115 stimuliert. Durch Zugabe von anti-PDGF-Antikörper kann diese Aktivität gestoppt werden. In den WM115 erfolgt die Transkription sowohl der PDGF-A-als auch der PDGF-B-Kette. Die Produktion von PDGF scheint kein konstanter Faktor in Melanomzellen zu sein, da nicht alle in dieser Studie untersuchten Zellreihen Aktivität von PDGF-ähnlichem Wachstumsfaktor aufweisen. Trotzdem scheint die Produktion dieses Faktors in Zusammenhang zu stehen mit dem Fortschreiten in der Melanomentwicklung (93).

In somatischen Kreuzungszellen zwischen der WM115-Zellreihe und Hamsterfibroblasten konnte gezeigt werden, dass die Expression von PDGF-A-u.-B mRNA deutlich unterdrückt wird. Die Hamsterfibroblasten weisen kein detektierbares Maß an PDGF-B mRNA auf und exprimieren nur eine sehr geringe Menge an PDGF-A mRNA. Die melanomäre PDGF-B mRNA wird durch Cycloheximid in diesen sog. Hybridzellen beeinflusst, während die fibroblastäre PDGF-B mRNA verschont bleibt (48).

Die primäre Läsion des fortgeschrittenen Melanoms der Zellreihe WM115 hat einen bimodalen Chromosomensatz. 10% der Zellen weisen 43 Chromosomen auf. 90% dagegen einen Chromosomensatz von 85. Beide Populationen teilen sich Translokationen zwischen Chromosom 1 und 9, ebenso wie eine Polysomie für Chromosom 7 (4).

4.1.2 Kulturverfahren

Nach der einmaligen Lieferung der Zellen wurden diese in Zellkulturflaschen (Gewebekulturflaschen 250ml, 75cm³, steril mit Filter, Greiner Bio AG) mit RPMI 1640 Medium (PAA), dem 10% fetalem Kälberserum (Foetal Bovine Serum, Gibco) und 1% Penicillin/Streptomycin (Penicillin/Streptomycin Gibco) zugefügt wurde, ausgesät.

Die Zellen wurden solange angezüchtet und passagiert, bis eine entsprechende Zellzahl für die durchzuführenden Versuche vorhanden war. Die Zellen konnten

nach dem Passagieren problemlos portioniert in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert und vor den Versuchen in entsprechend benötigter Menge aufgetaut werden. Nach dem Auftauen wurden die Zellen nochmals passagiert, bevor sie für die Experimente verwendet wurden. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden bei beiden Zelllinien vitale Zellen unterschiedlicher Passagen verwendet.

4.1.2.1 Anzucht der Zellkultur

Die Anzucht der Melanomzellen erfolgte in Zellkulturflaschen in einem Brutschrank (Heraeus Holding, Hanau) bei 37°C und 5% CO_2 Atmosphäre.

Das verbrauchte Medium wurde alle 2 Tage gewechselt und durch frisches ersetzt. Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die Zellen wie folgt passagiert:

4.1.2.3 Passagieren der Zellen

Die MeWo Zellreihe wurde ca. alle 3-4 Tage passagiert, während die WM115 Zellreihe ca. 6-8 Tage brauchte, bis ein passagierfähiger Zellrasen gewachsen war.

Mit der Zellkultur wurde ausschließlich unter einer Sterilbank (Sicherheitswerkbank Klasse 2, Köttermann Labortechnik) gearbeitet. Nach Absaugen des verbrauchten Mediums wurde der Zellrasen in der Kulturflasche mit 10ml PBS Puffer (PBS Dulbecco's, Gibco) gespült und dieses nach einer Kontaktzeit von wenigen Sekunden wieder abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 3ml Trypsin/EDTA Lösung 0,02% (Trypsin/EDTA Solution 0,02%, Biochrom AG) gespült, um den Zellrasen von der Kulturflasche zu lösen. Um diesen Prozess leicht zu intensivieren, wurden die Kulturflaschen, in denen nur noch die Zellen ohne jegliche Flüssigkeit waren, für 5min in den Brutschrank gelegt.

Nach dem Inkubieren wurden die Zellen durch mehrmaliges Spülen in 10ml PBS Puffer aufgenommen. Es ergab sich eine weißlich-trübe Zellsuspension. Von dieser Suspension wurden jeweils 2,5ml auf 4 neue mit 22,5ml RPMI Medium versetzt mit 10% FKS (fetales Kälberserum) und 1% Penicillin/ Streptomycin gefüllte Kulturflaschen aufgeteilt.

Das Wachstum der Zellkultur wurde stets durch Beobachten unter einem Invers-Mikroskop (Axiovert 35, Zeiss) verfolgt.

4.1.2.4 Einfrieren der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden diese in üblicher Weise passagiert (siehe auch 3.1.3 Passagieren der Zellen). Am Ende wurden die Zellen aber in nur 7ml 10% Medium aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in einem konischen Röhrchen (15ml Blue Max, Falcon) 5min bei 125g zentrifugiert (Sepatech Megafuge, Heraeus). Der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde mit 1,5ml Einfriermedium bestehend aus 10% FKS haltigem RPMI 1640 Medium + 5% DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in Kryotubes (Kryotubes 1,8ml, Roth) überführt und 30min auf Eis bei 5°C im Kühlschrank gelagert. Anschließend wurden die Kryotubes in eine Styropor-Box (die Styropor-Box war bereits 30min offen bei -80°C gelagert worden), überführt, deren Ränder mit Klebeband verschlossen wurde. Die Box wurde 24h bei -80°C gelagert, bevor die Kryotubes problemlos in flüssigem Stickstoff bei -196°C längere Zeit gelagert werden konnten. Um den Erfolg der Prozedur zu kontrollieren, erfolgte nach 2-3 Wochen eine Auftauprobe.

4.1.2.5 Auftauen der Zellen

Nach Entnahme der Kryotubes aus dem Stickstoff-Behälter wurden die Zellen in einem Wärmebad (Wärme-Wasserbad, Köttermann) bei 37°C aufgetaut, bis nur noch wenig Eis-Flöckchen sichtbar waren. Die 1,5ml aufgetaute Zellsuspension wurde in 10ml 10% Medium (15ml Falcon-Röhrchen) resuspendiert und bei 62,5g 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 2ml 10% Medium resuspendiert und in eine mit 23ml 10% Medium gefüllte Kulturflasche gegeben. Diese wurde in den Brutschrank gelegt.

4.1.3 verwendetes Kulturmedium

Als Nährmedium wurde, in Anlehnung an die Empfehlung der European Collection of Cell Culture, das gebrauchsfertige RPMI 1640 Medium mit entsprechender Zusammensetzung (RPMI 1640 mit L-Glutamin, PAA) verwendet.

4.1.3.1 Medienzusätze

Dem Medium sind bestimmte Zusätze wie Aminosäuren, Vitamine und Kohlenhydrate in einer vom Hersteller vorgegebenen Zusammensetzung zugefügt worden (63).

4.1.3.2 Phenolrot zur pH-Wert Erkennung

Das Medium enthält Phenolrot, ein pH-abhängiger Farbindikator. Der ideale Wert des Mediums liegt vor, wenn es eine schwach rote Farbe aufweist. Fällt der pH-Wert in den sauren Bereich, kommt es zu einem Farbumschlag nach bräunlich bis gelb. Farbumschläge in den alkalischen Bereich werden durch eine violette bis pinke Farbe sichtbar.

Dem Medium für die Anzucht der Zellen wurde noch 10% FKS zur Wachstumsanregung beigemischt. 1% Penicillin/Streptomycin wurde zur Vermeidung bakterieller Kontamination zugefügt. Dieses Gemisch wurde steril filtriert (Sterilfiltrationssystem Nyl 0,2µm, 75mm Filter-Einheit, Nalgene) und bis zur Verwendung im Kühlschrank bei + 4°C gelagert.

4.1.4 Verwendete Substanzen

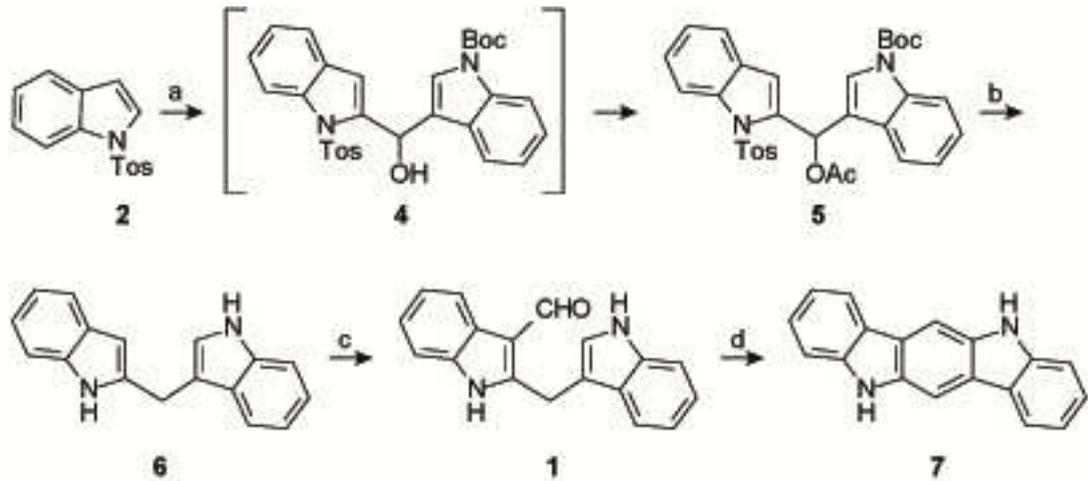
4.1.4.1 Malassezin

Malassezin wurde von Wiebke Thoma als erster Metabolit aus dem Hefepilz *Malassezia furfur* isoliert (87). Seine Strukturaufklärung erfolgte am Institut für organische Chemie der LMU München durch Gregor Wille (96).

Malassezin ist systematisch ein 2,3`-Methylenbisindolyl-3-carbaldehyd mit einem Molekulargewicht von 271,1113. Die Summenformel lautet: $C_{18}H_{14}N_2O$.

Nach der Strukturaufklärung gelang die synthetische Herstellung des Stoffes ebenfalls durch G. Wille. Ausgangsstoffe für die synthetische Herstellung ist Indol und Indol-3-carbaldehyd.

Die chemische Synthese des Malassezin erfolgt in fünf Schritten:



1) Malassezin; 2) Indol (mit Schutzgruppe); 4) Kopplungsprodukt mit Boc-(= tert-Butyloxycarbonyl)-geschütztem Indol-3-carbaldehyd, 5) acetyliertes Kopplungsprodukt 6) 2,3-Bisindolylmethan nach Reduktion und Entfernung der Schutzgruppen; 7) Indololo[3,2-*b*carbazol]

Abbildung 3: Synthese des Malassezins in fünf Schritten

Malassezin hat eine hohe Tendenz zu kristallisieren. Das synthetisch gewonnene Malassezin stimmt in allen spektroskopischen Daten mit dem Naturstoff überein (96). Mit der Strukturaufklärung war es möglich, diesen Stoff in größeren Mengen herzustellen - ein wichtiger Schritt zum weiteren Arbeiten, da der Naturstoff nach Aufreinigung eine Produktausbeute von lediglich 12% bot.

Die Synthese des hier verwendeten Malassezins erfolgte durch Dr. med. Dipl. Chem. Hans-Joachim Krämer, Giessen. Das hergestellte Malassezin wurde ebenfalls mittels Dünnschichtchromatographie und präparativer HPLC (High Performance Liquid Chromatography) und HRMS (hochauflösende Massenspektroskopie, in München) auf Übereinstimmung mit dem Naturstoff überprüft.

Malassezin ist eine farblose Substanz, die Merkmale eines Arylkohlenwasserstoff-Rezeptor (AHR) Agonisten aufweist ($EC_{50_{Erod}} 1.6 \times 10^{-6}$). In Hepatozyten von Ratten konnte gezeigt werden, dass das Cytochrom P450 System induziert wird. Malassezin scheint ein Agonist am AH-Rezeptor zu sein, obwohl bisher planare Moleküle als ideale Agonisten angenommen wurden (58). Offenbar besitzt die Carbonylgruppe einen starken wirkungssteigernden Effekt (96).

4.1.4.2 Trypanblau

Um die Zellen mit der Neubauer Zählkammer zählen zu können, wurden diese mit Trypanblau (Merck Chemicals) angefärbt. Benzamin-Blau ($C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$) ist ein anionischer Azofarbstoff, der an Zellproteine bindet. Er färbt als nicht membrangängiger Farbstoff nur avitale Zellen an, vitale Zellen bleiben farblos. Somit ist er zur Vitalfärbung geeignet. Die Lösung bestand aus Trypanblau, das auf eine Arbeitskonzentration von 0,1% in PBS gelöst, verdünnt wurde. Nach Herstellung der Lösung wurde diese steril filtriert.

Die Trypanblau-Färbung ist ein einfacher und schnell durchführbarer Test.

4.1.4.3 Staurosporin

Das Indolocarbazol Staurosporin mit einem Molekulargewicht von 311,34 ist ein potenter Inhibitor verschiedener Proteinkinasen. Sein Hauptgerüst besteht aus zwei Tryptophan-, einem Glucose-Molekül und zwei Methyl-Gruppen, die vom Methionin stammen, das während der Biosynthese benötigt wird (77). Staurosporin wurde lange Zeit *in vitro* als Apoptose-Initiator in vielen verschiedenen Zelltypen benutzt, obwohl der zugrunde liegende Mechanismus nicht eindeutig belegt war. BAX wird durch Staurosporin aktiviert und der mitochondriale Caspasen-unabhängige Apoptose-Weg wird eingeschlagen (98). Da es sich bei Staurosporin um ein verwandtes Molekül zu Malassezin handelt, wurde mittels LDH und FacScan überprüft, ob ein ähnlicher Einfluß auf die Melanomzellkultur besteht, wie er bei Malassezin zu beobachten ist.

4.1.4.4 Alpha-Naphtoflavon

Benzo-[a]pyrene (BP), wie auch das α -Naphtoflavon (ANF) gehören zu der Gruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe. Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe sind dafür bekannt, die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie Interleukin-1 β und Tumornekrosefaktor- α zu regulieren (65).

Alpha-Naphtoflavon ist ein AHR-Partial-Antagonist und Cytochrom P450 1A Inhibitor. Da Malassezin ein schwacher AHR-Agonist ist, wurde getestet, ob bei

gleichzeitiger Behandlung der Zellkultur sowohl mit α -Naphthoflavon als auch mit Malassezin eine Aufhebung des Malassezin-Effektes zu verzeichnen ist.

4.2 Verwendete Methoden

4.2.1 Vorbereitung der Zellen für die Versuche

Die Zellen wurden wie üblich passagiert, am Ende aber nicht in Puffer aufgenommen, sondern in 1% FKS haltigem Medium. 1% FKS ist nötig, um das restliche Trypsin, das an den Zellen haftet, zu inaktivieren. Um das natürliche Wachstum der Melanom-Zellen zu untersuchen, wurden für die Versuche stets nur 1%iges Medium verwendet.

4.2.1.1 Zählkammer

Von der Zellsuspension wurde ein Aliquot von 10 μ l mit 10 μ l Trypanblau vermischt. Dieses Gemisch wurde vorsichtig unter das Deckglas der Neubauer-Zählkammer (Neubauer-Zählkammer, Tiefe 0,1mm, 0,0025mm²) gegeben.

Es wurde jeweils ein Feld eines Quadranten ausgezählt. Die Auszählung erfolgte unter dem Lichtmikroskop (Zeiss, Primo Star) mit 20x Vergrößerung.

4.2.1.2 Bestimmung der Zellzahl

Unter Berücksichtigung der Verdünnung im Verhältnis 1:1 und dem Kammerfaktor von 10 000 ergab sich folgende Berechnung: Mittelwert x 2 x 10 000 = Zellzahl/ml

So konnte eine Zellsuspension mit entsprechend benötigter Zellzahl hergestellt werden.

4.2.2 Aussäen der Zellen in Zellkulturplatten

Es zeigte sich, dass die Zellen in 96well Platten, egal mit welcher Zellzahl sie ausgesät wurden, keine geeigneten Bedingungen vorfanden. Die Messwerte schwankten, ohne eine Tendenz erkennen zu lassen. Daher wurden für alle Versuche 6well Platten (beschichtete 6well Flachboden-Platten mit Deckel für geringe Verdunstung, Primaria, Falcon) verwendet. Ausgesät wurden zwischen 6000-10000 Zellen/well.

4.2.3 Freisetzung der LDH als Maß für Zellnekrosen

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, die Toxizität eines Stoffes nachzuweisen. Durch Anfärben der Zellen mittels Vitalfarbstoffen wie Trypanblau, EosinY, Nigrosin, Propidiumjodid oder Ethidiumbromid können geschädigte von vitalen Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop unterschieden und gezählt werden (11, 37, 69, 97).

Eine zweite Möglichkeit besteht darin, die Zellen mit radioaktiven Isotopen wie ^3H -Thymidin zu markieren (14, 42, 47, 68).

Die dritte Möglichkeit ist die Aktivität des zytoplasmatischen Enzyms Laktatdehydrogenase zu messen, welches von den zerstörten Zellen freigesetzt wird. Die Enzymaktivität, die im Überstand gemessen wird, korreliert proportional mit der Anzahl der lysierten Zellen (15, 54, 56, 84).

Im Gegensatz zu vielen anderen Enzymen, wie alkalischer und saurer Phosphatase, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase und Glutamat-Pyruvat-Transaminase ist die Laktatdehydrogenase ein recht stabiles Enzym, welches in allen Zellen vorkommt. Nach Zerstörung der Plasma-Membran wird es relativ rasch im Überstand messbar. Das Test-Prinzip beruht auf der Messung der LDH-Aktivität nach 30min Inkubation mit den Reaktionssubstanzen.

Im ersten Reaktions-Schritt reduziert freigesetztes LDH NAD^+ zu NADH/H^+ durch die Oxidation von Laktat zu Pyruvat.

Im zweiten Schritt wird durch einen Katalysator (Diaphorase) 2H des NADH/H⁺ dem schwach gelben Tetrazolium Salz INT übertragen, das dadurch zum wasserlöslichem rötlich-ausgehendem Formazan reduziert wird (s.a. Abbildung 4: Schema der 2 enzymatischen Schritte im LDH-Assay). Das Formazan kann bei 500nm photometrisch bestimmt werden. Überschüssiges Tetrazolium-Salz zeigt bei dieser Wellenlänge keine Absorption. Zur Messung wurde der „Cytotoxicity Detection Kit von Roche, Mannheim“ verwendet.

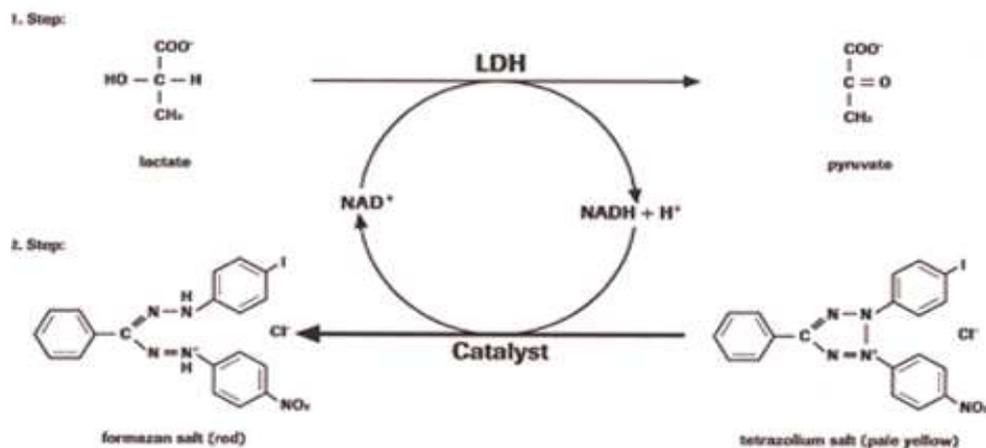


Abbildung 4: Schema der 2 enzymatischen Schritte im LDH- Assay (76)

4.2.3.1 Bestimmung der optimalen Zellzahl/ well mittels LDH-Vorversuch

Die optimale Zellzahl für den LDH-Test wurde durch einen Vorversuch bestimmt. In diesem wurden die 6well Mikrotiterplatten mit den Zellen in 7 unterschiedlichen Konzentrationen (9000-3000 in Tausender-Schritten abnehmend) befüllt. Nachdem die Zellen 24h adhären konnten, erfolgte ein Mediumwechsel mit 1% Medium. Daraufhin wurden die „spontane“ LDH-Aktivität der Zellen nach 24, 48, 72, 96, 120, 144 Stunden bestimmt, n=6 (bei MeWo 120h n=5, bei WM115 120 Std. n=5, 144Std. n=4). Die low control („spontane“ LDH-Freisetzung der Zellen ohne Zusatz von Substanzen) wurde jedes Mal 4fach und die high control (maximale LDH-Freisetzung durch vollständige Lyse der Zellen mit 2% Triton-X-100 Lösung) 2fach bestimmt.

Die optimale Zellzahl für die Bestimmung der LDH-Aktivität wurde bei der Zellreihe MeWo auf 6000 Zellen/ well/3ml und bei WM115 auf 10 000 Zellen/ well/ 3ml festgelegt (das Erhöhen der Zellzahl auf 10 000 Zellen war nötig aufgrund der langsameren Wachstumsgeschwindigkeit, da das FacScan eine minimale Stichprobe von 10 000 Zellen zum Detektieren benötigt).

4.2.3.2 Bestimmung der LDH nach Zugabe der zu untersuchenden Substanzen

Die Zellen wurden in den entsprechenden Konzentrationen in 6well Platten in 10% Medium für 24h bei 37°C und 5% CO₂-Atmosphäre ausgesät. Nach 24h erfolgte der Medium-Wechsel mit 1% Medium inklusive Zugabe der im Kulturmedium zu untersuchenden Substanzen (Malassezin, Staurosporin, α -Naphthoflavon). Malassezin wurde in absteigenden Konzentrationen von 50 μ M-3,125 μ M zugegeben. Die LDH wurde nach 4, 6, 8, und 12 Stunden bestimmt n= 4.

Gleichzeitig wurde eine „Background“-Kontrolle (3ml 1% Medium ohne Zellen), eine „Low“-Kontrolle („spontane“ LDH-Freisetzung) und eine „High“-Kontrolle (maximale LDH-Freisetzung) durchgeführt. Nach den jeweiligen Inkubationszeiten von 4, 6, 8, 12 Stunden wurde 200 μ l vom Überstand abgenommen, in Mikrotubes überführt und 10min bei 250g zentrifugiert (Zentrifuge Mikro 20, Hettich). Aus diesem Mikrotube wurde wiederum ein Aliquot von 100 μ l abgenommen, (um sicher zu gehen, dass wirklich nur zellfreier Überstand für die LDH-Aktivitäts-Messung verwendet wird) und in eine 96well Mikrotiterplatte überführt (optisch klare 96well ps-Mikrotiterplatte, nicht-steril, Greiner bio-one). Jedes well wurde nun zusätzlich mit 100 μ l Reaktionslösung bestückt und 30min bei Zimmer-Temperatur im Dunkeln inkubiert. Die Reaktionslösung besteht aus einem Katalysator (Diaphorase/NAD⁺ Gemisch) und einer Färbelösung (Iodtetrazoliumchlorid und Natrium Laktat). In dieser Zeit verfärbten sich die wells je nach LDH- Intensität von schwach rosa („Low“-Kontrolle) bis tief rot („High“-Kontrolle). Nach Ablauf der Inkubations-Zeit wurde die LDH-Aktivität bei 492nm im Elisa Reader (Tecan Sunrise) gemessen (Referenzwellenlänge >600nm).

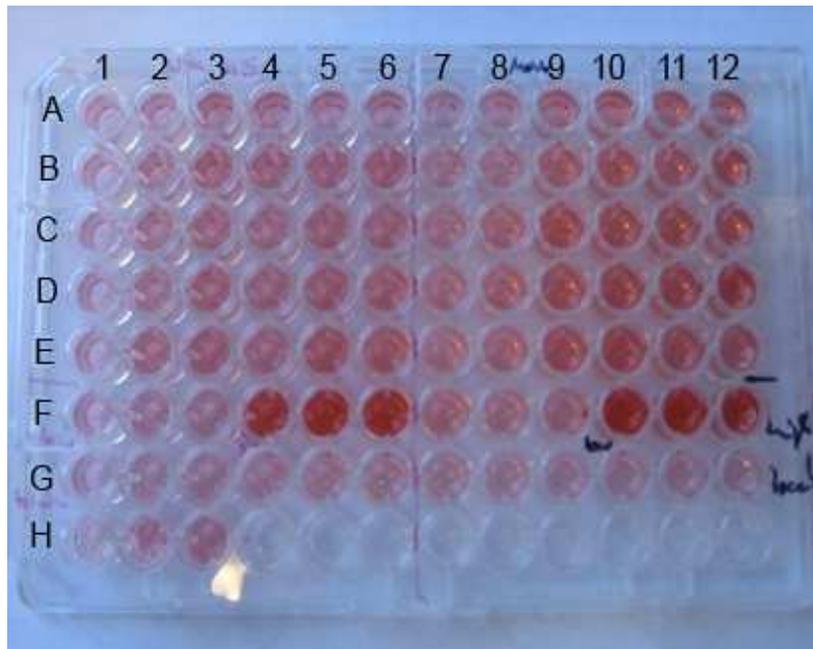


Foto 1: Mikrotiterplatte nach 30min Inkubation mit der LDH-Reaktionslösung
Verfärbungen je nach Intensität der LDH-Aktivität.

F1-3, F7-9 hellrosa = „low“-control, minimalste Veränderungen

F4- 6, F10-12 dunkelrot = „high“-control, maximale Lyse u. damit höchste LDH-Aktivität

4.2.3.3 Berechnung der Zytotoxizität

Die Höhe der LDH-Aktivität im Zellüberstand ist proportional der Anzahl an avitalen Zellen, deren Membran beschädigt ist, so dass das Enzym aus dem Zytoplasma austreten kann. Die Zytotoxizität der zu untersuchenden Substanzen wird wie folgt berechnet:

$$\text{Zytotoxizität in \%} = \frac{\text{experimentelle Probe} - \text{„Low“-Kontrolle}}{\text{„High“-Kontrolle} - \text{„Low“-Kontrolle}} \times 100$$

4.2.4 Differenzierung von Apoptose und Nekrose mittels Facs-Analytik

Apoptose als Form des programmierten Zelltodes kann durch verschiedene morphologische Veränderungen wie z.B. Veränderungen an der Plasmamembran, Zellschrumpfung, Chromatin-Kondensation und chromosomale DNA-Fragmentierung charakterisiert werden. Veränderungen der Symmetrie der Plasmamembran sind eines der frühesten Merkmale von Zellen, die durch Apoptose

untergehen. In apoptotischen Zellen kommt es zu einer Translokation des Membran-Phospholipid Phosphatidylserin (PS) von der inneren auf die äußere Seite der Zelloberfläche.

Annexin V ist ein 35kDa schweres Ca^{2+} abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität zu PS (73). Annexin V bindet an Zellen, deren Oberfläche PS enthält. Annexin V ist ein sensitiver Marker, um Zellen, die durch Apoptose untergehen, zu identifizieren, da PS früh im apoptotischen Prozess freigesetzt wird. Typischerweise wird Annexin V mit Fluochromen, wie z.B. Fluorescein Isothiocyanate (FITC) oder Phycoerythrin (PE) konjugiert, damit die apoptotischen Zellen einfach im Durchfluß-Zytometer erkannt werden können. Zusätzlich wird Annexin V FITC mit einem Vitalfarbstoff wie z.B. Propidium Jodid (PI) oder 7-Amino-actinomycin D (7-AAD) konjugiert, um zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen unterscheiden zu können (32, 43, 55, 89). Dabei erscheinen apoptotische Zellen nur Annexin V FITC positiv, während nekrotische Zellen sowohl Annexin V FITC als auch 7-AAD positiv erscheinen.

Hier wurde Annexin V FITC und 7-AAD zur Markierung der Zellen verwendet.

Ob abgestorbene Zellen durch Apoptose oder Nekrose untergegangen sind, ist mit diesem Verfahren nicht zu unterscheiden.

Die Zellen wurden wie üblich in die 6well Platten ausgesät. Bei der MeWo-Zellreihe betrug die Zellzahl wie beim LDH-Test 6000 Zellen/well/ 3ml, während die WM115-Zellreihe aufgrund langsamerer Wachstumsgeschwindigkeit auf 10 000 Zellen/well/3ml festgelegt wurde. 24h nach dem Aussäen erfolgte der Mediumwechsel. Die Zellen wurden 4, 6, 8 und 12 Stunden mit den zu untersuchenden Substanzen in absteigenden Konzentrationen (50 μM -3,125 μM Malassezin) inkubiert (nach der Inkubationszeit wurde 200 μl vom Überstand zur LDH-Messung abgenommen). Das Medium wurde „abgesaugt“ und in ein auf Eis stehendes 15ml Falcon-Röhrchen gesammelt. Ebenso wurden alle weiteren Substanzen, die zum Passagieren benötigt wurden, in das Sammel-Röhrchen gegeben. Nach Spülen des Zellrasens mit 1ml PBS Puffer erfolgte die Gabe von 0,5ml 0,02% Trypsin/ EDTA-Lösung, die wiederum abgesaugt wurde. Die Zellen wurden 5min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen

im well 2 Mal mit je 1ml PBS Puffer vom Boden gelöst, und ebenso ins Sammelröhrchen gegeben. Das Röhrchen wurde 5min bei 235g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt. Die Zellen vorsichtig resuspendiert, so dass die Zellen nicht zerstört wurden. Das Röhrchen wurde mit 10ml calcium-freiem Puffer (Dulbecco`s Puffer ohne Ca/Mg, PAA) aufgefüllt, abermals 5min bei 235g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgeschüttet, so dass die Zellen im Röhrchen verblieben sind. Nun wurde den verbliebenen Zellen je 100µl Bindungspuffer zugegeben, und ca. 250µl (Zellen + Bindungspuffer) in Facs-Gerätgeeignete Röhrchen umpipetiert. Die Zellen wurden mit 10µl 7-AAD und 5µl Annexin V als Nekrose- u. Apoptose-Farbstoffe markiert. Nach 15min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde nochmals 400µl Bindungspuffer zugegeben, um die Markierungsreaktion der Farbstoffe zu stoppen. Jede Probe wurde kurz gevortext und sofort im Durchfluß-Zytometer gemessen. Die Analyse der Zellen wurde im FACScan (Calibur, Beckton Dickinson USA, Cellquest Software) durchgeführt.

4.2.4.1 Einstellung des Facs-Gerätes und graph. Darstellung der Ergebnisse- und Darstellung des Facs-Gerätes

Das FacScan Gerät wurde auf eine Stichprobe von 10 000 Zellen eingestellt. Die erhaltenen Daten wurden durch die Gerätesoftware (CellQuest) in Form von Punkt-Wolken-Histogrammen, sog. Dot Plots dargestellt. Die Achsen der Histogramme zeigen jeweils die Intensität der jeweiligen Farbstoff-spezifischen Fluoreszenz an. Damit lässt sich jede Zelle nach ihrer Fluoreszenz einem Punkt des Histogramms zuordnen.

Jedes Histogramm lässt sich in 4 Quadranten einteilen, in denen sich je nach Anfärbung der jeweiligen Zellpopulation Häufungen zeigen. Im linken oberen Quadranten befinden sich diejenigen Zellen, die hauptsächlich mit 7-AAD angefärbt sind. Im rechten oberen Quadranten zeigt sich eine Zellhäufung bevorzugt durch Anfärbung mit beiden Farbstoffen. Somit ergibt sich, dass die in den beiden oberen Quadranten befindlichen Zellpopulationen Ausdruck einer Nekrose sind. Diese hat entweder direkt (linker oberer Quadrant) oder indirekt über den Apoptose-Weg stattgefunden. Apoptotische Zellen finden sich durch die Färbung mit

Annexin V im rechten unteren Quadranten. Eine geringe Anfärbung mit beiden Farbstoffen findet sich im linken unteren Quadranten als Ausdruck unveränderter Zellen.

Verwendet wurde der Annexin V FITC Apoptosis Detection Kit, BD Pharmingen. Propidium Iodid wurde durch 7-AAD, ebenfalls von BD Pharmingen ersetzt.

Die Auswertung der erhaltenen Histogramme, sowie Festlegung der Quadranten usw. erfolgte mit der Software WinMDI 2.8.

4.2.5 RNA-Isolation

Es gibt unterschiedliche Methoden, RNA zu isolieren. Häufig verbunden mit zeitintensiven Schritten wie Ultrazentrifugation, Alkohol-Präparation oder unter Verwendung von toxischen Stoffen wie Phenol oder Chloroform. Mit dem RNeasy Mini Kit von Qiagen wurde ein gleichwertiges zeitsparendes Produkt zur RNA-Isolation verwendet.

4.2.5.1 Prinzip der RNA-Isolation mittels RNeasy Mini Kit

Diese Form der RNA-Isolation kombiniert die selektiv-bindende Eigenschaft einer auf Silikagel-basierenden Membran mit der Geschwindigkeit der Mikrosäulen Technologie. Ein spezielles Puffersystem erlaubt es bis zu 100µg RNA mit mehr als 200 Basen an die Membran zu binden. Zuerst wird das Material in Anwesenheit von Guanidin-Isothiocyanat Puffer lysiert und homogenisiert, der die RNase unmittelbar inaktiviert. Dadurch wird sichergestellt, dass intakte RNA isoliert wird. Ethanol wird zum Zwecke richtiger Bindungsverhältnisse zugegeben. Das Material wird nun auf die Säule gegeben. Maximal mögliche Zellzahl ist 10^7 . Die RNA bindet an die Membran, während evtl. Kontaminationen durch mehrere Waschschrte entfernt werden. Eine qualitativ-hochwertige RNA, die in ca.30µl Wasser oder Tris-Puffer, pH 8 aufgenommen wird, wird isoliert.

4.2.5.2 RNA-Isolation aus den beiden Melanomzell-Reihen MeWo und WM115

Für die endgültig verwendete RNA wurde nach folgendem Protokoll, modifiziert nach dem RNeasy Mini Handbook (72), verfahren.

Die Zellen wurden nach dem Passagieren wiederum in Zellkulturflaschen ausgesät. Die Zellen wurden aber nicht wie üblich beim Passagieren auf mehrere neue Flaschen aufgeteilt, sondern die neue Kulturflasche wurde mit der fast komplett passagierten Menge befüllt. Damit wurde sichergestellt, dass genug Zellen zur RNA-Isolation vorhanden waren. Nach 2 Tagen erfolgte der Mediumwechsel mit 1% Medium und Zugabe der zu untersuchenden Konzentrationen an Malassezin (12,5 bzw. 25 μ M). Nach entsprechender Inkubationszeit (3 bzw. 9h) wurden die Zellen abermals passagiert, in 10ml 10% Medium aufgenommen, um sicherzugehen, dass das Trypsin inaktiviert wurde. Die Zellzahl wurde mit der Neubauer Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Zellen 5min bei 300g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, und das Zellpellet in 1ml 10% Medium aufgenommen. Nach nochmaligem Zentrifugieren für 5min bei 300g, wurde der Überstand verworfen, so dass nur noch mit den Zellen weitergearbeitet werden konnte. Der Überstand wurde möglichst quantitativ verworfen, denn die unvollständige Entfernung des Überstands führt zu Inhibierung der Lyse.

Die Bindung der RNA an die RNeasy Membran kann dadurch beeinflusst werden. Zum Zerstören der Zellen wurde abgestimmt auf die Zellmenge 350 oder 600 μ l RLT Puffer (der Puffer RLT wurde pro ml mit 10 μ l β -Mercaptoethanol versetzt) zugegeben und durch Pipettieren gemixt. Zum Homogenisieren wurde das Lysat mindestens 10x durch eine 20gauge Nadel auf-und abbewegt. Nun wurde die gleiche Menge (350 oder 600 μ l) 70% Ethanol dem Lysat zugefügt, um eine selektive Bindung der RNA an die RNeasy Säule zu erreichen. Davon wurden 700 μ l auf eine im Test-Kit enthaltene RNeasy Säule gegeben und 15sec bei 10000g zentrifugiert. Der Durchfluß durch die Säule wurde verworfen.

4.2.5.3 Enzymatischer DNA-Abbau direkt auf der Säule

Die Säule wurde nochmals nach Zugabe von 350 μ l RW1 Puffer (im Qiagen Kit enthalten) für 5min bei 10000g zentrifugiert.

Nun wurde 10 μ l DNase (RNase-Free DNase Set von Qiagen) mit 70 μ l mitgeliefertem RDD Puffer vorsichtig durch Hin-und Herbewegen des Tubes gemischt, direkt auf die Silikagel-Membran der Säule gegeben, dann 30min zum Trocknen der Säule bei Raumtemperatur inkubiert und letztlich bei 10000g für 15s zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen. Der DNase Verdau dient zur

Entfernung eventuell noch vorhandener genomischer DNA, da der RT-PCR-Array sehr empfindlich auf noch vorhandene gDNA reagiert.

Die nachfolgenden Zentrifugationsschritte unter Zugabe von Waschpufferlösungen dienen zum Entfernen von Salzen, Proteinen und weiteren zellulären Bestandteilen von der Membran.

Nach der Inkubationszeit erfolgte ein Wasch-Schritt mit RW1 Puffer und Zentrifugation für 15s bei 10000g, um niedermolekulare Substanzen zu entfernen.

Erneut wurde die Säule mit 500µl RPE Puffer gewaschen und für 15s bei 10000g zentrifugiert.

Zum Trocknen der Silikagel Membran in der Säule wurde 500µl RPE Puffer aufgetragen und für 2min bei 10000g zentrifugiert.

Um die RNA aus der Säule zu bekommen, wurde 30µl Tris-Puffer, pH 8 direkt auf die Membran pipettiert und für 1min bei 10000g zentrifugiert.

4.2.5.4 Enzymatischer DNase-Abbau in Lösung

Um eine qualitativ-hochwertige RNA für die RT-PCR zu erhalten, erfolgte erneut ein DNase-Verdau. Diesmal in Lösung. Reine RNA ist essentiell für das Gelingen der RT-PCR.

4.2.5.5 Bestimmung der DNase Konzentration in Lösung

Einmalig wurde eine Konzentrations-Reihe mit 1-, 1,5-, 2 facher Menge an DNase durchgeführt. Der Abbau der DNA und die Prüfung auf das Vorhandensein von gDNA in dem RNA-Isolat wurde mittels PCR und Gelelektrophorese (siehe unter Qualitätstkontrollen Kapitel 4.2.6.1) kontrolliert.

Zu dem RNA-Produkt wurden für die WM115-Reihe 20µl RDD Puffer und 5µl DNase, für die MeWo-Reihe 15µl RDD Puffer und 3,75µl DNase gegeben. Mit RNase-freiem Wasser wurde das Volumen für WM115 auf 200µl, für MeWo auf 100µl aufgefüllt. Inkubiert wurde bei 20-25°C für 20min.

Dem enzymatischen DNase Abbau schloß sich eine RNA Aufreinigung an.

100µl der enzymatisch verdauten Lösung wurden in ein neues Gefäß gefüllt und mit 350µl RLT Puffer gemischt. Zum Verdünnen der RNA wurden 250µl 100% Ethanol zugegeben. Durch wiederholtes Ansaugen mit der Pipette wurden die Lösungen vermischt. 700µl wurden nun erneut auf eine RNeasy Mini Säule mit

entsprechendem Sammelgefäß transferiert und bei 10000g für 15s zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen.

Die nun folgenden letzten drei Schritte entsprechen denen nach dem DNase-Verdau auf der Säule und dem Eluieren der RNA.

Erneut wurde die Säule mit 500µl RPE Puffer gewaschen und für 15s bei 10000g zentrifugiert.

Zum Trocknen der Silikagel-Membran wurde 500µl RPE Puffer aufgetragen und für 2min bei 10000g zentrifugiert.

Die RNeasy Mini Säule wurde in ein neues Sammelbehältnis gegeben und 1min bei 10000g zentrifugiert. Dieser Schritt diente dazu, mögliche Rückstände des RPE Puffer's zu eliminieren.

Um die RNA aus der Säule zu eluieren, wurde 30µl Tris-Puffer, pH 8 direkt auf die Membran pipettiert und für 1min bei 10000g zentrifugiert.

In Vorversuchen wurden zu verwendende Zellzahlen, optimale Volumina für den DNase-Verdau und dessen Wirksamkeit auf der Säule und in Lösung, sowie Einwirkzeiten usw. ermittelt bzw. optimiert, um schließlich reine RNA zu erhalten.

Die Isolierung der RNA erfolgte an einem speziell gesäuberten Arbeitsplatz unter Verwendung von sterilem bzw. RNase-DNase-freiem Einmalmaterial. Verwendet wurde der RNeasy Mini Kit und das RNase-Free DNase Set von Qiagen.

4.2.5.5 Messung der optischen Dichte von RNA und cDNA im Spektrophotometer

Zum Messen der optischen Dichte OD wurde anfangs von den 30µl RNA im Verhältnis 1: 100 also 1µl RNA + 99µl 10mM Tris-Puffer pH 8 gemischt. Damit wurde eine Küvette mit 70µl befüllt. Für die abschließenden Untersuchungen wurden 5µl von den 30µl RNA mit 65µl H₂O vermischt und zum Messen in eine Küvette gegeben. Umso mehr RNA zur Messung der optischen Dichte genommen wird, desto aussagekräftiger ist das Ergebnis.

Es wurden die Absorptionen bei den Wellenlängen 260 und 280nm (A_{260} und A_{280}) gemessen. Ebenso wurde eine Küvette mit Tris-Puffer, pH 8 bzw. H₂O gemessen, um einen entsprechenden Leerwert zu erhalten. Mit Hilfe des Quotienten aus A_{260}/A_{280} kann eine näherungsweise Aussage über die Reinheit des RNA-Produktes getroffen werden. Er sollte größer als 1,9 sein, einzelne Werte bis 1,6 wurden toleriert.

Für die Abschätzung Messung der Kontrolle cDNA wurde gleich vorgegangen. Allerdings wurde jeweils in dem Verhältnis 1µl cDNA-Produkt mit 99µl H₂O gemischt und die Absorptionen gemessen. Wegen der geringen Menge konnte nicht mehr cDNA zum Messen verwendet werden, da die Hauptmenge für die RT-PCR benötigt wurde.

Die optische Dichte wurde wie folgt berechnet:

$$OD = 40 \times A_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor} \quad [\mu\text{g/ml}]$$

40 = Konstante für RNA bei der Messung der optischen Dichte (aus RNeasy Handbook)

50= Konstante für cDNA bei der Messung der optischen Dichte

4.2.5.6 RNA-Gehalt

Die RNA-Gesamtmenge ergibt sich aus dem noch vorhandenen „Rest“-Volumen RNA (30µl-1µl bzw. 30µl-5µl) und der gemessenen optischen Dichte.

$$\text{RNA-Menge} = OD \times \text{„Rest“-Menge RNA (0,029 bzw. 0,025)} \quad [\mu\text{g}]$$

4.2.6 Molekulargenetische Methoden

4.2.6.1 Kontrolle auf gDNA

a) PCR

Die PCR (Polymerase Chain Reaction) ist ein Verfahren zur in vitro Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten. In einem ersten Schritt wird der DNA Doppelstrang in Einzelstränge denaturiert. In der sog. Annealingphase binden die Oligonukleotid Primer an die Einzelstränge bei spezifischen Temperaturen, die meist zwischen 55°C-62°C liegen. Die Bindung ist abhängig von der verwendeten Primer-Sequenz.

In einer daran anschließenden Extensionsphase entwickelt sich die einsträngige DNA zu einer doppelsträngigen DNA, die unter Verbrauch von dNTP (Desoxyribonucleosidtriphosphat) der ursprünglichen entspricht. Diese

Primerverlängerung geschieht enzymatisch durch die Taq-Polymerase (DNA-Polymerase aus dem thermostabilen Bakterium *Thermus aquaticus*).

Durch die Wiederholung dieser Reaktionszyklen kann das interessierende DNA-Fragment nahezu exponentiell amplifiziert werden. Einzig durch den Verbrauch an dNTP, Oligonukleotiden und Taq-Polymerase ist diese Reaktion limitiert.

Dieses Verfahren kann auch dazu benutzt werden, um gDNA in RNA Proben auszuschließen. Als Leitgen wurde β -Actin verwendet. Die Produkte der RNA wurden mittels Gelelektrophorese überprüft.

Die hohen Temperaturen der PCR sollte die RNA nicht überstehen. Nur gDNA wird amplifiziert, die aber bereits durch die DNase-Verdauungsschritte während der RNA-Isolierung vernichtet worden sein sollte. Bei Betrachtung des PCR-Produktes nach der Gelelektrophorese unter UV-Licht darf also keine Bande mehr sichtbar sein.

Tabelle 2: Reagenzien für eine PCR- Reaktion

Volumina in μ l	Verwendete Substanz
2 μ l	PCR-Puffer (Invitrogen)
0,6	MgCl ₂ (Invitrogen)
0,4	dNTP (Promega)
0,4	β -Actin Forward Primer (Metabion)
0,4	β -Actin Reverse Primer (Metabion)
0,4	Taq-Polymerase (Invitrogen)
5,8	H ₂ O

Forward Primer mit der Sequenz:

5'-ATC TGG CAC CAC ACC TTC TAC AAT GAG CTG CG-3'

Reverse Primer mit der Sequenz:

5'-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3')

Der Primer (Metabion) wurde als Lyophilisat geliefert und zu 100 μ M mit Aqua dest. als Grundlösung aufgefüllt. Als Arbeitskonzentration wurde nochmals 1: 10, ebenfalls mit Aqua dest. verdünnt.

Die 10 μ l PCR-Cocktail wurden mit 0,5 μ g RNA, die mit H₂O ebenfalls auf 10 μ l aufgefüllt wurde, in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben.

Die PCR wurde mit folgendem Programm durchgeführt:

Tabelle 3: PCR-Programm zur Amplifizierung möglicher gDNA-Fragmente

Initiale Denaturierung	94°C	4min
35 Zyklen:		
Denaturierung	94°C	1min
Annealing	55°C	55s
Extension	72°C	50s
Abschlußextension	72°C	8min

b) Agarose-Gel-Elektrophorese des PCR-Produktes

Als Gel wurde ein 1% Agarose-Gel hergestellt. Dazu wurden 1g Agarose (Invitrogen) mit 10ml TBE (Tris-Borat-EDTA Puffer) und 90ml H₂O in einem Glaskolben auf eine Wärmeplatte bei 250°C gestellt. Der hineingelegte Magnet diente zum gleichmäßigen Lösen der Agarose. Wenn die Flüssigkeit klar war, wurde sie von der Wärmeplatte genommen. Zum Abkühlen wurde der Kolben unter einen Abzug gestellt. Der lauwarmen Flüssigkeit wurden 5µl Ethidiumbromid (Roth) zugefügt. Der Fluoreszenz-Farbstoff Ethidiumbromid wurde zum Detektieren möglicher DNA – Fragmente verwendet. Das Gel wurde in eine entsprechende Form in eine Gelkammer (Horizon 58, Whatman Biometra) gegossen. 2µl des PCR-Produktes wurden mit 8,5µl DNA-Farbstoff versetzt. Eine Gelkammer wurde mit 10µl dieses Gemisches befüllt. Gleichzeitig wurde eine weitere Kammer mit 10µl DNA-Standard bestückt. Der DNA-Standard besteht aus 20µl DNA-Ladder-Standard (eine Lösung von definierten DNA Fragmenten bis zu 250 kbp, Invitrogen) und 380µl Bromophenolblau-Ficoll-Lösung.

Die Elektrophorese erfolgte bei 120V und 1x TBE Lösung als Laufpuffer.

Im UV-Licht (DNA UV-Meter: GeneRay, UV-Photometer, Biometra) konnte das Gel betrachtet und zur Archivierung (Geldokumentationssystem: BDA Digital, Biometra) fotografiert werden. Das Gel sollte keine Banden aufweisen. Eine leichte unspezifische Färbung am Ende des Laufpuffers wurde akzeptiert.

4.2.6.2 Reinheitskontrolle der RNA

Die Kontrolle auf Reinheit der RNA erfolgte ebenfalls mittels Gel-Elektrophorese. Da ein denaturierendes Gel aufgrund der technischen Gegebenheiten nicht möglich war, wurde ebenfalls wie unter Kapitel 4.2.6.1b beschrieben, ein 1% Agarose-Gel hergestellt. Besondere Beachtung galt dabei, daß alle verwendeten Gegenstände inkl. der Gelschlitten RNase-frei waren. 2µg RNA wurden unter einem Abzug auf Eis mit RNA-Ladepuffer auf 15µl aufgefüllt.

Tabelle 4: Zusammensetzung des RNA-Ladepuffers

Volumina in µl	Verwendete Substanzen
2	10x TBE
10	Formamid (Roth)
3,5	Formaldehyd (Roth)
2	Dye Loading Buffer (s. u)
0,5	Ethidiumbromid (Roth)
4,5	RNase freies H ₂ O

Der RNA-Farbstoff bestand aus:

0,1g Bromophenolblau (Sigma)

50µl EDTA (pH 8/ 0,5M) (Sigma)

12,5ml Glycerin (100%, Merck)

25µl DEPC (Roth)

Die Substanzen wurden mit Aqua dest auf 25ml aufgefüllt, für 12h bei Zimmertemperatur gerührt und autoklaviert. Anschließend konnte der Farbstoff bei +4°C im Kühlschrank gelagert werden.

Die Lösung wurde 10min bei 65°C im Wärmeblock inkubiert und anschließend auf Eis zur Gelkammer getragen. Eine Kammer wurde mit 15µl RNA inkl. des Ladepuffers befüllt. Die Elektrophorese erfolgte bei 80V und mit 1x konzentriertem TBE als Laufpuffer. Das Gel wurde ca. 3cm laufen gelassen bzw. bis zwei ganz leicht rötlich schimmernde Striche im Verlauf der entsprechenden Kammer zu erkennen waren. Das Gel wurde ebenso unter UV-Licht begutachtet.

Die RNA-Reinheit und somit die Verwendbarkeit der RNA für die RT-PCR ist gegeben, wenn 2 klare Banden zu erkennen waren (intakte RNA ist durch die 18s und 28s rRNA-Untereinheit zu erkennen. Meist ist die 28s Bande doppelt so intensiv sichtbar wie die 18s, und damit ein guter Hinweis auf vollständig intakte RNA). Die Ergebnisse wurden fotografisch festgehalten.

4.2.7 cDNA-Synthese und RT-PCR

4.2.7.1 Hintergrund der RT-PCR

Real-Time Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion ist eine sehr sensitive und zuverlässige Methode der Genexpressions-Analyse. Mit der RT-PCR ist die Quantifizierung vieler, aber auch seltener Gene in einer Probe gleichzeitig möglich. Mit Hilfe eines Mikroarrays ist es zusätzlich möglich, den Fokus auf viele Gene eines bestimmten Prozesses zu setzen. Hier wurden 84 Gene untersucht, die bei der Apoptose eine Rolle spielen. Zusätzlich sind auf der zu untersuchenden Platte fünf sog. „Housekeeping Genes“ und zwei Negativ-Kontrollen vorhanden. Dieser Array (APH-012Av1) wurde für die Vorversuch und die Experimente mit den MeWo-Zellen (3h, 12,5µM Malassezin) verwendet. Für MeWo (9h, 12,5µM Malassezin) und WM115-Zellen (9h, 12,5 bzw. 25µM Malassezin) wurde der Array (PAH012Av3) verwendet. Der erste Array war nicht mehr erhältlich. Der Unterschied zwischen beiden Versionen besteht in der cDNA-Synthese-Methode und den vorhandenen Kontrollen. Weiterhin beinhaltet er eine Kontrolle auf gDNA, drei Reverse Transkriptase Kontrollen, sowie drei positive PCR Kontrollen.

Tabelle 5: Zusammenstellung der im Array untersuchten Gene

Position	Abkürzung	Beschreibung des Genes
A01	ABL 1	V-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homologe 1
A02	AKT 1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
A03	APAF 1	Apoptotic protease activating factor
A04	BAD	BCL 2-antagonist of cell death
A05	BAG 1	BCL 2-associated athanogene
A06	BAG 3	BCL 2-associated athanogene 3

A07	BAG 4	BCL 2-associated athanogene 4
A08	BAK 1	BCL 2-antagonist/ killer 1
A09	BAX	BCL 2-associated X protein
A10	BCL 10	B-cell CLL/ Lymphoma 10
A11	BCL 2	B-cell CLL/ Lymphoma 2
A12	BCL 2A1	BCL 2-related protein A1
B01	BCL 2L1	BCL 2-like 1
B02	BCL 2L10	BCL 2-like 10 (apoptosis facilitator)
B03	BCL 2L11	BCL 2-like 11 (apoptosis facilitator)
B04	BCL 2L2	BCL 2-like 2
B05	BCL AF1	BCL 2-associated transcription factor
B06	BFAR	Bifunctional apoptosis regulator
B07	BID	BH 3 interacting domain death agonist
B08	BIK	BCL 2-interacting killer (apoptosis- inducing)
B09	BIRC 1	Baculoviral IAP repeat- containing 1
B10	BIRC 2	Baculoviral IAP repeat- containing 2
B11	BIRC 3	Baculoviral IAP repeat- containing 3
B12	BIRC 4	Baculoviral IAP repeat- containing 4
C01	BIRC 6	Baculoviral IAP repeat- containing 6 (apollon)
C02	BIRC 8	Baculoviral repeat- containing 8
C03	BNIP 1	BCL 2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1
C04	BNIP 2	BCL 2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2
C05	BNIP 3	BCL 2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
C06	BNIP 3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein3-like
C07	BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog 1
C08	CARD 4	Caspase recruitment domain family, member 4
C09	CARD 6	Caspase recruitment domain family, member 6
C10	CARD 8	Caspase recruitment domain family, member 8
C11	CASP 1	Caspase 1, apoptosis- related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)
C12	CASP 10	Caspase 10, apoptosis-related cysteine protease
D01	CASP 14	Caspase 14, apoptosis-related cysteine protease
D02	CASP 2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine protease

		(neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 2)
D03	CASP 3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine protease
D04	CASP 4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine protease
D05	CASP 5	Caspase 5, apoptosis-related cysteine protease
D06	CASP 6	Caspase 6, apoptosis-related cysteine protease
D07	CASP 7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine protease
D08	CASP 8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine protease
D09	CASP 9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine protease
D10	CD 40	CD 40 antigen (TNF receptor superfamily member 5)
D11	CD 40LG	CD 40 ligand (TNF receptor superfamily member 5, hyper-IgM syndrome)
D12	CFLAR	CASP 8 and FADD-like apoptosis regulator
E01	CIDEA	Cell death-inducing DFFA-like effector a
E02	CIDEB	Cell death-inducing DFFA-like effector b
E03	CRADD	CASP 2 and RIPK 1 domain containing adaptor with death domain
E04	DAPK 1	Death-associated protein kinase 1
E05	DFFA	DNA-fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide
E06	FADD	Fas (TNFRSF 6)-associated via death domain
E07	FAS	Fas (TNF receptor superfamily, domain 6)
E08	FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
E09	GADD 45A	Growth arrest and DNA- damage- inducible, alpha
E10	HRK	Harakiri, BCL 2 interacting protein (only BH3 domain)
E11	IGF 1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
E12	LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
F01	LTBR	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)
F02	MCL 1	Myeloid cell leukaemia sequence 1 (BCL 2- related)
F03	NOL 3	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)
F04	PYCARD	PYD and CARD domain containing

F05	RIPK 2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2
F06	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
F07	TNFRSF 10A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10a
F08	TNFRSF 10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
F09	TNFRSF 11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegrin)
F10	TNFRSF 1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
F11	TNFRSF 21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
F12	TNFRSF 25	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25
G01	TNFRSF 7	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7
G02	TNFRSF 9	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
G03	TNFSF 10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
G04	TNFSF 7	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7
G05	TNFSF 8	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
G06	TP 53	Tumor protein p53 (Li- Fraumeni- syndrome)
G07	TP 53BP2	Tumor protein p53 binding protein, 2
G08	TP73	Tumor protein p73
G09	TRADD	TNFRSF 1A-associated via death domain
G10	TRAF 2	TNF receptor-associated factor 2
G11	TRAF 3	TNF receptor-associated factor 3
G12	TRAF 4	TNF receptor-associated factor 4
H01	18sRNA	Human 18s ribosomal RNA
H02	HPRT 1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan-syndrome)
H03	RPL 13A	Ribosomal protein L13A
H04	GAPD	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
H05	ACTB	Actin, beta

H06	ACTB	Actin, beta bzw. GDC
H07	ACTB	Actin, beta bzw. RTC
H08	ACTB	Actin, beta bzw. RTC
H09	ACTB	Actin, beta bzw. RTC
H10	ACTB	Actin, beta bzw. PPC
H11	ACTB	Actin, beta bzw. PPC
H12	ACTB	Actin, beta bzw. PPC

4.2.7.2 cDNA-Synthese und Bestücken der RT-PCR Platte Version 1

Zur cDNA-Synthese wird ein sog. „RT-Cocktail“ vorbereitet (RT² First Strand Kit C-01, SuperArray, SABioscience, Frederick, USA). Er beinhaltet:

Tabelle 6: „RT-Cocktail“ zur cDNA-Synthese v1

RT-Cocktail	Volumen pro Reaktion in µl
Buffer BC (5x RT Buffer)	4
RNase-free H ₂ O	4
RI (RNase Inhibitor)	1
RE (Reverse Transkriptase)	1

10µl des „RT-Cocktails“ wurden zu je 10µl RNA (2µg RNA mit RNase freiem H₂O auf 10µl aufgefüllt) gegeben und für 60min bei 37°C im Thermocycler inkubiert. Anschließend erfolgt eine Erhitzung für 5min auf 95°C. Dies dient dazu, die restliche RNA abzubauen und die Reverse Transkriptase zu inaktivieren. Zu der entstandenen cDNA werden 80µl doppelt-destilliertes Wasser zugefügt, so dass das Reaktionsprodukt ein End-Volumen von 100µl hat.

Die Platte wurde auf eine spezielle Plattenvorrichtung gestellt, damit die Außenseite der Platte nicht kontaminiert wird.

Nun wurde der Array nach Vorschrift bestückt.

In die wells A1-H5 kommen im Verhältnis 12,5: 1: 11,5 PCR 2x Master Mix (fertig mitgeliefert im PCR Array), synthetisierte cDNA und dd H₂O insgesamt 25µl.

Für die wells H6-H10 wird eine 10er Serien Verdünnungsreihe im Verhältnis 9:1 PCR 1x Master Mix mit einem Teil des Materials, welches im vorherigen well

benutzt wurde, hergestellt. Begonnen wird mit dem Produkt, das aus der Herstellung für die wells A1-H5 zurückgeblieben ist.

Für das well H11 wird ein 1µl einer 1:100 Verdünnung der ursprünglich synthetisierten RNA mit 24µl 1x Master Mix hergestellt als sog. „no-reverse-transkriptase“-Kontrolle (NRT). Dient zur Kontrolle, ob es zur Kontamination der RNA mit genomischer DNA gekommen ist.

Das well H12 wird nur mit 25µl 1x Master Mix bestückt als sog. „no-template“-Kontrolle (NTC). Auch hier wird überprüft, ob die Lösungem mit DNA kontaminiert ist.

Die Plattenoberfläche wurde mit optisch-klaeren dünnwandigen Folienstreifen verschlossen.

4.2.7.3 cDNA-Synthese und Bestücken der RT-PCR Platte Version 3

Verwendet wurde der RT² First Strand Kit C-03, SuperArray. 2µg RNA wurden mit 2µl GE (5x gDNA Eliminations Puffer) gemischt (falls das Volumen <10µl war, wurde dies mit RNase freiem Wasser auf 10µl aufgefüllt) und kurz zentrifugiert.

Die Mischung wurde bei 42°C für 5min inkubiert, und anschließend 1min auf Eis gestellt.

Zu den 10µl gDNA Eliminations Mix wurden 10µl RT-Cocktail zugegeben.

Der RT-Cocktail beinhaltet:

Tabelle 7: „RT-Cocktail“ zur cDNA-Synthese v3

RT-Cocktail	Volumen pro Reaktion in µl
BC3 (5x RT Buffer 3)	4
RNase-free H ₂ O	3
P2 (Primer u. Externer Kontroll- Mix)	1
RE 3 (RT Enzym Mix 3)	2

Die Mischung wurde bei 42°C für 15min im Thermocycler inkubiert. Zur Degradierung der RNA und Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte eine Erhitzung auf 95°C für 5min.

Zu der entstandenen cDNA werden 91µl doppelt-distilliertes Wasser zugefügt, so dass das Reaktions-Produkt ein End-Volumen von 111µl hat.

Um die Platte zu befüllen, wurde folgendes vermengt:

Tabelle 8: Zusammensetzung des Experimental Cocktails v3

2x SuperArray RT ² qPCR Master Mix	1275µl
Verdünnte cDNA	102µl
ddH ₂ O	1173µl
Endvolumen	2550µl

Die Platte wurde auf eine spezielle Plattenvorrichtung gestellt, damit die Außenseite der Platte nicht kontaminiert wird.

In jedes well wurden 25µl Experimental Cocktail gegeben.

Well H6 beinhaltet eine gDNA Kontrolle (GDC), die mit ihren Primern sehr sensitiv Kontamination mit nicht transkribierter gDNA detektiert.

Well H7-H9 enthalten eine Reverse Transkriptase Kontrolle (RTC), die die Effizienz der cDNA-Synthese Reaktion testet.

Well H10-H12 enthalten positive PCR Kontrollen (PPC), die die Effizienz der eigentlichen Polymerase Kettenreaktion untersuchen.

Die Plattenoberfläche wurde mit optisch-klaaren dünnwandigen Streifen verschlossen.

4.2.8 RT-PCR

Die vollbestückte Platte wurde zum Vermeiden von störenden Bläschen kurz zentrifugiert. Anschließend wurde die Platte in der Vorrichtung auf Eis zum Gerät getragen.

Die vollbestückte Platte (ohne Vorrichtung) wurde in den ABI Prism 7000 gegeben und die RT-PCR mit folgendem Programm durchgeführt.

Tabelle 9: Programm für die RT-PCR im ABI 7000 Thermocycler

Zyklen	Dauer	Temperatur
1	10 min	95°C
40	15 s	95°C
	1 min	60°C

Anmerkung:

Zyklus 1 wird zum Aktivieren der HotStart DNA Polymerase benötigt.

Innerhalb des Ablaufes der RT-PCR wurde während des Annealing-Schrittes von jedem Zyklus die SYBR Green Fluoreszenz zur Protokollierung des Reaktionsfortschritts detektiert.

Direkt im Anschluß an das PCR Programm startete zur Qualitätskontrolle ein sog. Dissoziationskurven-Programm. Bei einer Temperatur > 80° C sollte nicht mehr als ein Peak in jeder Reaktion erscheinen.

Anmerkung: bei dem Gen ABL (well 1) waren immer 2 Ausschläge bei >80°C zu erkennen, deren Ursache nicht geklärt werden konnte. Es zeigten sich immer sehr variable Ausschläge. Daher wurde das Gen Abl in der Auswertung nicht beachtet.

4.2.8.1 Auswertung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode

Die Schwelle, der sog. Threshold, von der der sog. Ct-Wert berechnet wird, ab der ein Gen Änderungen unterliegt, sowie die Festlegung der Basislinie erfolgte mit 7000 System SDS Software 1.2.3.

Die Schwelle, ab der eine Änderung der Genexpression als signifikant angesehen wird, erfolgte mit der $\Delta\Delta C_t$ -Methode.

Die Auswertung nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode erfolgte anhand der Excel-Arbeitsmappe, die von SuperArray zur Verfügung gestellt wurde (Download unter <http://www.superarray.com/pcrarraydataanalysis.php>)

4.2.8.2 Mathematische Erklärung der $\Delta\Delta Ct$ -Methode

Zurückzuführen auf die inverse proportionale Beziehung der threshold cycles (Schwellenwert-Zyklus) und dem originalen Gen-Expressionslevels, und der Verdoppelung der Produktionsmenge mit jedem Zyklus, kann für jedes interessierende Gen ein echter Expressions-Level L ausgedrückt werden als:

$$L = 2^{-Ct}$$

Die Fluoreszenz wird immer am Anfang der exponentiellen Phase gemessen. Mit dem Ct-Wert (threshold cycle= Schwellenwert-Zyklus) wird die Fluoreszenz beschrieben, die erstmals signifikant über der Hintergrundfluoreszenz liegt.

Um den Expressionslevel eines interessierenden Gens (GOI, Gene of interest) zu einem Housekeeping-Gene (HKG) in Relation zu setzen, muß der Expressions-Level beider Gene durcheinander geteilt werden:

$$\frac{2^{-Ct(GOI)}}{2^{-Ct(HKG)}} = 2^{-[Ct(GOI)-Ct(HKG)]} = 2^{-\Delta Ct}$$

Um den sog. fold change (Änderung, ab der ein Gen der Regulation unterliegt) der Genexpression zu ermitteln, wird der Expressionslevel eines untersuchenden Gens mit und ohne Stimulation (hier Malassezin) dividiert.

$$\frac{2^{-\Delta Ct_{Test}}}{2^{-\Delta Ct_{Kontrolle}}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

($\Delta\Delta Ct$ entspricht $\Delta Ct_{Test} - \Delta Ct_{Kontrolle}$)

Daraus ergibt sich folgende komplette Kalkulation:

$$\frac{\frac{2^{-Ct(GOI)_{Test}}}{2^{-Ct(HKG)_{Test}}}}{\frac{2^{-Ct(GOI)_{Kontrolle}}}{2^{-Ct(HKG)_{Kontrolle}}}} = \frac{2^{-[Ct(GOI)-Ct(HKG)]_{Test}}}{2^{-[Ct(GOI)-Ct(HKG)]_{Kontrolle}}} = \frac{2^{-\Delta Ct_{Test}}}{2^{-\Delta Ct_{Kontrolle}}} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

5. Ergebnisse

5.1. Freisetzung der LDH als Maß für Zellnekrosen

5.1.1 Bestimmung der optimalen Zellzahl/ well mittels LDH-Vorversuch

Zur Bestimmung der optimalen Zellzahl wurden 3000-9000 Zellen in 6well Platten ausgesät. Die LDH wurde nach 24, 48, 72, 96, 120, 144 Stunden bestimmt (n=6) (bei MeWo 120Std. n=5, bei WM115 120Std. n=5, 144Std. n=4). Die low control wurde jeweils 4fach und die high control 2fach bestimmt.

Beobachtet wurde das Verhalten der Zellen ohne weitere Zugabe von Nährstoffen.

Bei beiden Zellreihen war innerhalb der ersten 48 Stunden eine Konstanz im LDH-Test der spontan zerfallenen Zellen zu erkennen.

Zwischen 72-144 Stunden überstieg die Rate spontan lysierter Zellen teilweise die der mit Triton-X-100 behandelten. Dies ist wahrscheinlich auf den fehlenden Mediumwechsel zurückzuführen. Die maximal lysierten Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 behandelt, während die low control-Zellen bis zum Verbrauch des Mediums weiter gedeihen konnten. Die Dauer von 96 Stunden war an der Grenze des Zumutbaren für die Zellkultur. Damit ist zu erklären, weshalb ab dem 3. Tag die Werte der low control die der high control teilweise überstiegen und innerhalb der Messreihen schwanken (siehe auch Tabellen 22-33 im Anhang).

Für den LDH-Test und die FacsAnalyse wurde für die Zellreihe MeWo die Zellzahl auf 6000 Zellen/ 3ml Medium/ well festgelegt. Die LDH wurde in Verbindung mit den Facs-Versuchen bestimmt. Aufgrund ihres langsameren Wachstumsverhaltens mußte die Zellzahl für die Zellreihe WM115 auf 10 000 Zellen/ 3ml/ well festgelegt werden.

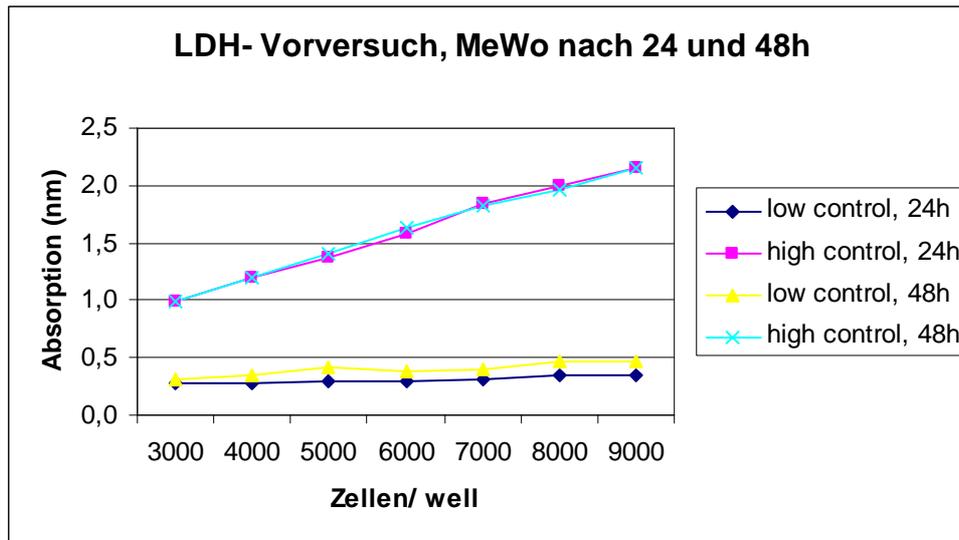


Abbildung 5: LDH-Vorversuch: MeWo, 24h und 48h

(siehe auch Tabelle 22-27 im Anhang für 72-144h)

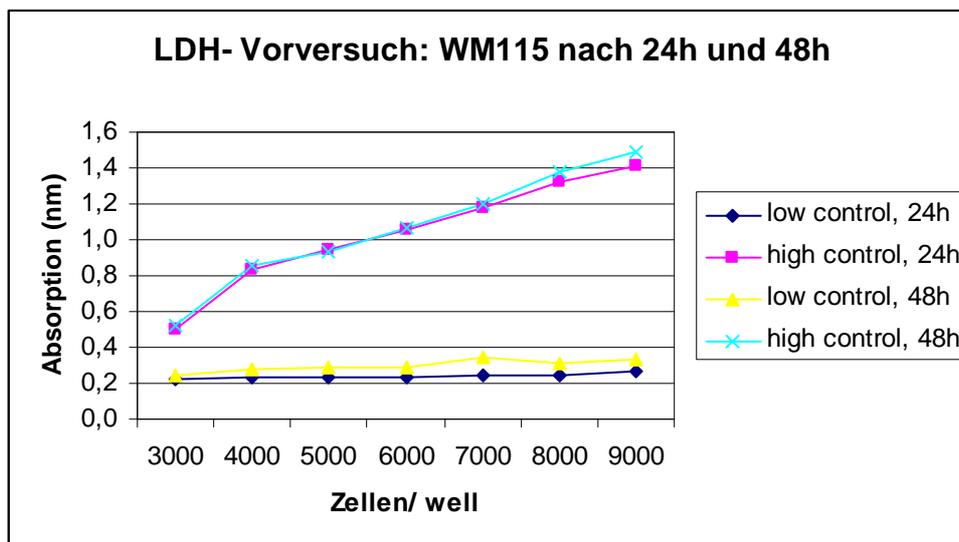


Abbildung 6: LDH-Vorversuch: WM115, 24h und 48h

(siehe auch Tabelle 28-33 im Anhang für 72-144h)

5.2 LDH bei den untersuchten Substanzen

5.2.1 LDH bei Inkubation mit Malassezin

Die Zellreihen wurden jeweils mit unterschiedlichen Konzentrationen (50µM-3,125µM) Malassezin inkubiert. Die LDH wurde nach 4, 6, 8, und 12 Stunden bestimmt (n= 4).

Deutlich zu erkennen ist, dass die Absorptionswerte der LDH innerhalb der ersten 12 Stunden bei MeWo < 0,23 nm und bei WM115 < 0,24 nm betragen. Die LDH

istkonstant niedrig. Somit verhält sich die LDH bei Inkubation mit Malassezin ähnlich der unbehandelten Kontrollzellen.

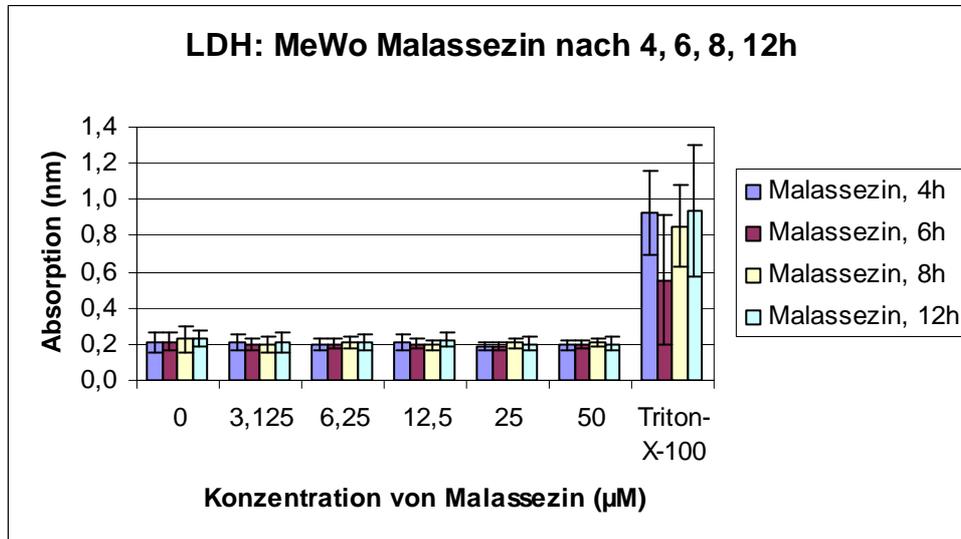


Abbildung 7: LDH: MeWo Malassezin nach 4, 6, 8, 12h, (n= 4)

(siehe auch Tabelle 34-37 im Anhang)

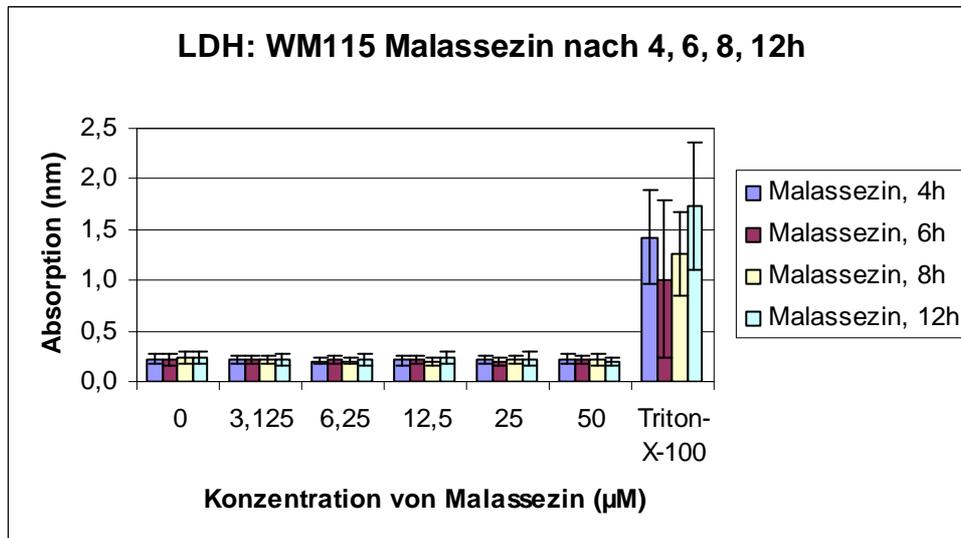


Abbildung 8: LDH: WM115 Malassezin nach 4, 6, 8, 12h, (n= 4)

(siehe auch Tabelle 38-41 im Anhang)

5.2.2 LDH im Vergleich zwischen Malassezin und Staurosporin

Die Zellreihen wurden jeweils einzeln mit Malassezin und Staurosporin für 4, 6 und 8 Stunden inkubiert (n=1).

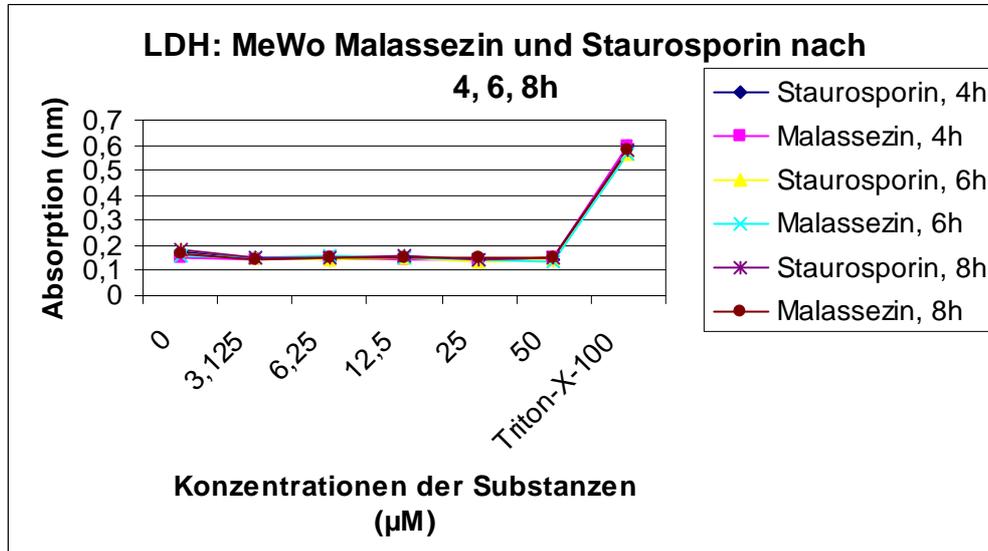


Abbildung 9: LDH: MeWo Malassezin und Staurosporin nach 4, 6, 8h (siehe auch Tabelle 42-44 im Anhang)

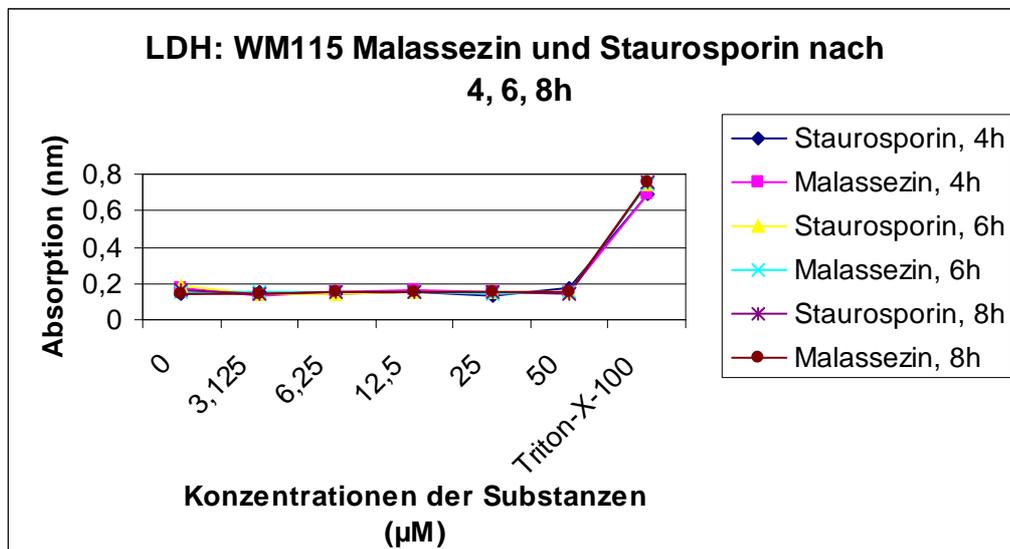


Abbildung 10: LDH: WM115 Malassezin und Staurosporin nach 4, 6, 8h (siehe auch Tabelle 45-47 im Anhang)

Trotz der Übereinanderlagerung der einzelnen Zeiten war klar zu erkennen, dass die LDH bei beiden Zellreihen auf recht niedrigen Level blieben.

5.2.3 LDH im Vergleich zwischen Malassezin und α -Naphthoflavon

Da α -Naphthoflavon ein AHR-Partial-Antagonist und Malassezin ein schwacher AHR- Agonist ist, wurde getestet, ob bei gleichzeitiger Behandlung der Zellkultur sowohl mit α -Naphthoflavon als auch mit Malassezin eine Aufhebung des Malassezin-Effektes zu verzeichnen ist.

Die Zellen wurden jeweils mit Malassezin und α -Naphthoflavon einzeln, als auch gemeinsam bei MeWo für 24 und 48 Stunden inkubiert (n= 1).

Bei WM115 wurde für 48 (n= 2) und 96 Stunden (n= 1) inkubiert.

Eine aufhebende oder protektive Wirkung des α -Naphthoflavon war nicht ersichtlich. Auf weitere Versuche wurde verzichtet.

Die LDH ist annähernd gleich. Zu beachten ist, dass bei der WM115-Reihe nach 96 Stunden der Leerwert enorm angestiegen ist, die Zellkultur ist somit untergegangen, während die Zellen, die mit den Substanzen inkubiert wurden, gleichbleibend niedrige Werte aufwiesen. Die LDH blieb bei Inkubation mit allen Substanzen konstant niedrig. Der einzige limitierende Faktor war die Zeit.

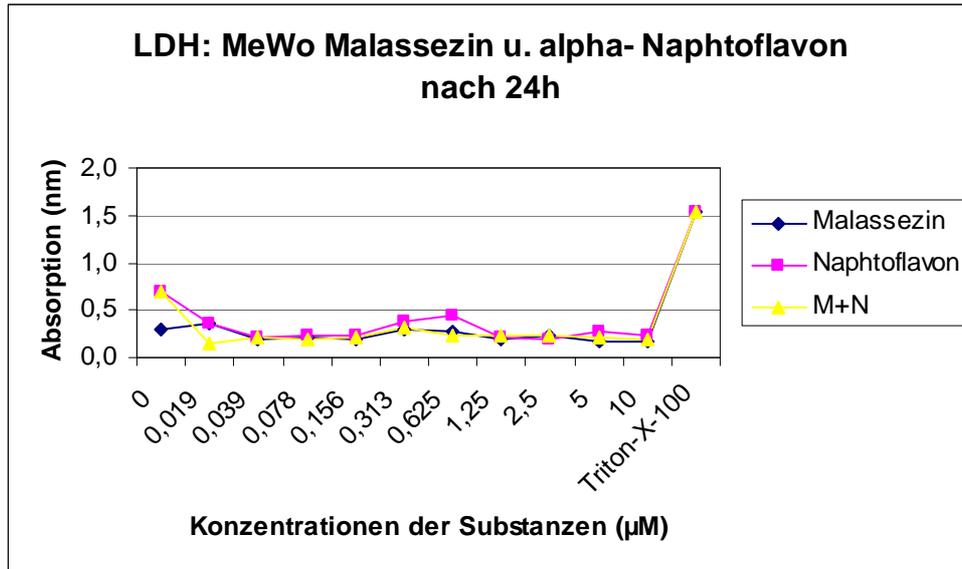


Abbildung 11: LDH: MeWo Malassezin und α -Naphtoflavon nach 24h (siehe auch Tabelle 48 im Anhang)

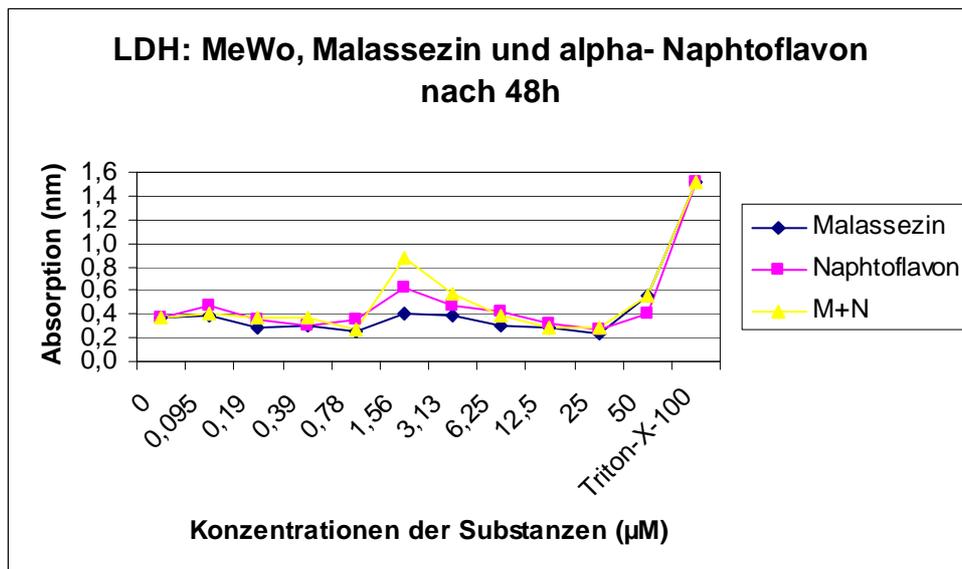


Abbildung 12: LDH: MeWo Malassezin und α -Naphtoflavon nach 48h (siehe auch Tabelle 49 im Anhang)

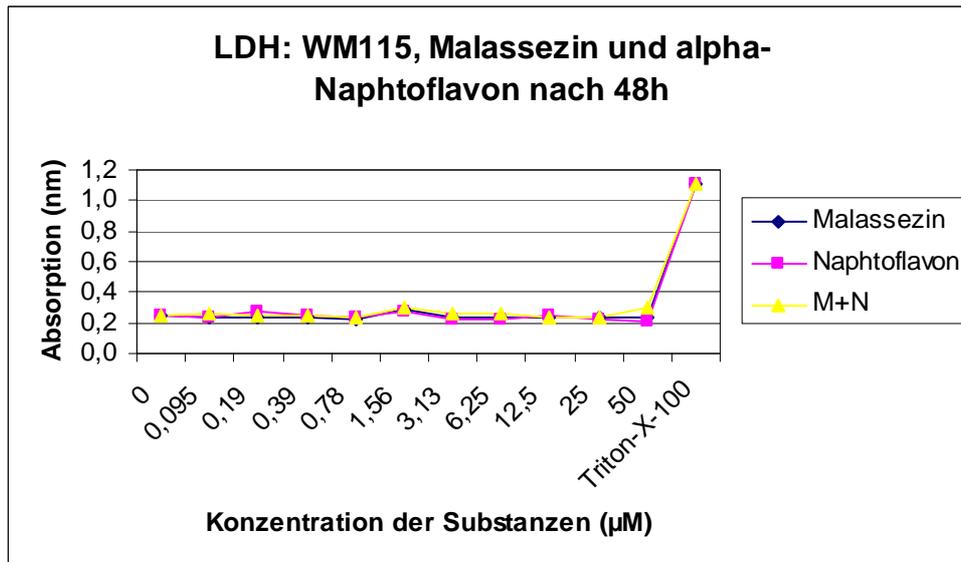


Abbildung 13: LDH: WM115 Malassezin und α -Naphtoflavin nach 48h
(siehe auch Tabelle 50 im Anhang)

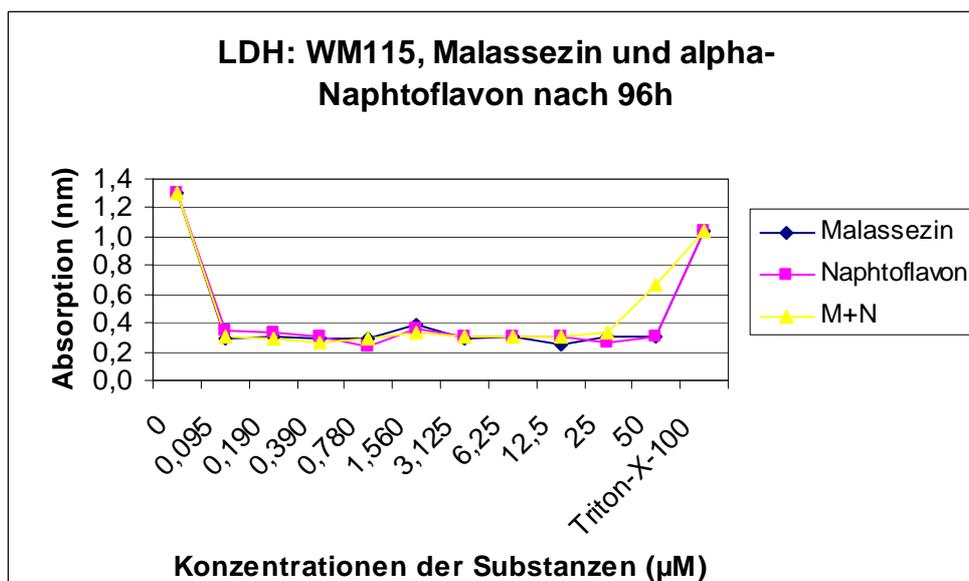


Abbildung 14: LDH: WM115 Malassezin und α -Naphtoflavin nach 96h
(siehe auch Tabelle 51 im Anhang)

5.3 Differenzierung von Apoptose und Nekrose mittels FacScan-Analyse

Die Zellen wurden 4, 6, 8 und 12 Stunden mit den zu untersuchenden Substanzen in absteigenden Konzentrationen (50 μ M-3,125 μ M Malassezin) inkubiert.

Bei der Zellreihe MeWo ist bereits nach 4h eine deutliche apoptotische Veränderung der Zellen imFacScan insbesondere bei den Konzentrationen 50 μ M-12,5 μ M zu erkennen.

Diese Apoptose-typischen Veränderungen steigen bei Inkubation bis zu 8 Stunden mit Malassezin weiter an, während die Inkubation von 12 Stunden nur mäßige Veränderungen zeigt. Die Abbildung 19 zeigt, dass die Zellreihe MeWo bereits bei den Kontrollzellen eine hohe Rate (um die 40%) apoptotischer Zellen aufweist. Inkubationszeit-unabhängig war ein sprunghafter Anstieg apoptotischer Zellen ab einer Konzentration von 25 μ M Malassezin zu erkennen. Umgekehrt nimmt die Zahl der vitalen Zellen ab. Die Anzahl nekrotischer Zellen war konstant gering und ist auf den spontanen Zerfall der Zellen zurückzuführen.

In folgender Abbildung wird exemplarisch die Punkt-Wolken-Diagramme einzelner Konzentrationen einer Messung dargestellt. Eine klare Dosisabhängigkeit ist auf einen Blick zu erkennen (n=5).

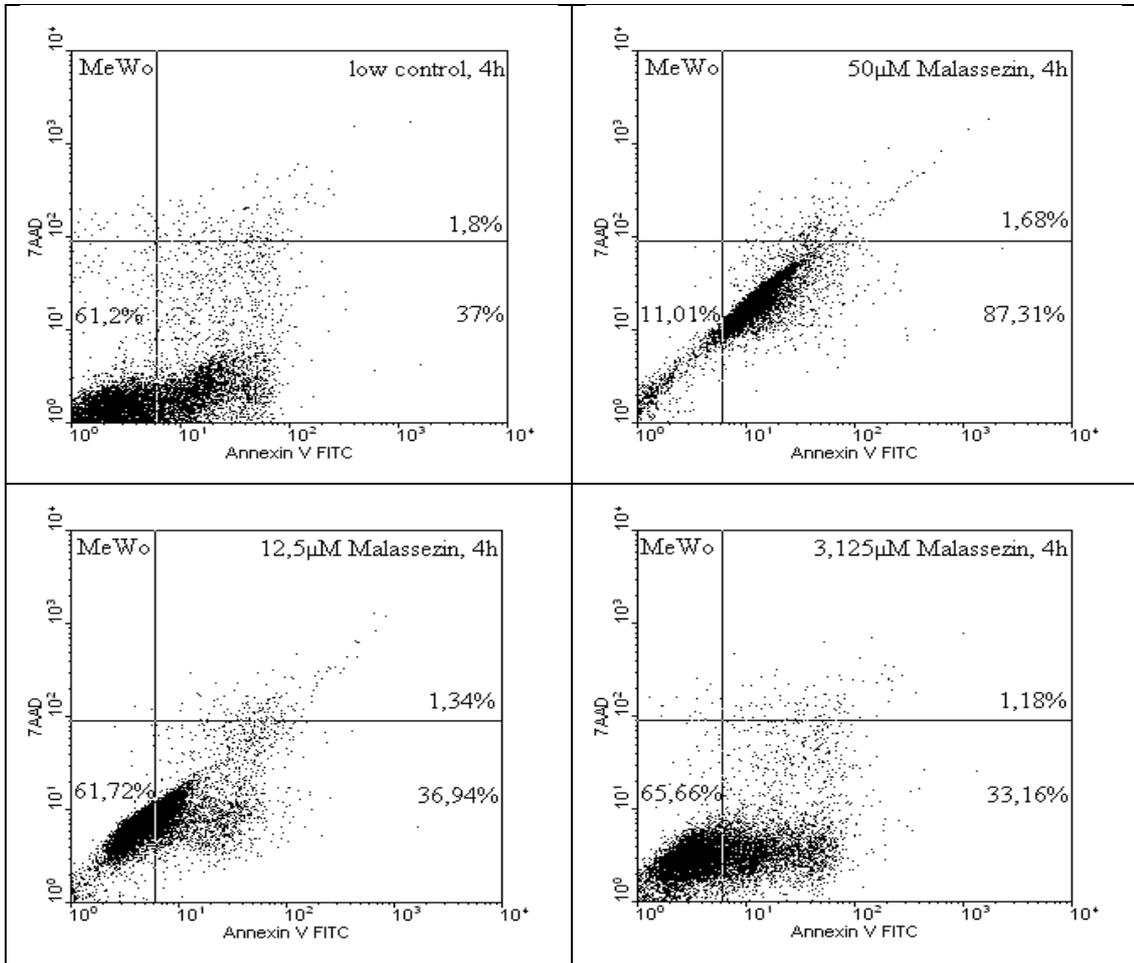


Abbildung 15: Facs Dotplots MeWo 4h

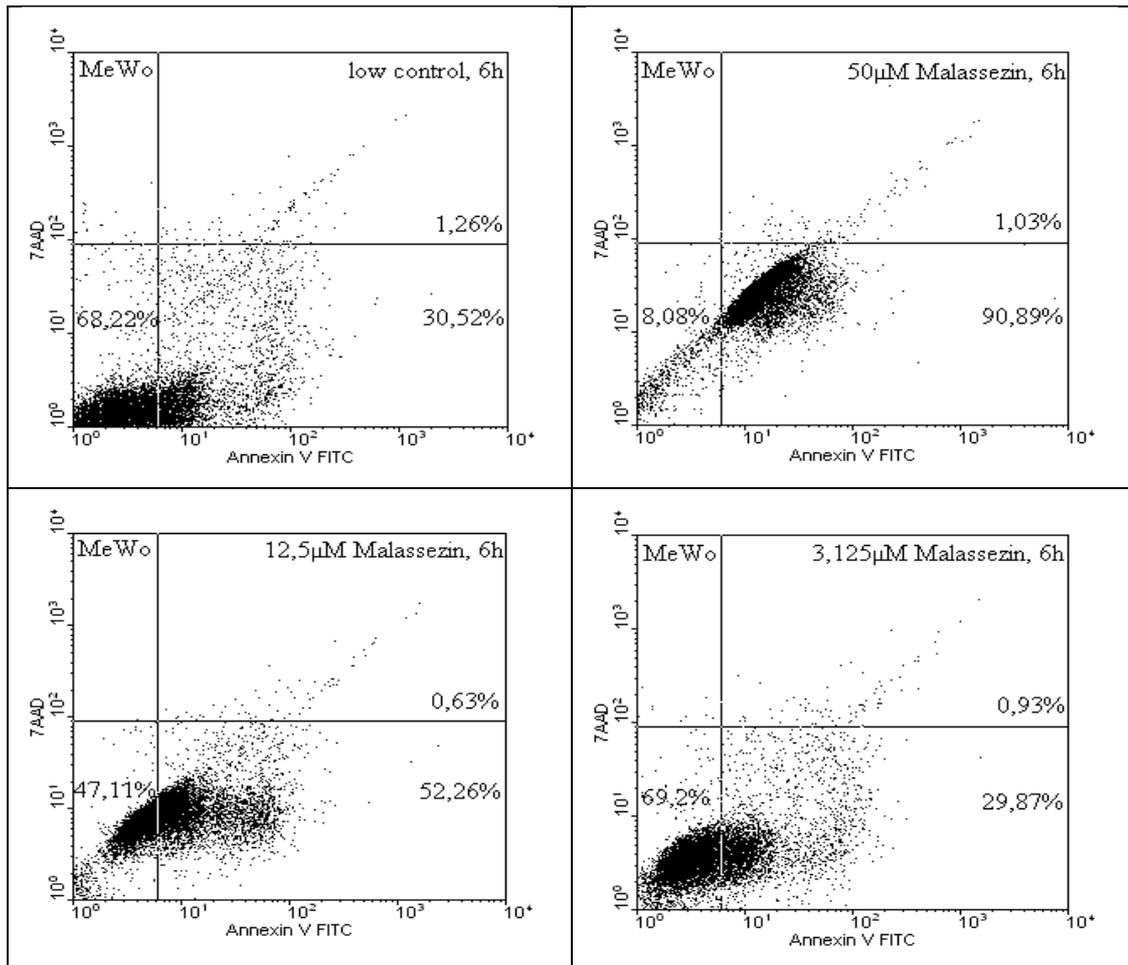


Abbildung 16: Facs Dotplots MeWo 6h

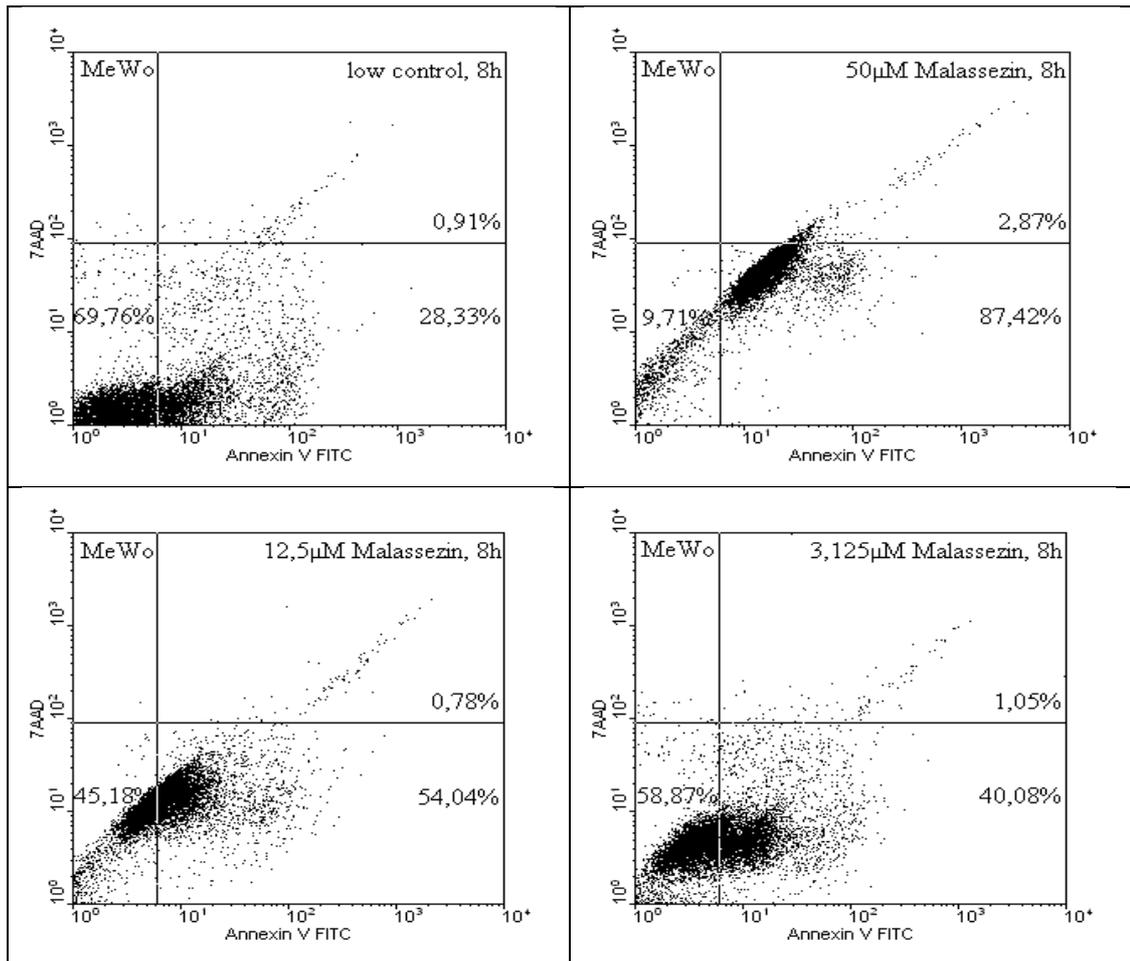


Abbildung 17: Facs Dotplots MeWo 8h

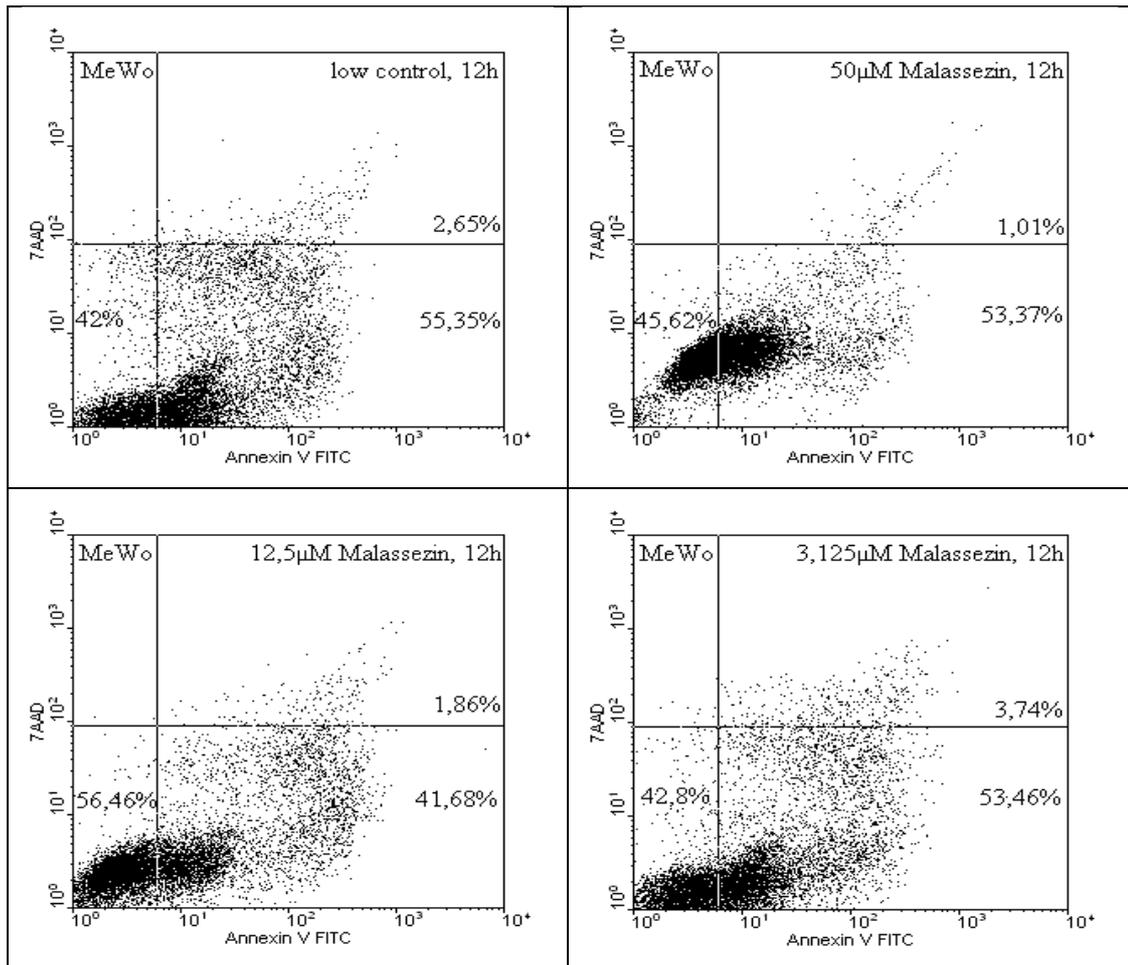


Abbildung 18: Facs Dotplots MeWo 12h

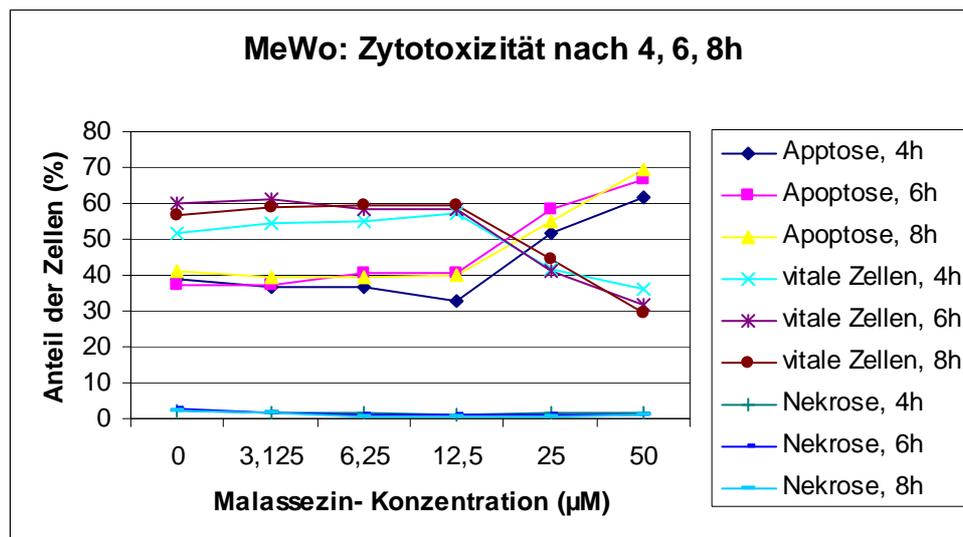


Abbildung 19: MeWo Zytotoxizität von Malassezin nach 4, 6, 8h

(siehe auch Tabellen 52-55 im Anhang)

Auf die graphische Darstellung der Standardabweichung wurde zum Zwecke der Übersicht (auch in den folgenden Abbildungen) verzichtet. Die Standardabweichung ist jeweils im Tabellenanhang zu finden.

Im Folgenden sind exemplarisch die Histogramme der o.g. Dotplots der Reihe MeWo dargestellt

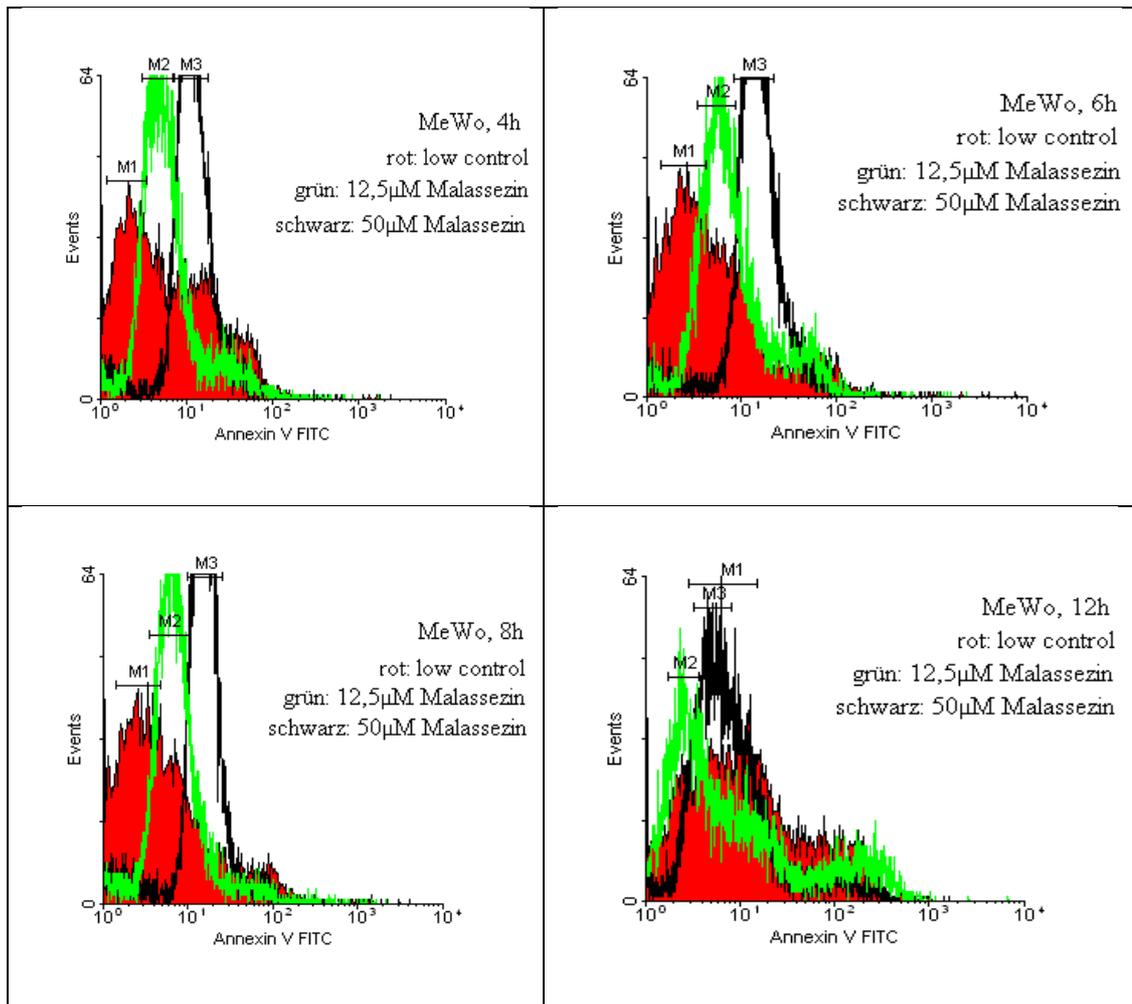


Abbildung 20: Facs Histogramme MeWo 4, 6, 8, 12h

Bei der Zellreihe WM115 war nach 4h mittels Facs-Analytik nur minimale apoptotische Veränderungen sichtbar. Aus Abbildung 25 ist zu entnehmen, daß die Zahl apoptotischer Zellen bei Inkubation von 6h zunahm und bei einer Inkubationszeit von 8h am stärksten ausgeprägt war. Ebenso wie bei MeWo sind nach 12h nur moderate Veränderungen sichtbar. Die Zahl apoptotischer Zellen in den Kontrollzellen liegt unter 20%. Nach 6h stieg die Zahl apoptotischer Zellen an, während die Anzahl vitaler Zellen abnahm, insbesondere bei Konzentrationen ab 25µM Malassezin. Die Anzahl nekrotischer Zellen war konstant gering und vernachlässigbar klein.

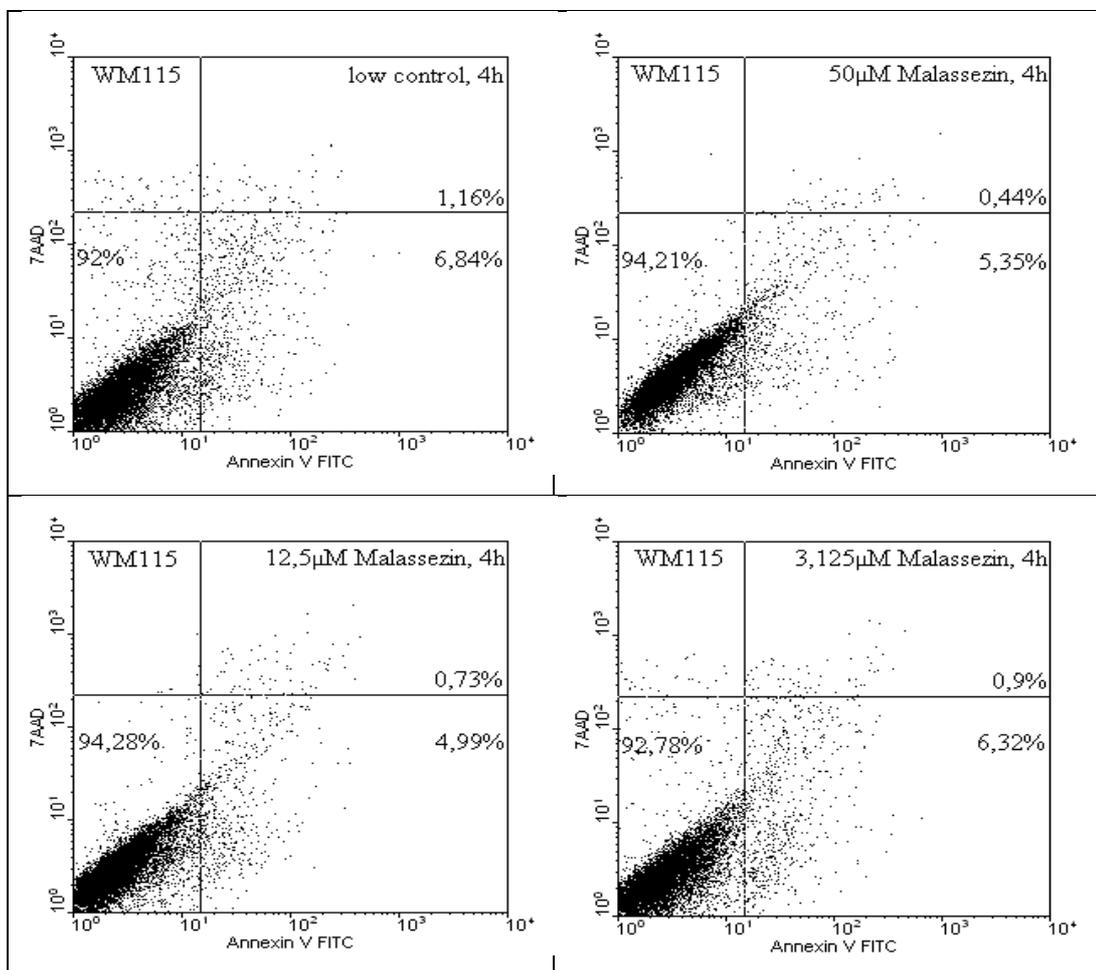


Abbildung 21: Facs Dotplots WM115 4h

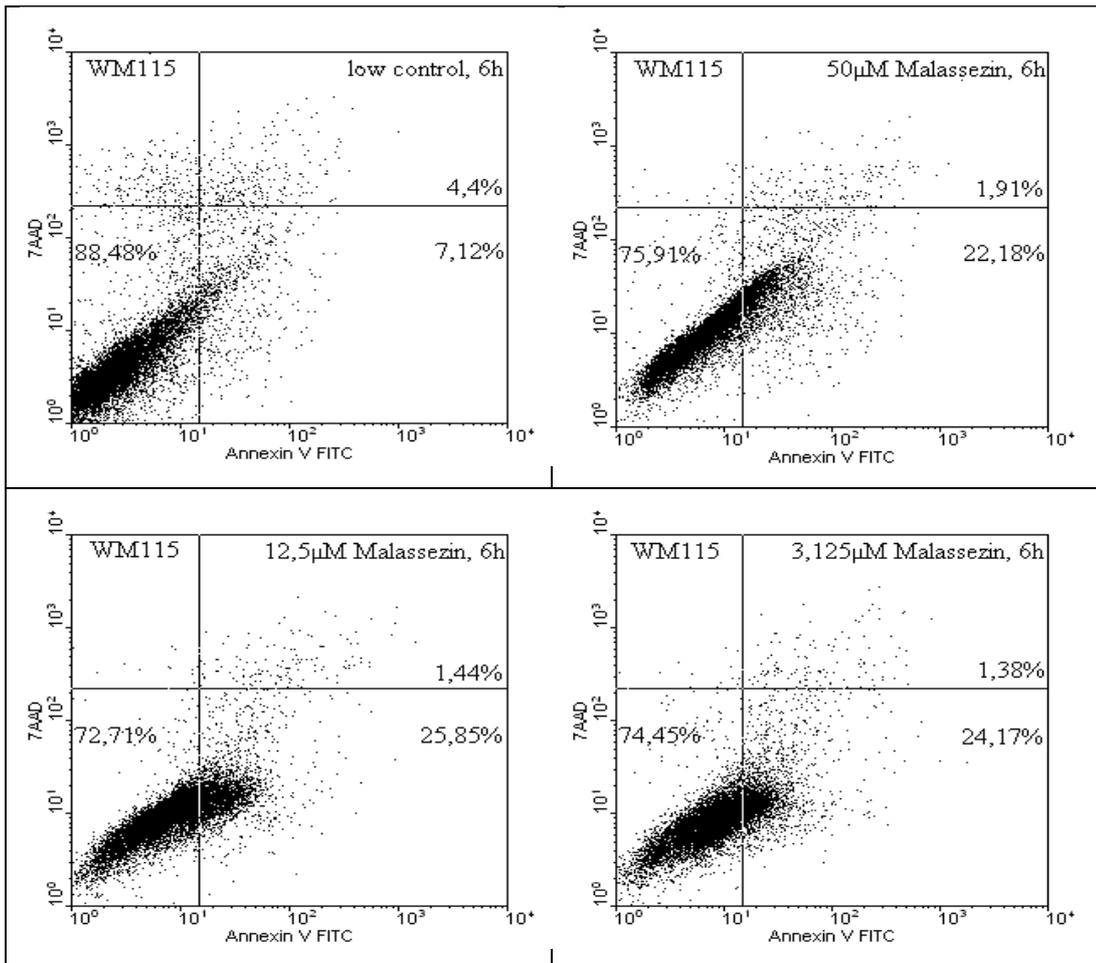


Abbildung 22: Facs Dotplots WM115 6h

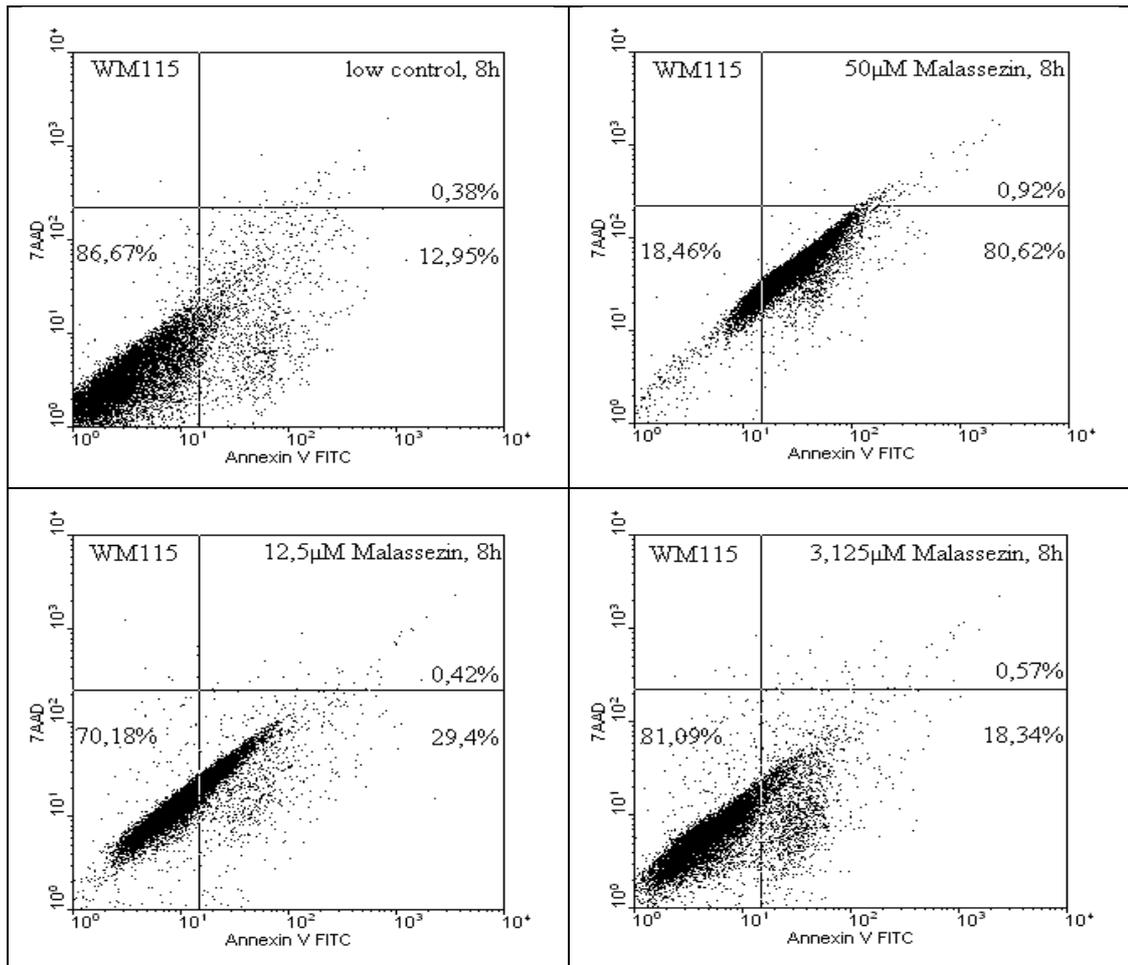


Abbildung 23: Facs Dotplots WM115 8h

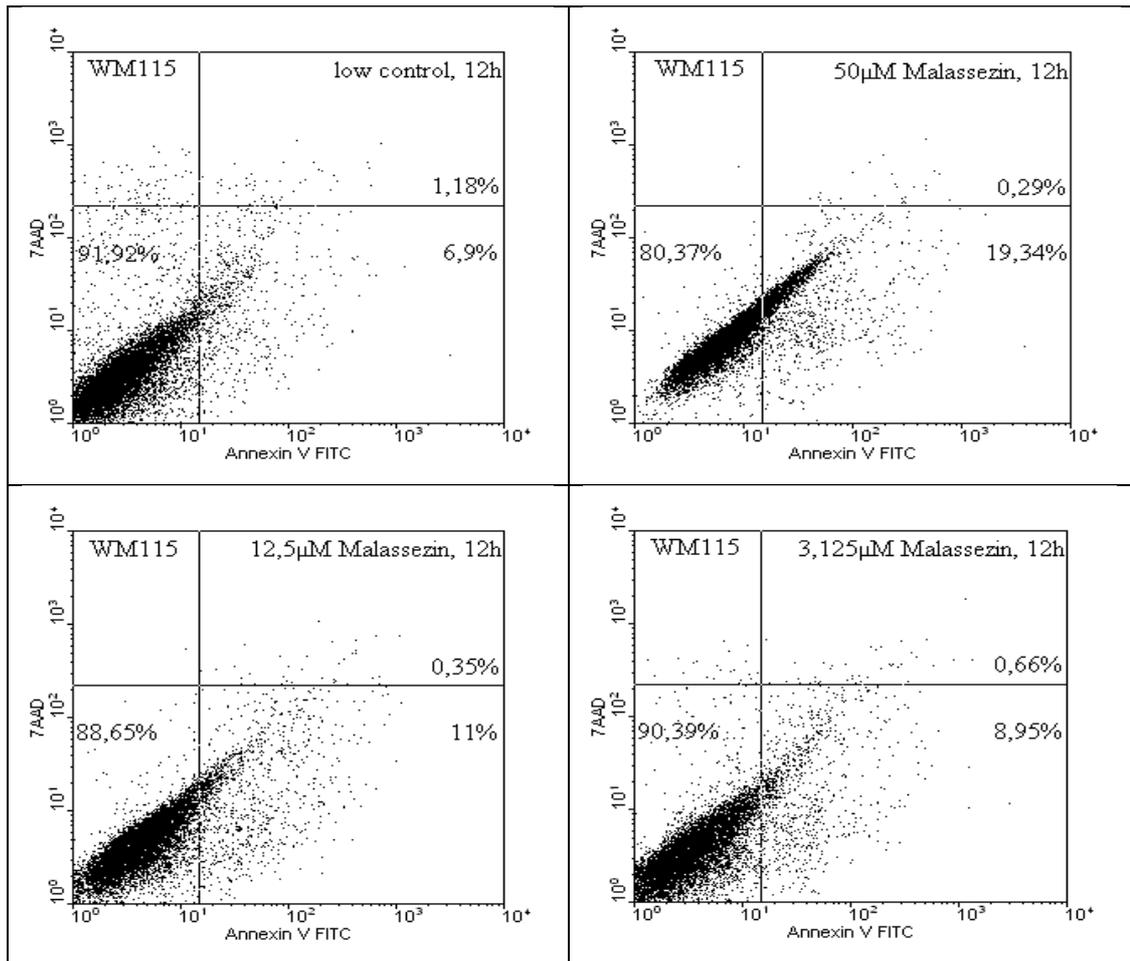


Abbildung 24: Facs Dotplots WM115 12h

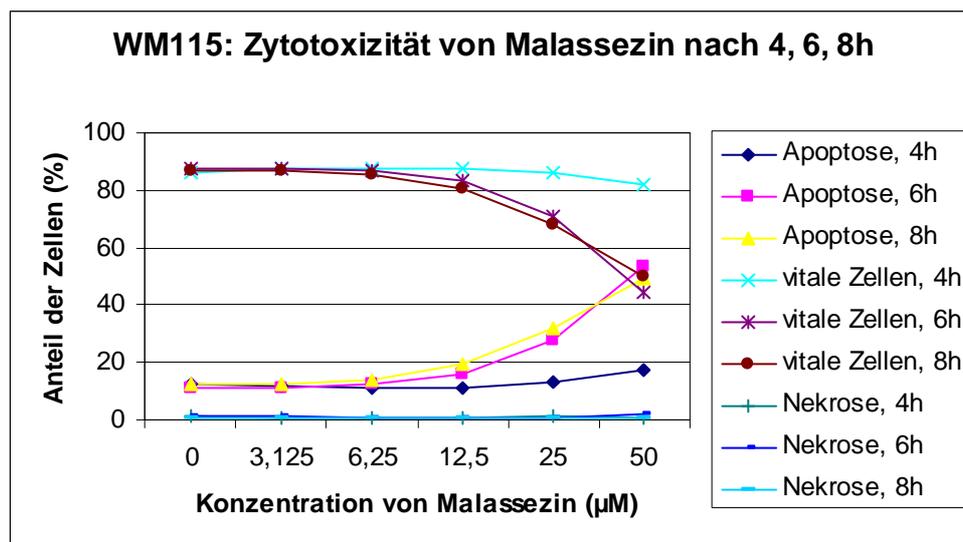


Abbildung 25: WM115 Zytotoxizität von Malassezin nach 4, 6, 8h

(siehe auch Tabelle 56-59 im Anhang)

Im Folgenden sind exemplarisch die Histogramme der o.g. Dotplots der Reihe WM115 dargestellt

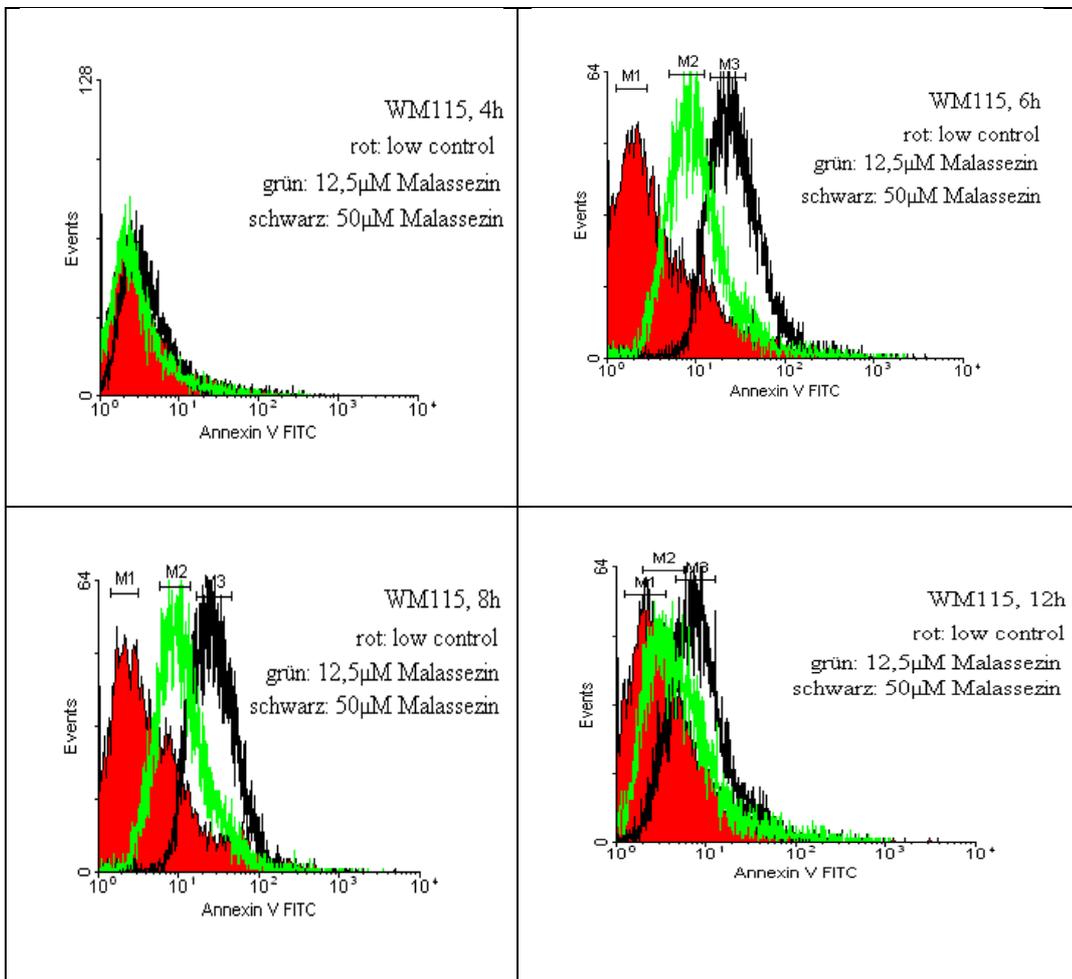


Abbildung 26: Facs Histogramme WM115 4, 6, 8, 12h

5.3.1 Facs-Analytik: Zytotoxizität von α -Naphthoflavin

Die Zellreihen wurden jeweils 4, 6, 8 und 12 Stunden mit α -Naphthoflavin als einzige Substanz, als auch zusammen mit Malassezin inkubiert (n= 1).

In der Facs-Analyse war bei der Zellreihe MeWo zu erkennen, dass die Zellen, die ausschließlich mit α -Naphthoflavin inkubiert wurden, ähnlich der Zellen, die mit Malassezin behandelt wurden, einen Apoptose-Anteil von 20-40% aufweisen. Die vitalen Zellen entsprechend zwischen 60-80% variierten (Abbildung 27). Nach Behandlung der Zellen mit α -Naphthoflavin und Malassezin im Verhältnis 1:1 war schon bei geringen Konzentrationen von $\leq 3,125\mu\text{M}$ ein deutlicher Anstieg der apoptotischen Zellen auf 60-80% zu erkennen, während der Anteil vitaler Zellen

entsprechend auf 20-40% sank (Abbildung 28). In der Konzentrations-Reihe von 503,125 μ M war nur ein mäßig stark ausgeprägter Inkubationszeit-abhängiger Anstieg der Apoptose-Rate zu verzeichnen.

In der Facs-Analyse der Zellreihe WM115 war deutlich, dass die mit α -Naphthoflavin behandelten Zellen einen hohen Anteil vitaler Zellen $\geq 80\%$ aufwiesen (Abbildung 29). Der Apoptose-Anteil hielt sich mit $\leq 20\%$ in Grenzen.

Nach Inkubation der Zellen mit beiden Substanzen ist eine deutliche Abnahme des vitalen Anteils auf 60-70% zu erkennen, während die apoptotischen Zellen bei 30-40% lagen (Abbildung 30). Eine Dosis-Abhängigkeit schien hierbei eher unwahrscheinlich.

Bei beiden Zellreihen lag der Anteil nekrotischer Zellen im unteren und somit im akzeptablen Bereich.

Fazit: Die gleichzeitige Behandlung der Zellkultur mit beiden Substanzen scheint eher zu einer konzentrations-unabhängigen Bahnung der Malassezin-Wirkung zu führen (Abbildung 28). Bei der Zellreihe MeWo war dieser Effekt stärker ausgeprägt. Die Reaktion der Reihe WM115 war schwächer ausgeprägt als unter der alleinigen Behandlung mit Malassezin. Einen aufhebenden Einfluß des α -Naphthoflavin konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 28 und 30).

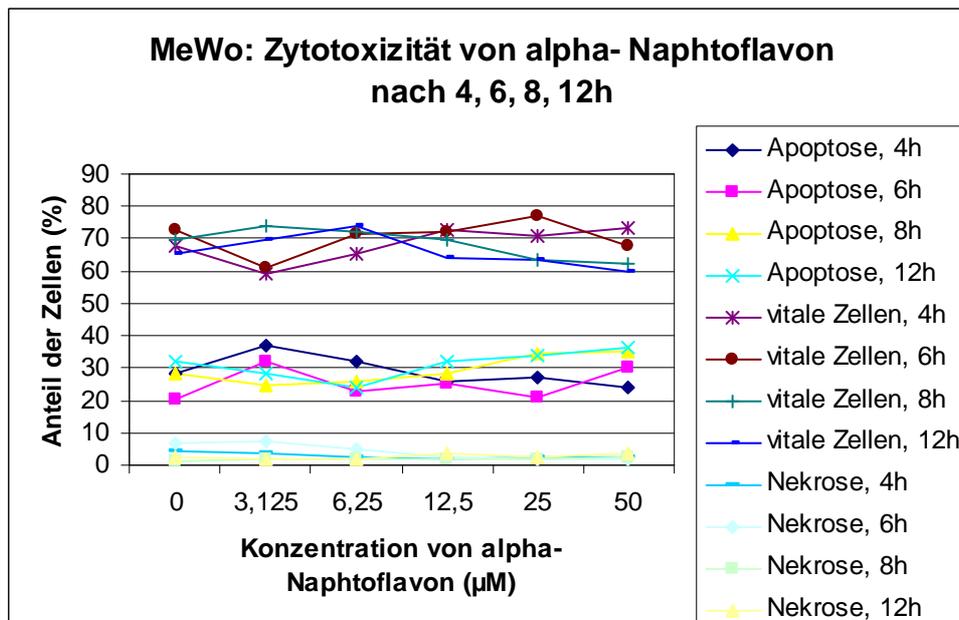


Abbildung 27: MeWo Zytotoxizität von α -Naphthoflavin nach 4, 6, 8, 12h (siehe auch Tabelle 60 im Anhang)

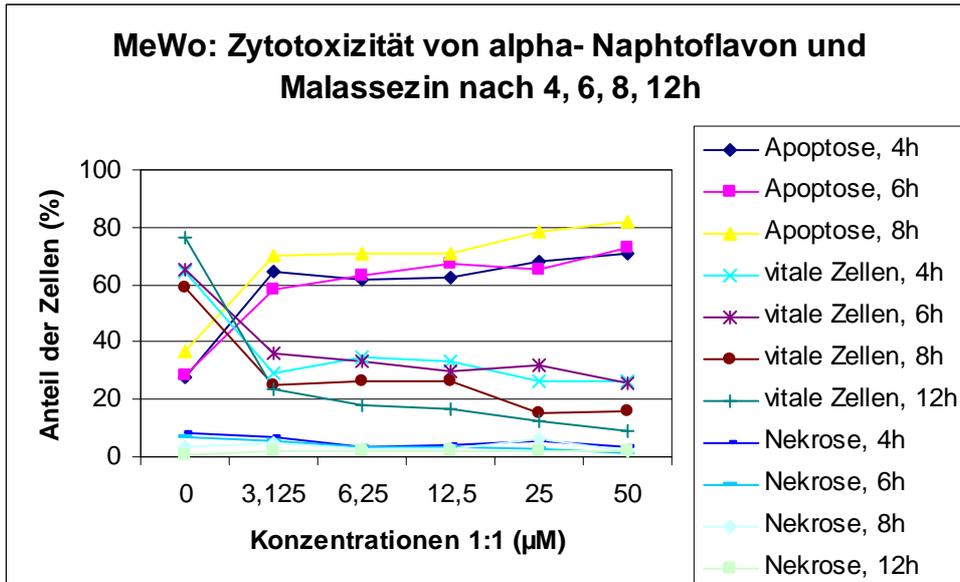


Abbildung 28: MeWo Zytotoxizität von α -Naphtoflavon u. Malassezin n. 4, 6, 8,12h (siehe auch Tabelle 61 im Anhang)

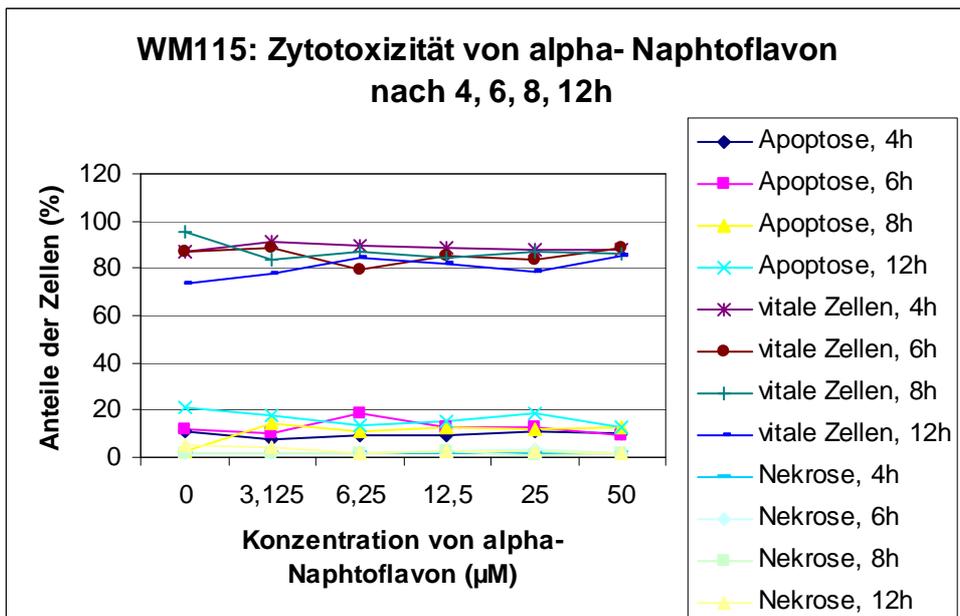


Abbildung 29: WM115 Zytotoxizität von α -Naphtoflavon nach 4, 6, 8, 12h (siehe auch Tabelle 62 im Anhang)

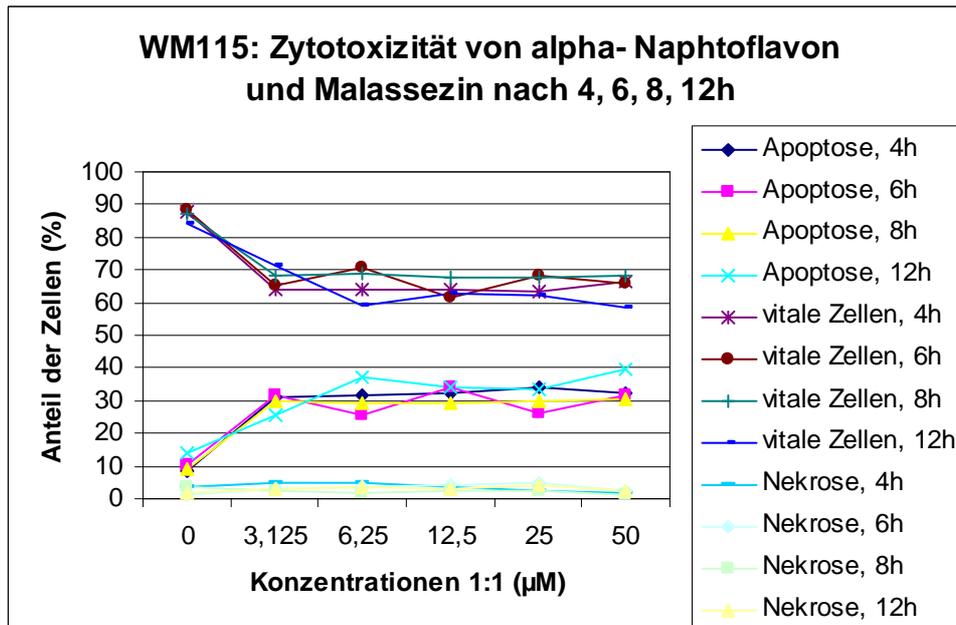


Abbildung 30: WM115 Zytotoxizität von α -Naphtoflavin u. Malassezin n. 4, 6, 8, 12h (siehe auch Tabelle 63 im Anhang)

5.3.2 Facs-Analytik: Zytotoxizität von Staurosporin

Die Zellreihen wurden jeweils 4, 6, 8 Stunden mit Staurosporin inkubiert (n= 1).

Nach Inkubation der Zellreihe MeWo mit Staurosporin war nicht zu erkennen, dass Staurosporin einen Einfluß auf die Zellkultur hat. Die im FacScan erhaltenen Daten variierten zu stark.

Bei der Zellreihe WM115 war bis zu einer Konzentration von 25µM Staurosporin ein ähnliches Verhalten zu beobachten wie bei Kontrollzellen. Es war eine Konstanz im Anteil der vitalen Zellen zu beobachten, der bei $\geq 80\%$ lag. Entsprechend war der Anteil apoptotischer Zellen geringer. Bei 50µM Staurosporin war eine Abnahme vitaler und eine Zunahme apoptotischer Zellen zu erkennen. Der Anteil nekrotischer Zellen war verschwindend gering. Dieser Effekt war jedoch geringer ausgeprägt als unter dem ausschließlichen Einfluß der Zellen mit Malassezin.

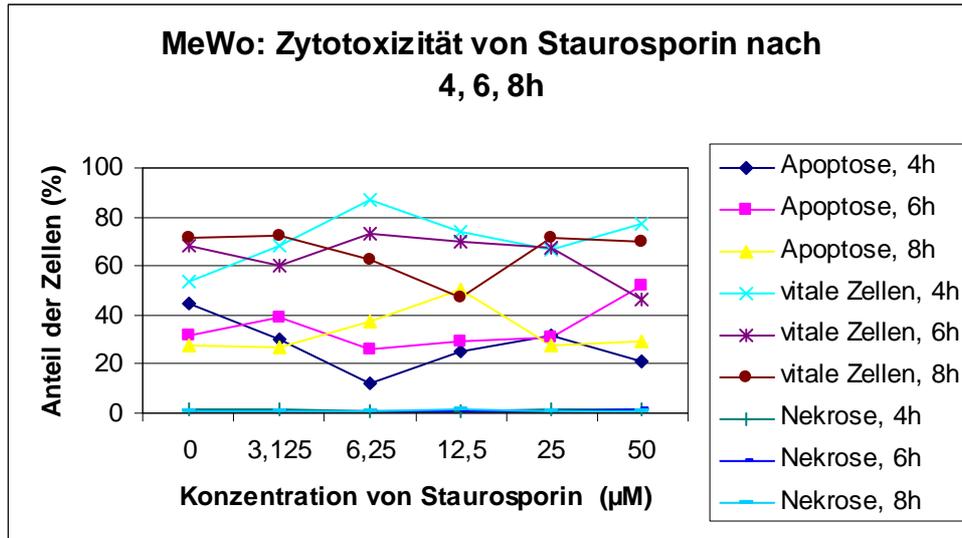


Abbildung 31: MeWo Zytotoxizität Staurosporin nach 4, 6, 8h

(siehe auch Tabelle 64 im Anhang)

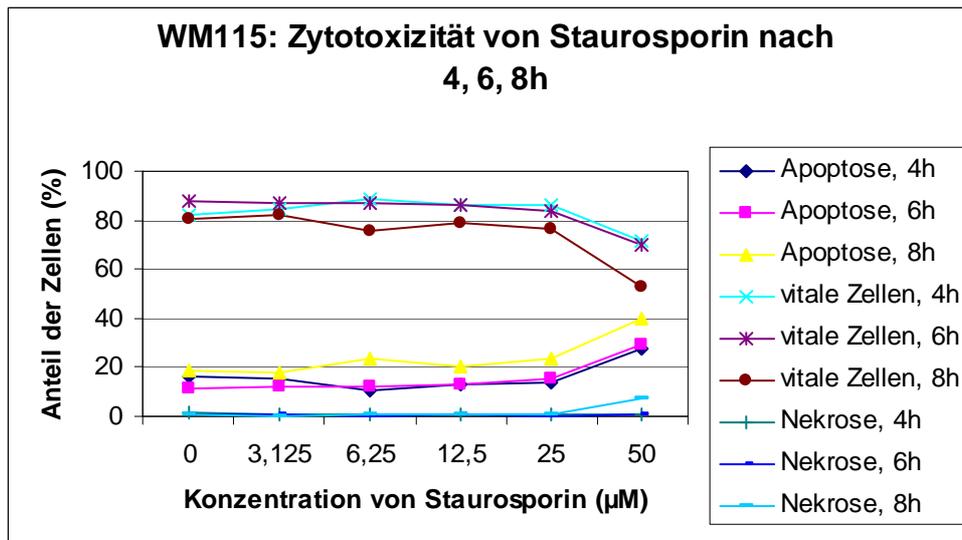


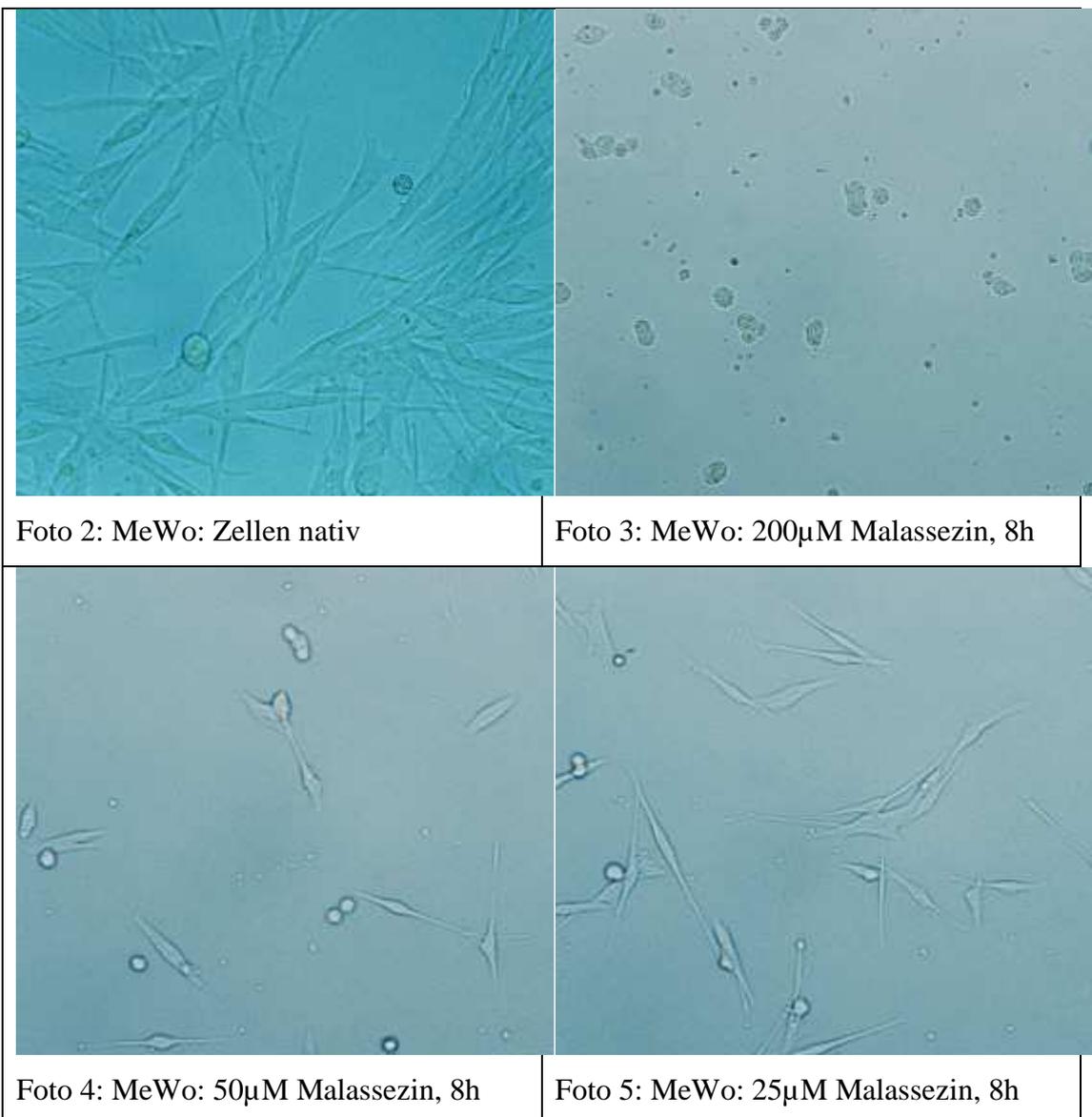
Abbildung 32: WM15 Zytotoxizität Staurosporin nach 4, 6, 8h

(siehe auch Tabelle 65 im Anhang)

5.4 Fotos der Zellkultur

Im Lichtmikroskop wurden bei beiden Zellreihen vollständig abgelöste und zu Kugeln verformte Zellen ab einer Konzentration von $\geq 100\mu\text{M}$ Malassezin unabhängig von der Inkubationszeit gesehen (Foto 3 und 7). Bei Konzentrationen $50\text{-}100\mu\text{M}$ wurden hauptsächlich ab 6h Inkubationszeit sowohl abgelöste als auch adhärenente Zellen beobachtet (Fotos 4 und 8). Die Anzahl adhärenente zu abgelösten Zellen war in etwa gleich. Konzentrationen $< 50\mu\text{M}$ zeigten Inkubationszeit-unabhängig eine vollständige Adhärenz der Zellen (Fotos 5 und 9), so wie sie auch bei den nativen Zellen (Fotos 2 und 6) zu sehen waren bis auf die geringe Anzahl spontan zerfallener Zellen.

Exemplarische Darstellung der Morphologie der Zellkultur



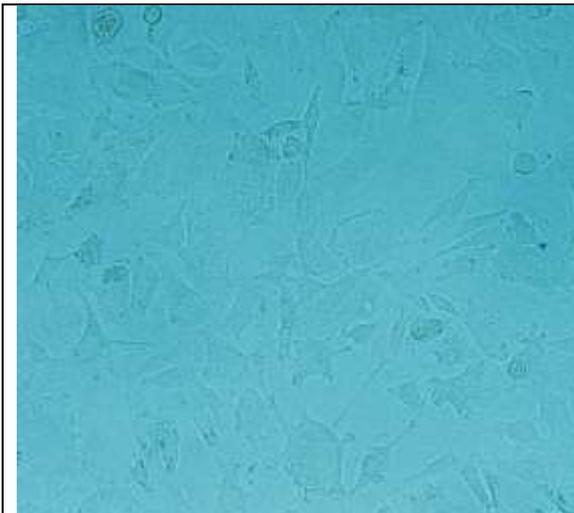


Foto 6: WM115: Zellen nativ

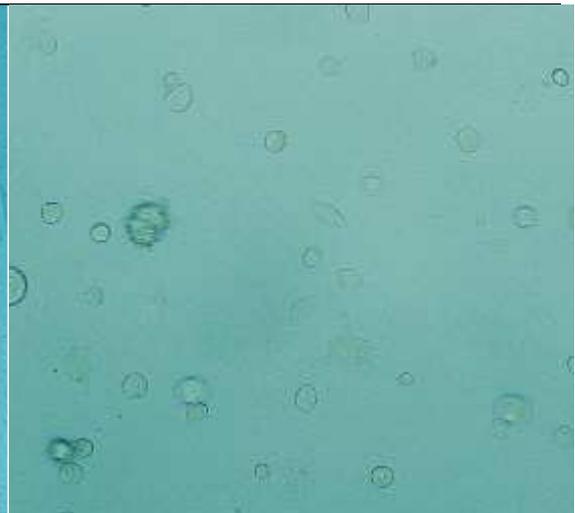


Foto 7: WM115: 100μM Malassezin, 8h

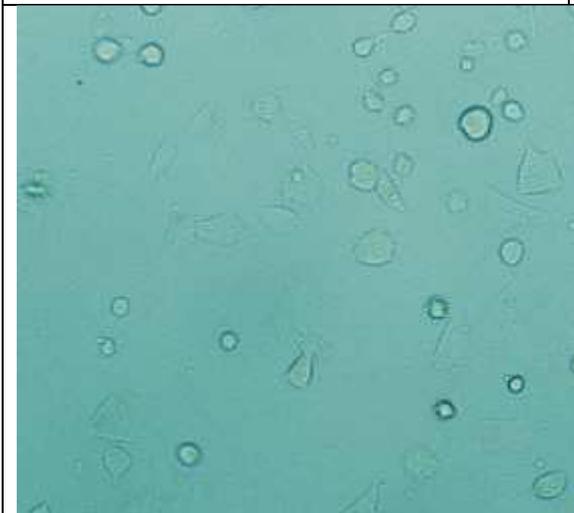


Foto 8: WM115: 50μM Malassezin, 8h

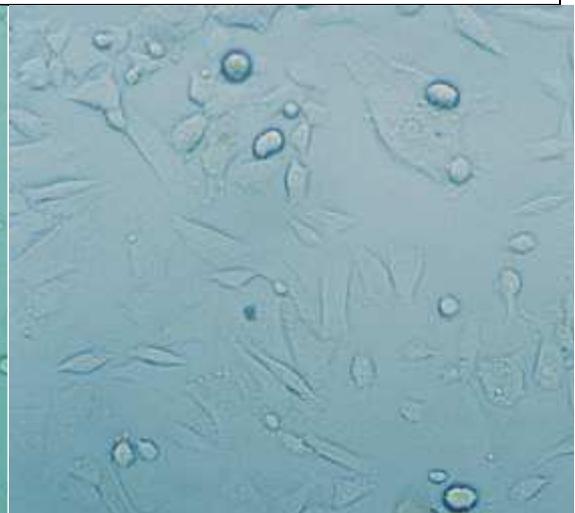
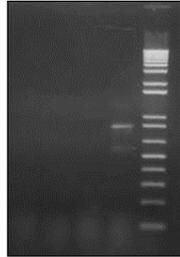


Foto 9: WM115: 12,5μM Malassezin, 8h

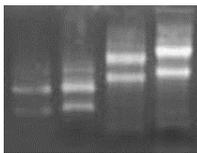
5.5 Molekulargenetische Methoden

5.5.1 Bestimmung der DNase Konzentration in Lösung und Reinheitskontrolle deren RNA



1 2 3 4 5

Foto 10: MeWo gDNA nach DNase-Verdau untersch. Konzentrationen (n=1)



1 2 3 4

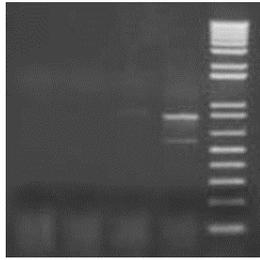
Foto 11: MeWo RNA entsprechend zu Foto 10

1. Kammer: 2fache DNase Konzentration
2. Kammer: 1,5fache DNase Konzentration
3. Kammer: 1fache DNase Konzentration
4. Kammer: ohne DNase
5. Kammer: Standard

Deutlich sichtbar sind vorhandene DNA-Banden ohne DNase-Verdau in Lösung.

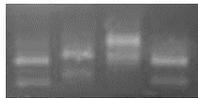
Bei der Zellreihe MeWo wurde der 1,5fache DNase-Verdau gewählt.

Gleich welche Konzentration an DNase verwendet wurde, sind zwei klar abzutrennende reine RNA-Banden im Foto 12 zu erkennen.



1 2 3 4 5

Foto 12: WM115 gDNA nach DNase-Verdau untersch. Konzentrationen



1 2 3 4

Foto 13: WM115 RNA entsprechend zu Foto 12

Kammeraufteilung siehe Foto 10:

Bei 1fachem Verdau ist noch eine schwache Bande sichtbar. Für die Zellreihe WM115 wurde der 2fache DNase-Verdau in Lösung verwendet.

5.5.2 Agarose-Gel-Elektrophorese des PCR-Produktes (Kontrolle auf gDNA)

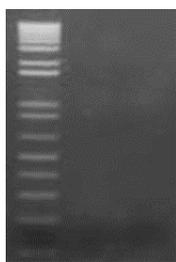


Foto 14: MeWo gDNA

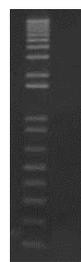


Foto 15: WM115 gDNA

5.5.3 Reinheitskontrolle der RNA

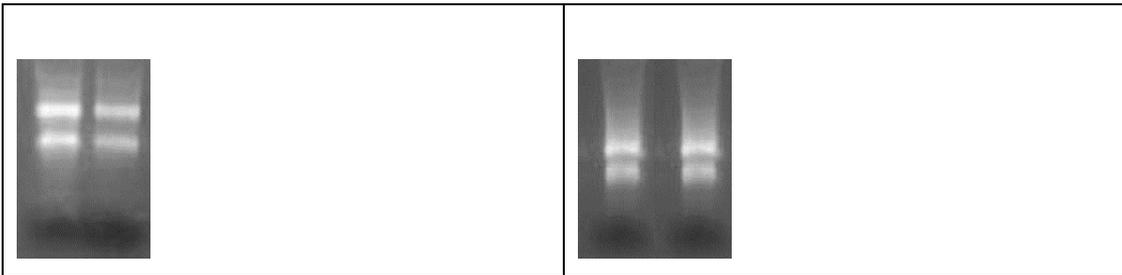


Foto 16: MeWo RNA

Foto 17: WM115 RNA

5.5.4 Ergebnisse der optischen Dichte Messung von RNA und cDNA

In den folgenden 8 Tabellen sind die einzelnen Messwerte, sowie der errechnete Grad der optischen Dichte von RNA und cDNA im Spectrophotometer aufgelistet (siehe auch Kapitel 4.2.5.5). Diese näherungsweise Abschätzung der Reinheit der RNA bzw. cDNA wurde benötigt, da nur mit reinen Produkten für die RT-PCR weitergearbeitet werden durfte.

Tabelle 10: Daten der OD-Messung der RNA zur näherungsweisen Konzentrationsbestimmung, MeWo, 3h, 12,5 μ M

	Kontrolle	Probe 1	Probe 2
A_{260}	0,556	0,73	0,419
A_{280}	0,352	0,567	0,207
$A_{269/280}$	1,911	1,63	2,024
OD_{RNA}	311,36	408,8	234,64
RNA-Gehalt (μ g/25 μ l)	7,784	10,22	5,866

Es sind die Werte dargestellt und der abschließende RNA-Gehalt errechnet worden

Tabelle 11: Daten der OD Messung der RNA, MeWo, 9h, 12,5 μ M

	Kontrolle	Probe 1	Probe 2
A_{260}	1,144	0,651	0,582
A_{280}	0,587	0,318	0,284
$A_{269/280}$	1,998	2,044	2,000
OD_{RNA}	640,64	364,56	325,92
RNA-Gehalt (μ g/25 μ l)	16,016	9,114	8,148

Tabelle 12: Daten der OD Messung der cDNA, MeWo, 3h, 12,5µM

	Kontrolle	Probe 1	Probe 2
A ₂₆₀	0,048	0,036	0,209
A ₂₈₀	0,029	0,025	0,128
A _{260/280}	1,741	1,565	1,651
OD _{cDNA}	240	180	1045
cDNA-Gehalt (µg/µl)	0,24	0,18	1,045

Tabelle 13: Daten der OD Messung der cDNA, MeWo, 9h, 12,5µM

	Kontrolle	Probe 1	Probe 2
A ₂₆₀	0,066	0,079	0,04
A ₂₈₀	0,04	0,045	0,024
A _{260/280}	1,833	1,681	1,538
OD _{cDNA}	330	395	200
cDNA-Gehalt (µg/µl)	0,33	0,395	0,2

Tabelle 14: Daten der OD Messung der RNA, WM115, 9h, 12,5µM

	Kontrolle	Probe 1	Probe 2
A ₂₆₀	0,842	0,553	0,961
A ₂₈₀	0,418	0,263	0,481
A _{260/280}	2,024	2,071	2,023
OD _{RNA}	471,52	309,68	538,16
RNA-Gehalt (µg/25µl)	11,788	7,742	13,454

Tabelle 15: Daten zur OD Messung der RNA, WM115, 9h, 25µM

	Kontrolle	Probe 1	Probe 2
A ₂₆₀	0,383	0,214	0,238
A ₂₈₀	0,184	0,103	0,115
A _{260/280}	2,048	2,078	2,106
OD _{RNA}	214,48	119,84	133,28
RNA-Gehalt (µg/25µl)	5,362	2,996	3,332

Tabelle 16: Daten der OD Messung der cDNA, WM115, 9h, 12,5 μ M

	Kontrolle	Probe 1	Probe 2
A ₂₆₀	0,065	0,263	0,057
A ₂₈₀	0,041	0,163	0,039
A _{260/280}	1,585	1,602	1,583
OD _{cDNA}	325	1315	285
cDNA-Gehalt (μ g/ μ l)	0,325	1,315	0,285

Tabelle 17: Daten der OD Messung der cDNA, WM115, 9h, 25 μ M

	Kontrolle	Probe 1	Probe 2
A ₂₆₀	0,071	0,046	0,046
A ₂₈₀	0,049	0,027	0,026
A _{260/280}	1,448	1,84	1,679
OD _{cDNA}	355	230	230
cDNA-Gehalt (μ g/ μ l)	0,355	0,23	0,23

5.6 Resultate der RT-PCR

5.6.1 RT-PCR-Vorversuche

Die ersten erhaltenen RT-PCR-Ergebnisse gaben einen ersten Anhalt, welche Gene im Apoptose-Verlauf der untersuchten Melanomzellen involviert sind. Sie wurden nicht für die entgültigen Resultate verwendet, da die Kontrollen auf gDNA noch positiv waren, was dazu führte, dass die Schwelle sehr hoch gesetzt werden musste.

Bei den entgültigen Versuchen wurde in Anlehnung an das RT-PCR Array Manual festgelegt, dass ab einem Ct-Wert ≥ 2 ein Gen reguliert wurde. Dies war durch die Aufreinigung möglich. Eine signifikante Regulation fand statt, wenn der p-Wert $\leq 0,005$ und hochsignifikant, wenn der p-Wert $\leq 0,001$ war.

Siehe Tabelle 66 (WM115, Vorversuch 1) und 67 (WM115, Vorversuch 2) für die Resultat der RT-PCR nach $\Delta\Delta$ Ct-Methode.

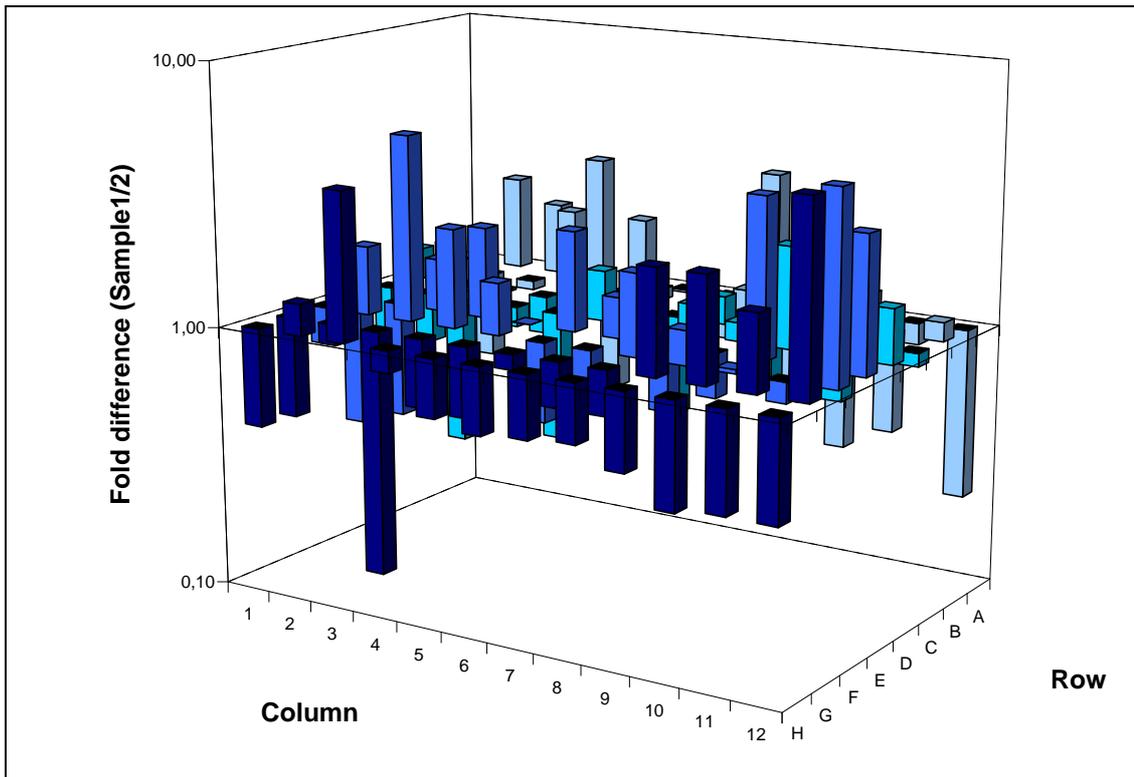
5.6.2 MeWo, 3h Inkubationszeit mit 12,5 μ M Malassezin

Abbildung 33: MeWo 3h, 12,5 μ M Malassezin, Ergebnisse nach der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (siehe auch Tabelle 68 im Anhang)

Hier wird kein Wert auf einzelne Gene, sondern ein Überblick gegeben

Tabelle 18: MeWo 3h, 12,5 μ M, Resultat der RT-PCR nach $\Delta\Delta$ Ct-Methode. Überblick einiger wichtiger regulierter Gene (komplette Tabelle siehe Tabelle 68 im Anhang)

Hochregulierte Gene			Herrunterregulierte Gene		
Gen	Fold change	p-value	Gen	Fold change	p-value
AKT1	2,29	0,0005	BCL2A1	-4,42	0,0001
BAD	3	0,0045	BCL2L10	-2,13	0,6067
BAK 1	3,19	0,0405	BCLAF1	-2,37	0,9025
BCL2L2	2,01	0,0186	BIRC1	-2,09	0,6501
CD40	2,40	0,0206	BIRC2	-2,92	0,3679
DAPK1	2,21	0,0087	BIRC3	-2,37	0,9857
FADD	2,39	0,0043	BIRC 8	-4,37	0,5686
HRK	3,98	0	BRAF	-2,38	0,9235
IGF1R	2,11	0,0044	CASP 5	-3,10	0,6299
LTA	3,24	N/A	CIDEA	-3,18	0,8153
NOL 3	5,10	0,0049	CIDEB	-2,76	0,1527
PYCARD	2,38	0,0326	TNF	-2,01	0,7145
TNFRSF10B	2,04	0,0152	TNFRSF7	-2,43	0,7589
TNFRSF 25	5,10	0,0185	TNFSF 10	-8,79	0,0566
TRADD	2,48	0,0128			
TRAF2	2,49	0,0028			
TRAF 4	5,14	0,0115			
RPL13A	3,68	0,0114			

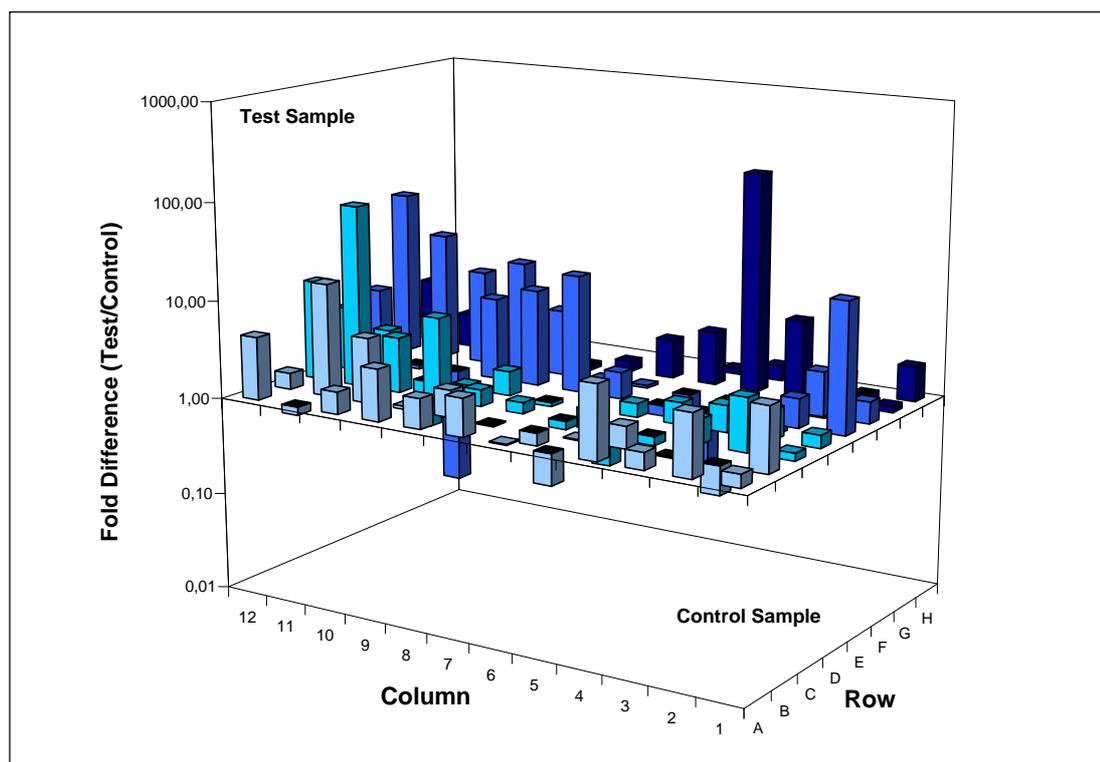
5.6.3 MeWo, 9h Inkubationszeit mit 12,5 μ M Malassezin

Abbildung 34: MeWo 9h, 12,5 μ M Malassezin, Ergebnisse nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode (siehe auch Tabelle 69 im Anhang)

Tabelle 19: MeWo 9h, 12,5 μ M, Resultat der RT-PCR nach $\Delta\Delta$ Ct-Methode
Überblick einiger wichtiger regulierter Gene (komplette Tabelle siehe Tabelle 69 im Anhang)

Hochregulierte Gene			Herrunterregulierte Gene		
Gen	Fold change	p-value	Gen	Fold change	p-value
AKT 1	4,21	0,004	BAG1	-2,07	0,0036
BAD	5,56	0,0029	BNIP 3	-2,35	0,1615
BAG 4	2,44	0,0050	CD 40	-3,00	0,4734
BAK1	2,04	0,0403	DAPK 1	-3,98	0,1568
BAX	3,39	0,0238	HRK	-14,64	0,2823
BCL 2A1	4,41	0,0106	RPL 13A	-2,11	0,2540
BCL 2L1	4,45	0,0186			

BIRC 2	4,62	0,0849			
BIRC 3	14,28	0,0395			
BIRC 8	3,43	0,0761			
CARD 6	6,87	0,0764			
CARD 8	3,69	0,1193			
CASP 1	72,72	0,0190			
CASP 10	10,47	0,0048			
CD40LG	2,99	0,1542			
CFLAR	4,43	0,0350			
CIDEA	21,04	0,0042			
FAS	15,77	0,0269			
FASLG	9,64	0,0333			
GADD45A	6,84	0,0352			
LTA	5,57	0,0692			
MCL1	2,83	0,1568			
TNFRSF10B	4,72	0,0366			
TNFRSF11B	13,12	0,0499			
TNFRSF1A	9,18	0,0455			
TNFRSF21	20,02	0,0399			
TNFRSF25	48,73	0,0164			
TNFRSF9	2,06	0,0129			
TNFSF10	6,23	0,0952			
CD70	171,92	0,0127			
TNFSF8	3,52	0,0532			
TP53	2,50	0,0590			
TRAF3	2,23	0,021			
TRAF4	4,51	0,0928			
B2M	2,27	0,0580			

In der Übersichtsgraphik der MeWo Reihe ist zu erkennen, daß einige Gene reguliert werden. Hierzu zählen insbesondere proapoptische Mitglieder der Bcl-2-Familie, sowie nach 9h die IAP's (Inhibitors of apoptosis proteins). Die Caspasen werden

kaum einer Regulation unterworfen. Weiter werden TNF-Rezeptoren, Liganden und deren Adaptermoleküle aktiviert.

5.6.4 WM115, 9h Inkubationszeit mit 12,5 μ M Malassezin

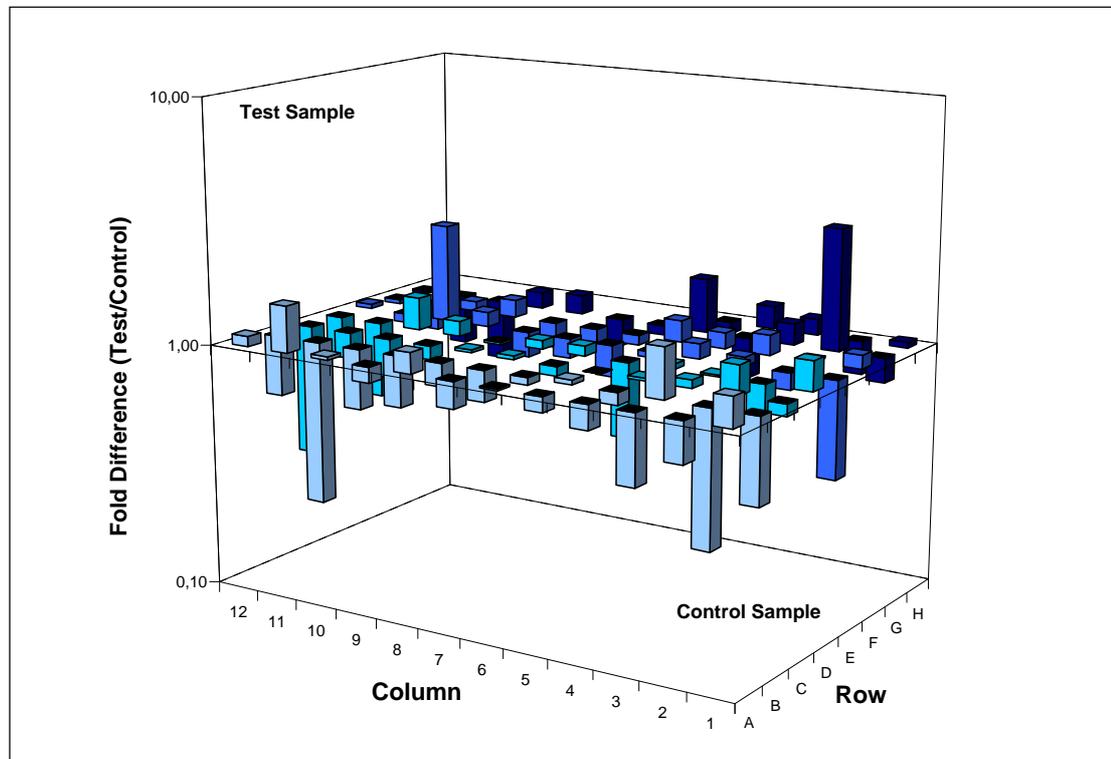


Abbildung 35: WM115 9h, 12,5 μ M Malassezin, Ergebnisse nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode (siehe auch Tabelle 70 im Anhang)

Tabelle 20: WM115 9h, 12,5 μ M, Resultat der RT-PCR nach $\Delta\Delta$ Ct-Methode

Überblick einiger wichtiger regulierter Gene (komplette Tabelle siehe Tabelle 70)

Hochregulierte Gene			Herrunterregulierte Gene		
Gen	Fold change	p-value	Gen	Fold change	p-value
HRK	2,50	0,0404	BCL 2L1	-2,21	0,1024
TNFRSF9	3,13	0,0485	BCL 2L10	-3,56	0,2486
			BIRC 3	-4,68	0,0051
			CASP 10	-3,45	0,0122
			CASP 5	-2,03	0,3113
			CD40LG	-2,04	0,0002
			CIDEA	-2,49	0,0035

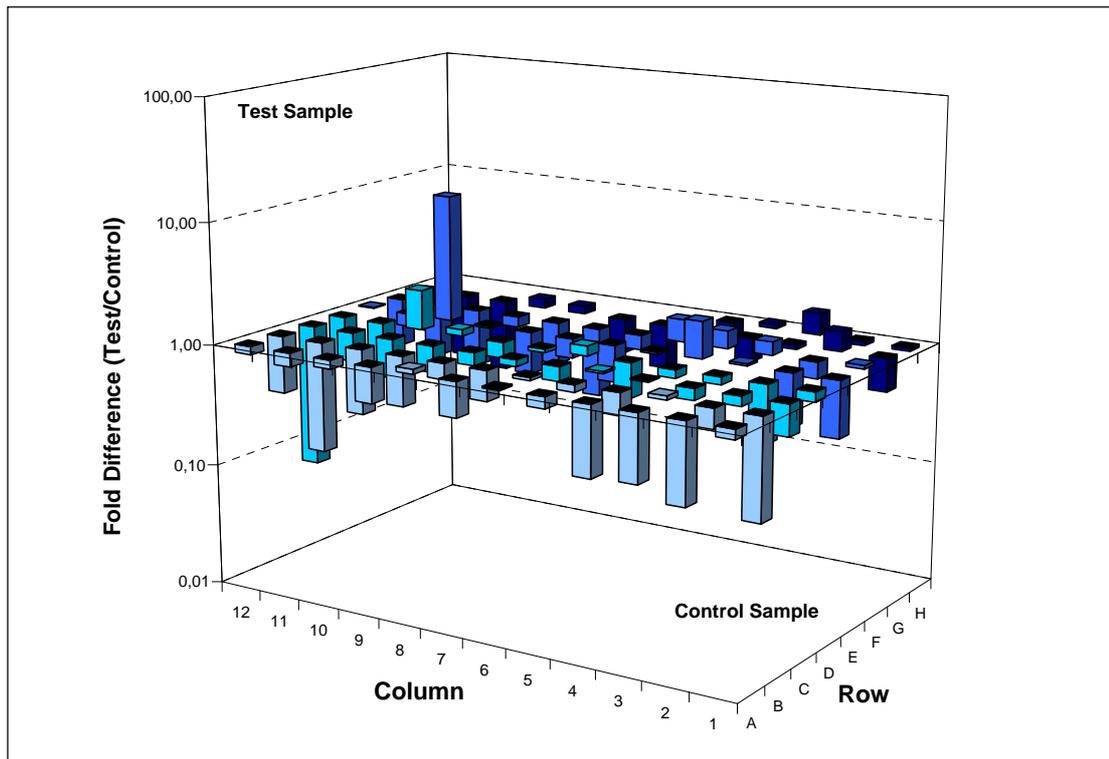
5.6.5 WM115, 9h Inkubationszeit mit 25 μ M Malassezin

Abbildung 36: WM115 9h, 25 μ M Malassezin, Ergebnisse nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode (siehe auch Tabelle 71 im Anhang)

Tabelle 21: WM115 9h, 25 μ M, Resultat der RT-PCR nach $\Delta\Delta$ Ct-Methode
Überblick einiger wichtiger regulierter Gene (komplette Tabelle siehe Tabelle 71 im Anhang)

Hochregulierte Gene			Herrunterregulierte Gene		
Gen	Fold change	p-value	Gen	Fold change	p-value
CD40	2,13	0,6172	AKT1	-4,48	0,2499
DAPK1	2,02	0,1042	APAF1	-3,53	0,0281
HRK	11,08	0,1524	BAD	-3,72	0,3123
			BCL2L1	-6,49	0,1011
			NAIP	-2,58	0,0128
			BIRC2	-3,43	0,0005
			BIRC3	-8,1	0,0007

			BIRC4	-2,98	0,0102
			CARD8	-2,1	0,0300
			CASP10	-14,77	0,0093
			CASP2	-2,95	0,1274
			CD40LG	-2,49	0,0087
			CFLAR	-2,20	0,0667
			CIDEA	-2,91	0,0014
			FADD	-2,01	0,5595
			FASLG	-2,22	0,0201
			TNFRSF10A	-3,67	0,2181
			TNFRSF10B	-2,23	0,1088
			TNFRSF1A	-2,93	0,1533
			TNFRSF21	-2,71	0,0002
			TNFRSF25	-2,51	0,3736
			TP53	-2,28	0,1280
			TRAF2	-3,88	0,1929
			TRAF3	-3,31	0,0668
			TRAF4	-2,3	0,0901

Bei der Zellreihe WM115 werden im Vergleich zur MeWo Reihe deutlich weniger Gene reguliert. Ebenfalls wird das HRK als proapoptotische Bcl-2-Mitglied. Jedoch zeigt sich keine signifikante Regulation von Todes-Promotoren. Jedoch kommt es zu einer Herunterregulation der IAP's.

5.7 Einfluß des verwendeten Lösungsmittels DMSO auf die Parameter

Da DMSO möglicherweise ein mebrangängiges Lösungsmittel ist, wurde dessen Einfluß auf die Zellkultur überprüft.

5.7.1 LDH, DMSO-Kontrolle

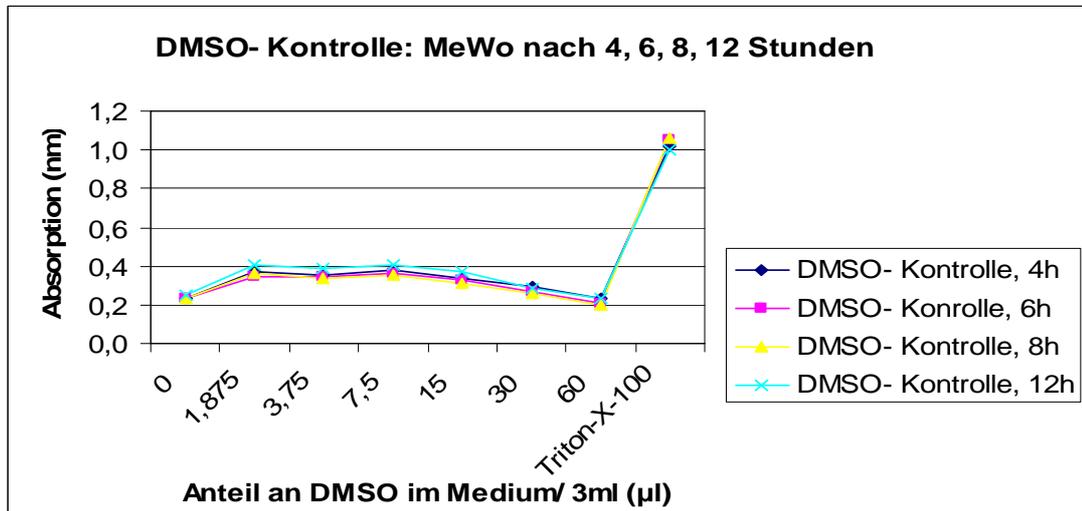


Abbildung 37: LDH: MeWo DMSO-Kontrolle nach 4, 6, 8, 12h

(siehe auch Tabelle 72-75 im Anhang)

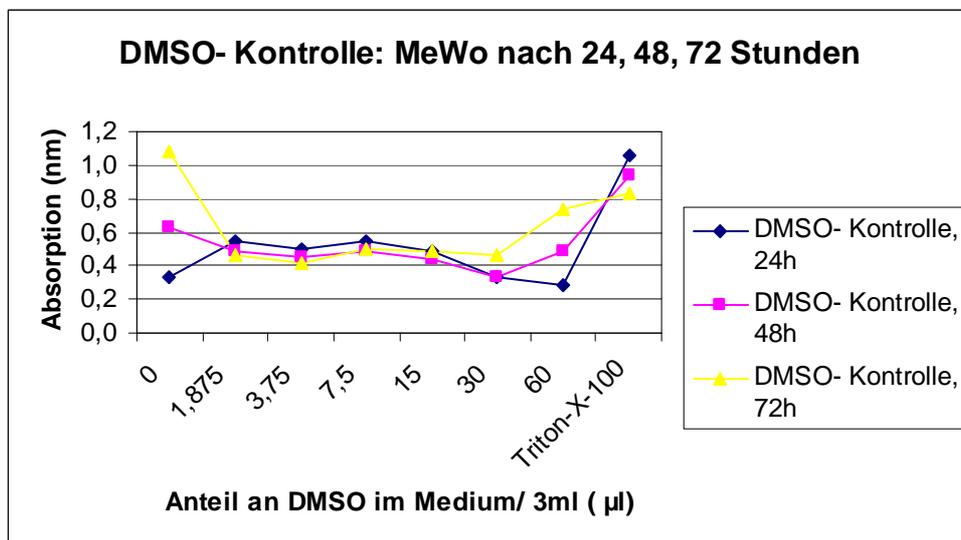


Abbildung 38: LDH: MeWo DMSO-Kontrolle nach 24, 48, 72h

(siehe auch Tabelle 76-78 im Anhang)

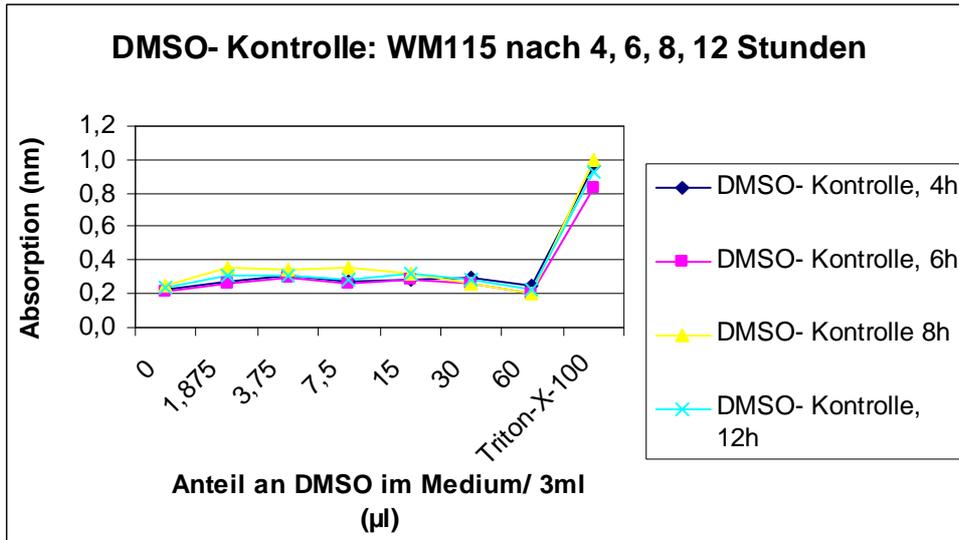


Abbildung 39: LDH: WM115 DMSO-Kontrolle nach 4, 6, 8, 12h
(siehe auch Tabelle 79-82 im Anhang)

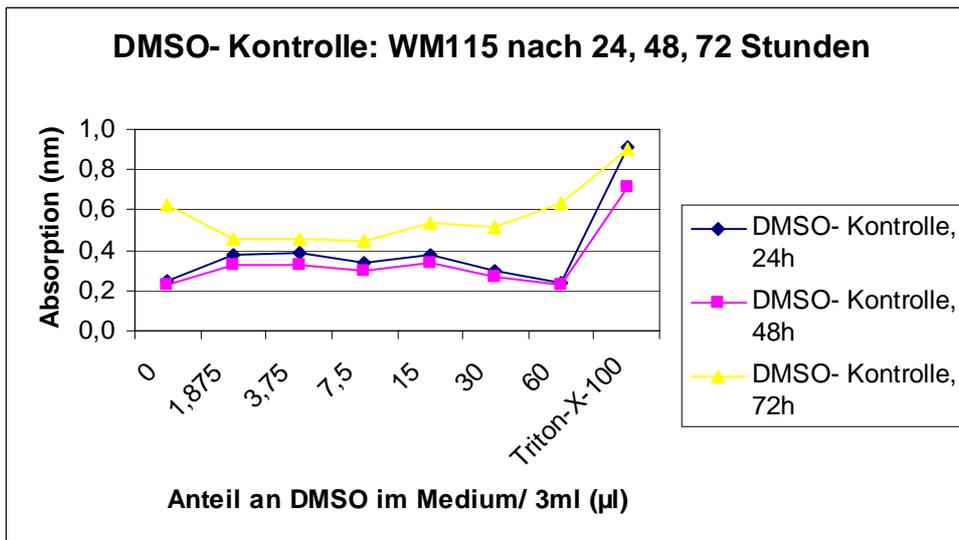


Abbildung 40: LDH: WM115 DMSO-Kontrolle nach 24, 48, 72h
(siehe auch Tabelle 83-85 im Anhang)

5.7.2 Facs, DMSO-Kontrolle

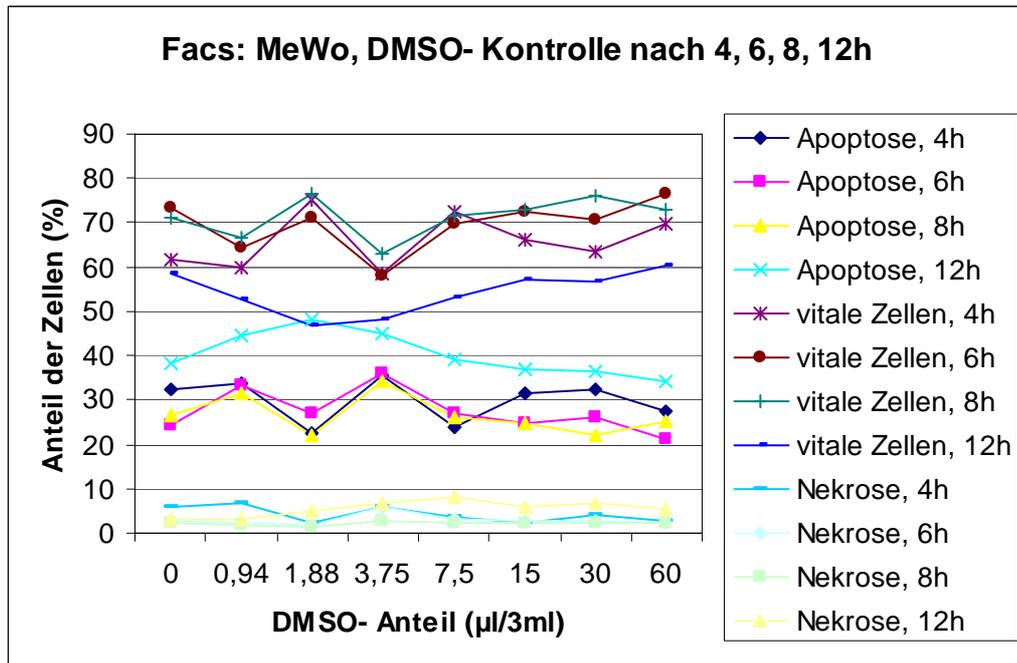


Abbildung 41: Facs MeWo DMSO-Kontrolle nach 4, 6, 8, 12h

(siehe auch Tabelle 86-89 im Anhang)

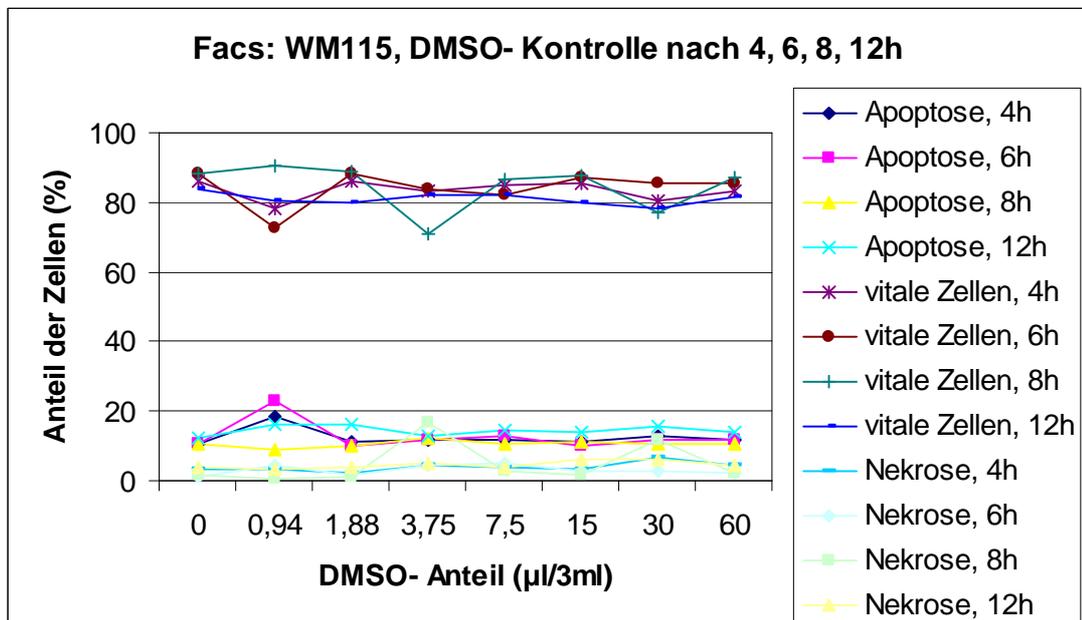


Abbildung 42: Facs WM115 DMSO-Kontrolle nach 4, 6, 8, 12h

(siehe auch Tabelle 90-93 im Anhang)

Fazit: ein Einfluß des Lösungsmittels DMSO auf die Zellkultur ist nicht anzunehmen. Die geringen Schwankungen sind auf das nicht beeinflussbare Wachstum der Zellkultur per se zu erklären. Die Zellen, die ausschließlich mit DMSO behandelt wurden, bewegen sich im erwarteten Bereich entsprechend den Anteilen an nekrotischen, apoptotischen und vitalen Zellen der Kontrollzellen. Ebenso sind ansteigende LDH-Werte auf einen Verbrauch des Mediums zurückzuführen und nicht auf eine toxische Wirkung des DMSO.

Auf eine Kontrolle mit DMSO wurde beim kostenaufwendigen PCR-Array verzichtet.

6. Diskussion

Das maligne Melanom ist ein in seinem Vorkommen mit steigender Tendenz zu beobachtender Tumor, der hauptsächlich in der weißen Bevölkerung auftritt. Der derzeit diskutierte Klimawandel mit einer auf Dauer vermehrten Sonneneinstrahlung in Mitteleuropa bei nicht adäquatem Schutz wird die Zahl an Melanompatienten vermutlich noch steigen lassen. Problematisch wird die Behandlung des malignen Melanoms, wenn ein Stadium der Fernmetastasierung (St. IV) erreicht ist. Dann sind vornehmlich nur noch palliative Therapieansätze möglich.

Malassezin, ein Indolderivat, das als Bestandteil des von Mayser et al. neu entdeckten Tryptophan-Stoffwechselweges in *Malassezia furfur* isoliert und synthetisiert wurde (59), ist in der Lage in primären humanen Melanozyten Apoptose auszulösen (44).

In der vorliegenden Arbeit sollte erstmals untersucht werden, ob das Indolderivat Malassezin ebenfalls einen Einfluss auf die beiden Melanomzellreihen MeWo und WM115 hat.

Da die Substanz chemisch-synthetisch zugänglich war (96) und somit in größeren Mengen verfügbar, konnte sie für Zellkulturexperimente eingesetzt werden. An biologischen Eigenschaften war bekannt, dass es das Cytochrom P450 System in Hepatozyten von Ratten induziert (61) und Eigenschaften eines AH-Rezeptor besitzt. Malassezin hat einen apoptotischen Einfluß auf kultivierte Melanozyten.

Nach Inkubation der Zellen mit den verschiedenen Konzentrationen an Malassezin konnten lichtmikroskopisch eindeutige Veränderung beobachtet werden. In der einmalig untersuchten höchsten Konzentration von 100µM waren hauptsächlich völlig abgerundete, inadhärente Zellen zu erkennen. Bei allen niedrigeren Konzentrationen nahm die Zellkultur ihre natürliche, eher dentritische Form an, die Adhärenz der Zellen blieb erhalten.

Lichtmikroskopisch ist, trotz erkennbarer morphologischer Veränderungen, keine Aussage zu treffen, um was für eine Art von Veränderungen es sich handelt. Ebenso diente der begleitende LDH-Test lediglich dem Nachweis, dass das Malassezin keinen toxischen Einfluß auf die kultivierten Zellen hat, und es sich somit zumindest nicht um Nekrose-spezifische Veränderungen handelte, bei denen üblicher Weise die LDH deutlich ansteigt.

Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit mehrere unterschiedliche apoptosespezifische Nachweismethoden durchgeführt.

Zu den apoptosespezifischen Methoden gehört die Analyse mittels Durchflußzytometer. Den Zellen werden nach spezieller Aufarbeitung zwei Fluoreszenzfarbstoffe zugegeben. Annexin V FITC reichert sich in denjenigen Zellen an, die den apoptotischen Stoffwechselweg eingeschlagen haben, während die mit 7-AAD angereicherten Zellen kennzeichnend für Nekrose sind. Im Facs können die entsprechend markierten Zellen unterschieden werden.

Die Apoptose wurde nicht nur bestätigt, sondern auch als dosisabhängige Reaktion charakterisiert. Steigende Malassezin Konzentrationen führten zur verstärkten Ausbildung apoptotischer Veränderungen. Die Zellreihen unterschieden sich hier bereits deutlich voneinander.

Bisher liegen nur wenige Daten über Apoptose-Induktion mit unterschiedlichen Substanzen bei den hier getesteten Melanomzellreihen vor. Jiang et al. konnte 2008 eine Apoptose-spezifische Veränderungen mittels Facs durch Cycloheximid nachweisen. Jedoch handelte es sich hierbei um eine murine und nicht um eine humane Melanomzellreihe (35).

Bei der Zellreihe MeWo tritt bereits eine deutliche Apoptose bei Malassezin-Konzentrationen zwischen 12,5-25µM auf. Neben dieser Konzentrationsabhängigkeit war eine Abhängigkeit von der Inkubationszeit erkennbar, die bereits nach 4 Stunden sichtbar war und nach 8 Stunden ihr Maximum aufwies. Im Vergleich hierzu betrug bei Jiang et al. die Einwirkungszeiten des Cycloheximids 12, 24 und 48h. Sollte Apoptose induziert werden, muß bei diesen Zeitpunkten bereits definitiv eine Apoptose abgelaufen sein im Gegensatz zu der hier verwendeten Versuchsanordnung. Hier wurde die Apoptose bereits nach 4h, also in einem frühen Stadium erfaßt.

2008 zeigte Montgomery et. al., daß der endotheliale Rezeptor B Antagonist ebenso wie bei den hier vorliegenden Daten zeit- und dosisabhängig Apoptose auslösen und das Zellwachstum deutlich reduzieren kann (46, 62). Hierbei handelte es sich mit A375 um eine humane Melanomzellreihe epithelialen Ursprungs (46), die vergleichbar mit der verwendeten Reihe WM115 ist.

Auch hier zeichnete sich eine Dosisabhängigkeit ab, die bei 12,5 μ M moderat war. Bei 50 μ M waren die Anteile vitaler und apoptotischer Zellen nahezu identisch. Trotz der geringer ausgeprägten Wirkung von Malassezin war bei WM115 ebenso eine Abhängigkeit von der Inkubationszeit deutlich. Nach 4 Stunden waren nur minimale Veränderungen erkennbar, während die Veränderungen nach 6 und 8 Stunden sich in etwa die Waage hielten. Wiederum ist anzumerken, daß die Einwirkungszeiten, bei denen Montgomery Apoptose nachgewiesen hat, bereits 9 (bzw. 24 und 72) Stunden betragen.

Weshalb bei beiden Zellreihen nach 12 Stunden nur eine geringe Wirkung festzustellen war, blieb bis zuletzt ungeklärt. Der Apoptose-Vorgang ist ein Einbahnstraßenweg. Zwar kann er nur gering ausgeprägt sein oder nicht vollständig ablaufen. Aber eine Reversibilität nach evtl. Nachlassen der Malassezin-Wirkung ist bisher unbekannt.

Die Facs-Analytik mit der Inkubation von α -Naphtoflavon und Malassezin ergab, dass insbesondere bei MeWo bereits bei niedrigen Konzentrationen von 3,125 μ M im Verhältnis 1:1 ein starker Anstieg apoptotischer Zellen zu sehen war, während die Zahl vitaler Zellen entsprechend abnahm. Dieser beobachtete Effekt ist nahezu Inkubationszeit-unabhängig.

Bei der Zellreihe WM115 war ein ähnlicher Effekt sichtbar, dieser war jedoch nicht so stark ausgeprägt.

Demgegenüber verhielten sich ausschließlich mit α -Naphtoflavon behandelte Kulturen beider Zellreihen wie der Leerwert ohne jegliche Zugabe von Substanz.

Obwohl α -Naphtoflavon als AHR-Partial-Antagonist eher vermuten ließ, dass es zu einer Abschwächung oder Aufhebung der Malassezin-Wirkung durch Konformationsänderung am Rezeptor (27) führt, scheint α -Naphtoflavon eher einen bahnenden Einfluß für das Malassezin in diesen beiden Zellreihen zu haben.

Ebenso wurde eine Wirkung von Staurosporin als bekannter Apoptose-Initiator in Verbindung mit Malassezin getestet.

Nach Inkubation der Zellreihe MeWo mit Staurosporin war kein Einfluß auf die Zellkultur erkennbar, weil die im FacScan erhaltenen Daten zu stark variierten.

Bei der Zellreihe WM115 war bis zu einer Konzentration von 25µM Staurosporin ein ähnliches Verhalten zu beobachten wie bei den Kontrollzellen. Es war eine Konstanz im Anteil der vitalen Zellen zu beobachten. Entsprechend war der Anteil apoptotischer Zellen geringer. Bei 50µM Staurosporin war eine Abnahme vitaler und eine Zunahme apoptotischer Zellen zu erkennen. Dieser Effekt war jedoch geringer ausgeprägt als unter dem ausschließlichen Einfluß von Malassezin.

Da es sich bei Staurosporin ebenfalls um einen AH Rezeptor Agonist handelt, liegt die Vermutung nahe, dass die Inkubation beider Substanzen zu einer Verstärkung bzw. Potenzierung der apoptotischen Wirkung führt. Dies konnte jedoch nicht bestätigt werden. Im Gegenteil die Behandlung der Zellen mit beiden Substanzen zusammen führt zu einer Abschwächung deren apoptotischer Wirkung.

Bei der Zellreihe MeWo ist deutlich, dass bereits nach 3h bei einer Konzentration von lediglich 12,5µM Malassezin Apoptose-spezifische Gene herunterreguliert werden, deren Intensität nach 9h bei gleicher Menge an Malassezin nur noch verstärkt wird. Weshalb manche Gene, die nach 3h herunterreguliert wurden, nach 9h keine Veränderungen zeigen bzw. hochreguliert wurden, ist fraglich. Zu beachten ist, dass diese Gene jedoch nach 3h keiner signifikanten Veränderung unterlagen. Für die Tatsache, dass in der Zellreihe MeWo (jeweils 12,5µM, Messungen nach 3 und 9h) Apoptose induziert wird, spricht, dass bereits nach 3h das proapoptotische Mitglied der Bcl-2-Familie BAD signifikant hochreguliert wird. Die Aktivität von BAD kann durch AKT reguliert werden, was hier wahrscheinlich ist. Neben BAD ist auch BAK1 hochreguliert. BAX und BAK sind weiter entfernte Mitglieder der Bcl-2-Familie, die dafür bekannt sind, dass sie unter Streß-Konditionen die Apoptose verstärken (83).

Ein weiteres pro-apoptotische Molekül der Bcl-2-Familie, das Apoptose auslösen bzw. verstärken kann und hier reguliert wurde, ist das sog. HRK Gen (45, 52). HRK interagiert mit den Todes-Repressoren Bcl-2 und Bcl-X_L, aber nicht mit den Todes-Promotoren BAX und BAK. Die Expression von HRK induziert einen beschleunigten Zelltod, der durch Bcl-2 und Bcl-X_L unterdrückt wird. Signifikante

Co-Expression von Bcl-2 und Bcl-X_L verhindern die Todes-unterstützende Aktivität von HRK (33). Bei den vorliegenden Untersuchungen ist deutlich, dass HRK nach 3h signifikant hochreguliert wurde, während keines der beiden HRK-Gegenspieler Bcl-2 und Bcl-X_L signifikanten Veränderungen unterlagen. Jedoch ist nach 9h eine nicht- signifikante Down-Regulation von HRK stattdessen aber eine Up-Regulation des Todes-Promotors BAX zu erkennen. Gleichzeitig ist eine signifikante Up-Regulation des Bcl-X_L- Mitgliedes, Bcl-2-L1 zu verzeichnen. Dies könnte dafür sprechen, dass nach 3h die Zeichen ganz eindeutig auf Apoptose ausgerichtet sind und im weiteren Verlauf die Gegenmaßnahmen greifen, jedoch keinen klaren Erfolg verbuchen können. Obwohl HRK keiner signifikanten Veränderung mehr unterliegt, springt ein weiterer Apoptose-Promoter an. Im Gegensatz zu anderen Onkogenen besteht die Funktion von Bcl-2 nicht darin, die Proliferation zu stimulieren, sondern Zellen vor Apoptose zu schützen (18, 88). Pro-apoptotische und anti-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Protein Familie können interagieren (38). Derzeit ist aber nicht bekannt, ob diese Interaktion in Form von Dimeren oder als Teil eines Molekül-Konglomerats stattfindet (83). Experimente sicherten den Beweis, dass pro-apoptotische Mitglieder der Bcl-2 Familie als Tumorsuppressor agieren können. Es ist bekannt, daß chemotherapeutische Medikamente und Bestrahlung Apoptose in Tumorzellen induzieren können (40, 94). Onkogene und Tumor-Suppressorgene, die den Zelltod regulieren, beeinflussen die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Therapien gegen Krebs. Die Überexpression von Bcl-2 und seiner Homologe, die für das Überleben der Zelle stehen, oder die Inaktivierung von BAX, liefern nicht nur einen kurzzeitigen Schutz gegenüber Apoptose, sondern können signifikant das Langzeit-Überleben verbessern (60, 82). Ebenso gehört AKT1 zusammen mit u.a BAD, GADD45A und TP53, die hier ebenfalls reguliert sind, zu einer Gen-Gruppe, die versucht DNA-Schäden der Zelle zu beheben. Dies spricht insbesondere dafür, dass durch das Malassezin es zu einer Schädigung der Zelle im Sinne der Apoptose gekommen ist, und die Zelle nun leidlich versucht, diese Schäden zu reparieren.

Eine weitere wichtige Gruppe von Proteinen, die an der Regulation der Apoptose beteiligt sind, sind die IAP's (Inhibitors of apoptosis proteins). Diese können im Gegensatz zu Proteinen wie Bcl-2 nicht nur den mitochondrialen Weg der Apoptose blockieren, sondern auch den Weg über die Todesrezeptoren inhibieren, indem sie direkt an die aktivierten Caspasen binden und deren Funktion hemmen. IAP's sind

die einzigen bekannten endogenen Inhibitoren apoptotischer Caspasen. Sie wurden zuerst in Baculoviren beschrieben, wo sie die vom Wirt als Abwehrmechanismus ausgelöste Apoptose unterdrücken (12). Daher werden sie auch BIRC (Baculoviral IAP repeat-containing) genannt. Dies könnte der Grund sein, weshalb lediglich nach 9h Caspase 1 aus der Gruppe der Entzündungs-Mediatoren und Caspase 10 als Apoptose Aktivator einer Hochregulation unterzogen wurden, während alle weiteren Caspasen in keinsten Weise reguliert werden. Stattdessen ist es offensichtlich, dass mehrere IAP`s hochreguliert werden. Es hat den Anschein, dass die Caspasen der endogenen Inhibition durch die IAP`s unterliegen.

Des Weiteren ist auffällig, dass mehrere Mitglieder der TNF-Liganden Familie, z.B. CD40LG, FasLG und entsprechend TNF-Rezeptoren aktiviert werden. TNF-Liganden interagieren mit ihren entsprechenden Rezeptoren aus der TNF-Rezeptor Familie. Die Bindung des Rezeptors an seinen Liganden aktivieren verschiedene Signalwege. Die TNF-Rezeptor Familie hat pleiotrope Aufgaben. Abhängig vom Zelltyp und weiteren Signalen, die sie von der Zelle erhalten, können diese Rezeptoren Proliferation, Überleben, Differenzierung oder den Tod der Zelle steuern (3, 20, 64, 91). Die Bindung verursacht üblicher Weise eine Verstärkung sog. Adapterproteine, wie z.B.: TRADD und FADD. Die Rekrutierung der Adaptermoleküle endet gewöhnlich in einem verstärkten Signal von Caspase 8 oder 10.

Die vorliegenden Daten lassen eindeutig darauf schließen, dass dieser Signalweg eingeschlagen wurde. Neben der Aktivierung von TNF-Rezeptoren, Liganden und den Adaptermolekülen aus der DD und DED Familie ist Caspase 10 als Apoptose-Aktivator signifikant hochreguliert.

Vermutlich liegt hier ein Zusammenspiel beider apoptotischer Signaltransduktionswege vor. Durch die Interaktion der einzelnen Mitglieder der Bcl-2 Familie, scheint der mitochondriale Signalweg eingeschlagen zu sein. Gleichzeitig wird der extrinsische Caspase-abhängige Weg über die TNF-Rezeptoren, Liganden und deren Adapterproteine eindeutig aktiviert. Dem setzten sich u.a die IAP`entgegen, um den Untergang der Zelle durch Apoptose zu verhindern.

Demgegenüber reagiert die Zellreihe WM115 in einer ganz anderen Weise, nachdem sie dem Einfluß von Malassezin ausgesetzt war. Es wird deutlich, dass trotz langer Inkubationszeit die Zellen nicht in dem Maße dem Einfluß des Malassezins ausgesetzt sind wie die Zellreihe MeWo. Hier scheint Apoptose lediglich abzulaufen, indem Gene, deren Hauptaufgabe ist, Apoptose zu unterbinden, eine Down-Regulation erfahren.

Lediglich das pro-apoptotische Bcl-2 Mitglied HRK wird aktiviert, während seine Gegenspieler Bcl-2 und Bcl-X_L keiner Regulation unterliegen. Dies spricht eindeutig dafür, dass eine Apoptose abläuft. Eine Aussage über deren Intensität ist jedoch nicht möglich.

Nach der Inkubation mit der geringeren Dosis beginnt mit BIRC 3 eine Down-Regulation der IAP's, die mit der höheren Konzentration an Malassezin nur noch verstärkt wird, indem weitere BIRC signifikant herunterreguliert werden. Da die zell-eigenen Mechanismen, die den Untergang der Zelle verhindern sollen, ausgeschaltet sind, kann nun Apoptose ablaufen. Obwohl durch die Herunterregulation der IAP's keine Inhibition der Caspasen stattfinden kann, werden diese nicht sichtlich verändert.

Die Zellreihe WM115, bei der von Anfang an ein langsames Zellwachstum zu beobachten war, scheint resistenter gegenüber der Wirkung von Malassezin zu sein. Die Up-Regulation von HRK und der Ausschaltung der BIRC lässt vermuten, dass die mitochondriale Signalkaskade in Gang gesetzt wurde, jedoch geringer ausgeprägt als bei MeWo.

Die beobachtenden Wirkungen von Malassezin könnten auf seine Eigenschaft als Agonist des Arylhydrocarbon (AH)-Rezeptors zurückzuführen sein. Dem AHR werden insbesondere Aufgaben bei der Regulation des Fremdstoffwechsels der Zelle zugeschrieben (40). Am besten untersucht ist seine Aktivierung durch polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (polychlorierte Dibenzo-p-Dioxine, Dibenzofurane, Biphenyle) sowie halogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe (Benzo(a)pyrene, Benzoflavone, aromatische Amine) mit der daraus resultierenden Induktion von Cytochrom P450 (CYP1A1). Neben seiner Rolle bei xenobiotischen Prozessen ist der AHR aber auch an der Kontrolle komplexer zellulärer Programme wie Zellwachstum, Zellteilung und Zelldifferenzierung beteiligt (36, 70). Dabei scheinen AHR-Agonisten sowohl zur Zellproliferation als auch zur Apoptose führen

zu können, welcher Weg unter welchen Bedingungen eingeschlagen wird, ist unklar (70).

Ob die untersuchten Melanomzellreihen einen AH-Rezeptor aufweisen, ist bisher nicht bekannt. Die erhaltenen Resultate geben einen Hinweis darauf, dass solche Wechselwirkungen durchaus bestehen können. Die schwächere Wirkung des Malassezins auf die Zellreihe WM115 könnte darauf schließen, dass diese keinen bzw. keinen intakten AH-Rezeptor besitzen.

Bittinger et al. konnte 2003 nachweisen, dass die Aspartat-Aminotransferase AHR-Signale durch Konvertierung des L-Tryptophans zu Indol-3-Pyruvat aktivieren. Indol-3-Pyruvat reagiert in wässriger Lösung so, dass eine große Anzahl an Komponenten entsteht, die als AHR-Agonisten agieren (7). Möglicherweise ist ein ähnlicher Mechanismus für die hier gesehene Wirkung verantwortlich. Schließlich ist das Malassezin ein Sekundärmetabolit, welcher von dem Hefepilz *Malassezia furfur*, dem Erreger der häufigsten superfiziellen Mykose Pityriasis versicolor, der bei Gabe von Tryptophan als alleinige Stickstoffquelle synthetisiert wird. Somit könnte es möglich sein, dass durch diese besondere Verbundenheit mit dem Tryptophan-Stoffwechsel es in Lösung ebenfalls zur Bildung weiterer Komponenten, die als AHR-Agonisten agieren, kommt. Dem Malassezin wird nur eine schwache AHR-Agonistische Eigenschaft zugeschrieben, da es kein planares Molekül ist. Eine intrazelluläre Umwandlung in einen potenteren AHR-Agonisten wie z.B., Indolo[3,2-*b*]Carbazol wäre denkbar.

Der AHR gehört zur PAS Protein Familie (85), unterscheidet sich von den anderen PAS durch seine Liganden-abhängige Aktivität. Untersuchungen von Öberg et. al beschreiben, dass Zellkulturmedium, das Licht ausgesetzt wurde, eine AHR-abhängige Aktivität induziert. Gezeigt wurde, wie die Hintergrundaktivität von CYP1A1 in Hepatomzellen der Ratte (MH1C1) durch Fotoprodukte kontrolliert wurde, die im Medium, das normalem Laborlicht ausgesetzt war, entstand. Diese Licht-induzierte Aktivität scheint Tryptophan abhängig zu sein, aber unabhängig von Riboflavin oder anderen Bestandteilen des Mediums (67). Dies unterstreicht die These, dass die Aktivität des Malassezin am AH-Rezeptor eng verwoben ist mit dem Tryptophan-Stoffwechsel. Dies zeigt sich bereits anhand der Tatsache, dass das Malassezin als Sekundärmetabolit eines nur Tryptophan-abhängigen Pilzes synthetisiert wird.

Bisher ist aber nicht untersucht worden, ob das Malassezin ausschließlich über den AHR wirkt, oder ob weitere Mechanismen in Säugetierzellen vorhanden sind, über die das Malassezin seine Wirkung entfalten kann.

Die eingangs gestellte Frage, ob das Indolderivat Malassezin bei den beiden Zellreihen Apoptose auslösen kann, ist mit ja zu beantworten.

Es ist eine Konzentrations- und Inkubationszeit-Abhängigkeit zu erkennen. Es sind deutliche Unterschiede zwischen den beiden Zellreihen hinsichtlich ihrer Reaktion sichtbar. Die Zellreihe MeWo, die von Fibroblasten stammt, macht eindeutig Apoptose. Obwohl ihre Herkunft unterschiedlich ist, produziert sie ebenfalls wie Melanozyten, bei denen bereits durch Podobinska et. al ein Malassezin-Einfluß bewiesen werden konnte, Melanin. Die Zellreihe WM115, die epithelialer Herkunft ist und ein Proteoglycan-Antigen produziert, reagiert schwächer auf das einwirkende Malassezin. Fraglich ist, ob das Malassezin eine selektive Wirkung auf bestimmte Zellarten hat, die auf der AH-Rezeptor Funktion beruhen oder ob dies eine andere Ursache hat.

Ausblick

Interessant ist es, die bereits sichtbaren unterschiedlichen Reaktionen verschiedener Melanomzellreihen und der Melanozyten auf das Malassezin noch weiter zu charakterisieren. Wenn deren Ursache bekannt ist, wäre durch die anscheinend selektive pharmakologische Wirkung bzw. der verstärkten Wirkung des Malassezins auf einzelne Zellreihen denkbar, ein Therapeutikum zu entwickeln. Dabei könnte Malassezin als Zusatz zu bereits vorhandenen Chemotherapien dienen, um deren Effekt mittels Malassezin zu verstärken.

Gleichzeitig wäre es interessant herauszufinden, ob Malassezin bei bereits gegen Chemotherapien resistenten Sublinien der Zellreihe MeWo ebenfalls eine Wirkung zeigt.

7. Zusammenfassung

Das maligne Melanom wurde erstmals um 1806 von Rene Laennec beschrieben. Die Inzidenz des malignen Melanoms ist im Steigen. Sobald ein malignes Melanom Fernmetastasen gesetzt hat, ist die Behandlung äußerst schwierig. Meist sind nur noch palliative Therapieansätze möglich. In jüngster Zeit treten zunehmend Melanome auf, deren zugrunde liegende Zellreihe bereits gegen Chemotherapeutika resistent geworden ist. Dies hat fatale Folgen für die betroffenen Patienten.

In dieser Arbeit wurde der Einfluß des Indolderviats Malassezin, das aus dem Hefepilz *Malassezia furfur* als Sekundärmetabolit isoliert werden konnte, auf die beiden Melanom-Zellreihen MeWo und WM115 untersucht. Besonderes Augenmerk wurde auf die mögliche Apoptose-Induktion durch das Malassezin gesetzt. Durch Krämer et al. 2003 konnte bereits ein apoptotischer Einfluß des Malassezins auf humane Melanozyten bestätigt werden (44).

Lichtmikroskopisch konnte bei hohen Konzentrationen erhebliche morphologische Veränderungen beobachtet werden. Statt des natürlichen Aussehens beider Zellreihen waren in der höchsten Konzentration abgerundete, losgelöste Zellen zu erkennen. Erst bei niedrigen Konzentrationen wurde der Einfluß geringer.

Um die Zellveränderungen zu spezifizieren, wurde zwischen Apoptose und Nekrose mittels Facs differenziert. Die Zellen wurden unter Verwendung von Annexin V FITC angefärbt, das als Apoptose-spezifischer Marker gilt. Zur Abgrenzung zu nekrotischen Zellen wurde den isolierten Zellen zusätzlich 7-AAD zugegeben. Es wurde eine dosisabhängige Apoptose detektiert. Als Kontrolle wurde begleitend ein LDH-Test durchgeführt. Da es sich um Apoptose handelt, ist das zytoplasmatische Enzym LDH, das durch den Untergang der Zelle bei Nekrose freigesetzt wird, konstant niedrig geblieben.

Um diese Befunde weiter zu charakterisieren, wurde aufgereinigte RNA in cDNA umgewandelt. Diese wurde mit SYBR Green Master Mix auf einen RT-PCR Array (RT²-ProfilerTM PCR Array System, SuperArray) gegeben, der 84 Apoptose-spezifische Gene enthält. Mittels RT-PCR wurde die Regulation der interessierenden Gene detektiert. Es waren deutliche Unterschiede zwischen beiden Zellreihen sichtbar. Bei MeWo beginnt schon bei niedriger Konzentration und kurzer Inkubationszeit die Apoptose, die sich nach langer Inkubationszeit bei gleicher Konzentration verstärkt. Es ist ein Zusammenspiel von extrinsischem und intrinsischem Apoptose Signalweg zu erkennen. Demgegenüber ist die Zellreihe

WM115 resistenter gegenüber dem Malassezin-Einfluß. Trotz langer Inkubationszeit und zwei unterschiedlichen Konzentrationen wird die Apoptose hauptsächlich durch Down-Regulation von Anti-Apoptose Genen reguliert. Aufgrund der Hochregulation der Caspasegene kann vermutet werden, dass die hier ablaufende Apoptose auf mitochondriale Dysfunktion beruht. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das Malassezin selektiv auf bestimmte Zellreihen wirkt. Wahrscheinlich spielt die Interaktion mit dem AH-Rezeptor dabei eine große Rolle.

Auf welche Zellreihen das Malassezin den größten Einfluß hat und ob dieser auch bei Sublinien zu finden ist, die bereits durch Resistenz gegenüber diversen Chemotherapeutika auffallen und somit die Fähigkeit zur Apoptose verloren haben, ist weiteren Untersuchungen vorbehalten.

8. Summary

The malignant melanoma has been first described around 1806 by Rene Laennec. The malignant melanoma incidence is increasing. As soon as the malignant melanoma has metastasis, it's treatment is extremely difficult. Then in most cases there are only palliative therapies possible. Recently there are more and more melanoma, the cell lines on which they're based on, have got resistant against chemotherapies already. This is a fatal result for the concerning patients.

The present study has analysed the influence of the Indolderivate Malassezin, which was isolated from the yeast *Malassezia furfur* as a secondary metabolite, to the two melanoma cell-lines MeWo and WM115.

Special focus was based on the possible apoptosis-induction of Malassezin. Krämer et al. 2003 had already confirmed the apoptotic influence of Malassezin to human melanocytes (44).

In light-microscopy relevant morphological changes were noticed at high concentrations. Instead of the natural looking of both cell-lines, we recognized well-rounded and isolated cells in the highest concentrations. Not until lower concentrations they returned to a normal image.

To specify the cell alterations we distinguished between apoptosis and necrosis with FacScan. The cells were labelled under the use of Annexin V FITC which is well-known as an apoptosis-specific marker. To distinguish to necrotic cells the isolated cells were also marked with 7-AAD. We detected a dose-dependent apoptosis. As a control we accompanied the experiments with a LDH-test. So far it is apoptosis, the cytoplasmatic enzyme LDH, which released by cells undergoing necrosis, was consistently at low levels.

To specify these findings, purified RNA were converted into cDNA. Together with SYBR Green Master Mix the cDNA were given onto an RT-PCR Array (RT²-ProfilerTM PCR Array System, SuperArray) containing 84 apoptosis-specific genes. Via RT-PCR the regulation of the interesting genes were detected. There were noticeable differences between the two cell-lines. MeWo started apoptosis at lower concentration and shorter incubation times which increased after long periods of incubations while the concentration was the same. It's making out an interplay between the extrinsic and intrinsic apoptotic pathway. Compared with this the cell-line WM115 is much more resistant to the Malassezin-influence. Despite long

incubation-periods and two different concentration-dosis, it seems that apoptosis is mainly regulated by down-regulation of anti-apoptotic genes.

This assumes that apoptosis could run through mitochondrial dysfunction. These results conclude that Malassezin has a selective effect to certain cell-lines. Probably the interaction with the AH-receptor plays an important role.

To which cell-line Malassezin has the most influence, and if this influence could also be find in sub-lines which are conspicuous to be resistant to chemotherapies, and if they loose their capability undergoing apoptosis is still unclear. This is to be cleared in further experiments.

9. Verzeichnisse

9.1 Abbildungen	Seite
Abbildung 1: Kennzeichen des apoptotischen u. nekrotischen Prozesses des Zelltodes,	14
Abbildung 2: Schematische Darstellung einiger wichtiger apoptotischer Signal- Transduktionswege	18
Abbildung 3: Synthese des Malassezins in fünf Schritten	25
Abbildung 4: Schema der 2 enzymatischen Schritte im LDH-Assay	29
Abbildung 5: LDH-Vorversuch: MeWo, 24h und 48h	52
Abbildung 6: LDH-Vorversuch: WM115, 24h und 48h	52
Abbildung 7: LDH: MeWo Malassezin nach 4, 6, 8, 12h	53
Abbildung 8: LDH: WM115 Malassezin nach 4, 6, 8, 12h	53
Abbildung 9: LDH: MeWo Malassezin und Staurosporine nach 4, 6, 8h	54
Abbildung 10: LDH: WM115 Malassezin und Staurosporine nach 4, 6, 8h	54
Abbildung 11: LDH: MeWo Malassezin und α -Naphthoflavon nach 24h	56
Abbildung 12: LDH: MeWo Malassezin und α -Naphthoflavon nach 48h	56
Abbildung 13: LDH: WM115 Malassezin und α -Naphthoflavon nach 48h	57
Abbildung 14: LDH: WM115 Malassezin und α -Naphthoflavon nach 96h	57

Abbildung 15:	59
Facs Dotplots MeWo 4h	
Abbildung 16:	60
Facs Dotplots MeWo 6h	
Abbildung 17:	61
Facs Dotplots MeWo 8h	
Abbildung 18:	62
Facs Dotplots MeWo 12h	
Abbildung 19:	62
MeWo Zytotoxizität von Malassezin nach 4, 6, 8h	
Abbildung 20:	63
Facs Histogramme MeWo 4, 6, 8, 12h	
Abbildung 21:	64
Facs Dotplots WM115 4h	
Abbildung 22:	65
Facs Dotplots WM115 6h	
Abbildung 23:	66
Facs Dotplots WM115 8h	
Abbildung 24:	67
Facs Dotplots WM115 12h	
Abbildung 25:	67
WM115 Zytotoxizität von Malassezin nach 4, 6, 8h	
Abbildung 26:	68
Facs Histogramme WM115 4, 6, 8, 12h	
Abbildung 27:	69
MeWo Zytotoxizität von α -Naphtoflavon nach 4, 6, 8, 12h	
Abbildung 28:	70
MeWo Zytotoxizität von α -Naphtoflavon u. Malassezin n. 4, 6, 8,12h	
Abbildung 29:	70
WM115 Zytotoxizität von α -Naphtoflavon nach 4, 6, 8, 12h	
Abbildung 30:	71
WM115 Zytotoxizität von α -Naphtoflavon u. Malassezin n. 4,6,8,12h	

Abbildung 31:	72
MeWo Zytotoxizität Staurosporin nach 4, 6, 8h	
Abbildung 32:	72
WM115 Zytotoxizität Staurosporin nach 4, 6, 8h	
Abbildung 33:	80
MeWo 3h, 12,5 μ M Malassezin, Ergebnisse nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode	
Abbildung 34:	82
MeWo 9h, 12,5 μ M Malassezin, Ergebnisse nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode	
Abbildung 35:	84
WM115 9h, 12,5 μ M Malassezin, Ergebnisse nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode	
Abbildung 36:	85
WM115 9h, 25 μ M Malassezin, Ergebnisse nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode	
Abbildung 37:	87
LDH: MeWo DMSO-Kontrolle nach 4, 6, 8, 12h	
Abbildung 38:	87
LDH: MeWo DMSO-Kontrolle nach 24, 48, 72h	
Abbildung 39:	88
LDH: WM115 DMSO-Kontrolle nach 4, 6, 8, 12h	
Abbildung 40:	88
LDH: WM115 DMSO-Kontrolle nach 24, 48, 72h	
Abbildung 41:	89
Facs MeWo DMSO-Kontrolle nach 4, 6, 8, 12h	
Abbildung 42:	89
Facs WM115 DMSO-Kontrolle nach 4, 6, 8, 12h	

9.2 Abkürzungen

9.2.1 Abkürzungen allgemein

7- AAD	7- Amino- actinomycin D
AHR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
ANF	alpha-Naphtoflavon
BP	Benzo-[a]pyrene
Caspasen	Cystein-abhängige <u>Aspartat</u> - spezifische <u>Protease</u>

cDNA	complementary DNA
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DEPC	Diethylene-Pyrocabonate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
GDC	gDNA control
gDNA	genomische DNA
GOI	Gene of interest
HKG	housekeeping gene
HPA	Helix promatia agglutinin
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRMS	hochauflösende Massenspektroskopie
INT	2-[4iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolium chlorid
kDA	Kilo Dalton
LDH	Laktatdehydrogenase
L1	Zelladhäsionsmolekül CD 171
<i>M.f.</i>	<i>Malassezia furfur</i>
Min	Minuten
nm	Nanometer
NRT	no reverse transkriptase control
NTC	no template control
OD	optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	platelet-derived-growth-factor
PE	Phycoerythrin
PI	Propidium Jodid
PPC	positive PCR control
PS	Phosphatidylserin
RE	reverse Transkriptase

RI	RNase Inhibitor
RNA	Ribonucleinsäure
RTC	reverse Transkriptase control
RT-PCR	Real-Time-Polymerase-Chain-Reaction
s	Sekunden
Taq-Polymerase	DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TNF	Tumor Nekrose Faktor

9.2.2 Abkürzungen der Gene

ABL 1	V-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homologe 1
AKT 1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
APAF 1	Apoptotic protease activating factor
BAD	BCL 2-antagonist of cell death
BAK 1	BCL-2-antagonist/killer 1
BAG 1	BCL 2-associated athanogene
BAG 3	BCL 2-associated athanogene 3
BAX	BCL 2-associated X protein
BCL 10	B-cell CLL/ Lymphoma 10
BCL 2	B-cell CLL/ Lymphoma 2
BCL 2A1	BCL 2-related protein A1
BCL 2L1	BCL 2-like 1
BCL 2L10	BCL 2-like 10 (apoptosis facilitator)
BCL 2L11	BCL 2-like 11 (apoptosis facilitator)
BCL 2L2	BCL 2-like 2
BCL AF1	BCL 2-associated transcription factor
BFAR	Bifunctional apoptosis regulator
BID	BH 3 interacting domain death agonist
BIK	BCL 2-interacting killer (apoptosis- inducing)
BIRC 1	Baculoviral IAP repeat- containing 1
BIRC 2	Baculoviral IAP repeat- containing 2
BIRC 3	Baculoviral IAP repeat- containing 3

BIRC 4	Baculoviral IAP repeat- containing 4
BIRC 6	Baculoviral IAP repeat- containing 6 (apollon)
BIRC 8	Baculoviral repeat- containing 8
BNIP 1	BCL 2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1
BNIP 2	BCL 2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2
BNIP 3	BCL 2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3
BNIP 3L	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein3-like
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog 1
CARD 4	Caspase recruitment domain family, member 4
CARD 6	Caspase recruitment domain family, member 6
CARD 8	Caspase recruitment domain family, member 8
CASP 1	Caspase 1, apoptosis- related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)
CASP 10	Caspase 10, apoptosis-related cysteine protease
CASP 14	Caspase 14, apoptosis-related cysteine protease
CASP 2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine protease (neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 2)
CASP 3	Caspase 3, apoptosis-related cysteine protease
CASP 4	Caspase 4, apoptosis-related cysteine protease
CASP 5	Caspase 5, apoptosis-related cysteine protease
CASP 6	Caspase 6, apoptosis-related cysteine protease
CASP 7	Caspase 7, apoptosis-related cysteine protease
CASP 8	Caspase 8, apoptosis-related cysteine protease
CASP 9	Caspase 9, apoptosis-related cysteine protease
CD 40	CD 40 antigen (TNF receptor superfamily member 5)
CD 40LG	CD 40 ligand (TNF receptor superfamily member 5, hyper-IgM syndrome)
CFLAR	CASP 8 and FADD-like apoptosis regulator
CIDEA	Cell death-inducing DFFA-like effector a
CIDEB	Cell death-inducing DFFA-like effector b
CRADD	CASP 2 and RIPK 1 domain containing adaptor with death domain

DAPK 1	Death-associated protein kinase 1
DFFA	DNA-fragmentation factor, 45kDa, alpha polypeptide
FADD	Fas (TNFRSF 6)- associated via death domain
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, domain 6)
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)
GADD 45A	Growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha
HRK	Harakiri, BCL 2 interacting protein (only BH3 domain)
IGF 1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily, member 1)
LTBR	Lymphotoxin beta receptor (TNFR superfamily, member 3)
MCL 1	Myeloid cell leukaemia sequence 1 (BCL 2- related)
NOL 3	Nucleolar protein 3 (apoptosis repressor with CARD domain)
PYCARD	PYD and CARD domain containing
RIPK 2	Receptor-interacting serine-threonine kinase 2
TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)
TNFRSF 10B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10b
TNFRSF 11B	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b (osteoprotegrin)
TNFRSF 1A	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A
TNFRSF 21	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
TNFRSF 25	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 25
TNFRSF 7	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 7
TNFRSF 9	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
TNFSF 10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10
TNFSF 7	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 7

TNFSF 8	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 8
TP 53	Tumor protein p53 (Li-Fraumeni-syndrome)
TP 53BP2	Tumor protein p53 binding protein, 2
TP73	Tumor protein p73
TRADD	TNFRSF 1A-associated via death domain
TRAF 2	TNF receptor-associated factor 2
TRAF 3	TNF receptor-associated factor 3
TRAF 4	TNF receptor-associated factor 4
18sRNA	Human 18s ribosomal RNA
HPRT 1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan-syndrome)
RPL 13A	Ribosomal protein L13A
GAPD	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
ACTB	Actin, beta
CARD	Caspase recruitment death domains
CEACAM 1	Carcino-embryonic antigen-like cell adhesion molecule 1
DED	death effector domain

9.3 Fotos

Seite

Foto 1: Mikrotiterplatte nach 30min Inkubation mit LDH-Reaktionslg.	31
Foto 2: MeWo: Zellen nativ	73
Foto 3: MeWo: 200µM Malassezin, 8h	73
Foto 4: MeWo: 50µM Malassezin, 8h	73
Foto 5: MeWo: 25µM Malassezin, 8h	73
Foto 6: WM115: Zellen nativ	74
Foto 7: WM115: 100µM Malassezin, 8h	74
Foto 8: WM115: 50µM Malassezin, 8h	74
Foto 9: WM115: 12,5µM Malassezin, 8h	74
Foto 10: MeWo gDNA nach DNase-Verdau untersch. Konzentrationen	75
Foto 11: MeWo RNA entsprechend zu Foto 10	75
Foto 12: WM115 gDNA nach DNase-Verdau untersch. Konzentrationen	76
Foto 13: WM115 RNA entsprechend zu Foto 12	76
Foto 14: MeWo gDNA	76
Foto 15: WM115 gDNA	76

Foto 16: MeWo RNA	77
Foto 17: WM115 RNA	77
9.4 Tabellen	Seite
Tabelle 1: Charakteristika der Zelllinien MeWo und WM115	19
Tabelle 2: Reagenzien für eine PCR-Reaktion	39
Tabelle 3: PCR-Programm zur Amplifizierung möglicher gDNA-Fragmente	40
Tabelle 4: Zusammensetzung des RNA-Ladepuffers	41
Tabelle 5: Zusammenstellung der zu untersuchenden Gene	42
Tabelle 6: “RT-Cocktail” zur cDNA-Synthese v1	46
Tabelle 7: “RT-Cocktail” zur cDNA-Synthese v3	47
Tabelle 8: Zusammensetzung des Experimental Cocktails v3	48
Tabelle 9: Programm für die RT-PCR im ABI 7000 Thermocycler	49
Tabelle 10: Daten der OD Messung der RNA, MeWo, 3h, 12,5µM	77
Tabelle 11: Daten der OD Messung der RNA, MeWo, 9h, 12,5µM	77
Tabelle 12: Daten der OD Messung der cDNA, MeWo, 3h, 12,5µM	78
Tabelle 13: Daten der OD Messung der cDNA, MeWo, 9h,12,5µM	78
Tabelle 14: Daten der OD Messung der RNA, WM115, 9h, 12,5µM	78
Tabelle 15: Daten der OD Messung der RNA, WM115, 9h, 25µM	78

Tabelle 16:	79
Daten der OD Messung der cDNA, WM115, 9h, 12,5 μ M	
Tabelle 17:	79
Daten der OD Messung der cDNA, WM115, 9h, 25 μ M	
Tabelle 18:	81
MeWo 3h, 12,5 μ M, Resultat der RT-PCR nach $\Delta\Delta$ Ct-Methode	
Tabelle 19:	82
MeWo 9h, 12,5 μ M, Resultat der RT-PCR nach $\Delta\Delta$ Ct-Methode	
Tabelle 20:	84
WM115 9h, 12,5 μ M, Resultat der RT-PCR nach $\Delta\Delta$ Ct-Methode	
Tabelle 21:	85
WM115 9h, 25 μ M, Resultat der RT-PCR nach $\Delta\Delta$ Ct-Methode	
9.5 Tabellen im Tabellenanhang	Seite
Tabelle 22: zu Abbildung 5: LDH-Vorversuch: MeWo, 24h	126
Tabelle 23: zu Abbildung 5: LDH-Vorversuch: MeWo, 48h	126
Tabelle 24: LDH-Vorversuch: MeWo, 72h	127
Tabelle 25: LDH-Vorversuch: MeWo, 96h	127
Tabelle 26: LDH-Vorversuch: MeWo, 120h	128
Tabelle 27: LDH-Vorversuch: MeWo, 144h	128
Tabelle 28: zu Abbildung 6: LDH- Vorversuch: WM115, 24h	129
Tabelle 29: zu Abbildung 6: LDH-Vorversuch: WM115, 48h	129
Tabelle 30: LDH-Vorversuch: WM115, 72h	130
Tabelle 31: LDH-Vorversuch: WM115, 98h	130
Tabelle 32: LDH-Vorversuch: WM115, 120h	131
Tabelle 33: LDH-Vorversuch: WM115, 144h	131
Tabelle 34: zu Abbildung 7: LDH: MeWo Malassezin, 4h	132
Tabelle 35: zu Abbildung 7: LDH: MeWo Malassezin, 6h	132
Tabelle 36: zu Abbildung 7: LDH: MeWo Malassezin, 8h	132
Tabelle 37: zu Abbildung 7: LDH: MeWo Malassezin, 12h	132
Tabelle 38: zu Abbildung 8: LDH: WM115 Malassezin, 4h	133
Tabelle 39: zu Abbildung 8: LDH: WM115 Malassezin, 6h	133
Tabelle 40: zu Abbildung 8: LDH: WM115 Malassezin, 8h	133
Tabelle 41: zu Abbildung 8: LDH: WM115 Malassezin, 12h	133

Tabelle 42: zu Abbildung 9: LDH: MeWo Stauro und Malassezin, 4h	134
Tabelle 43: zu Abbildung 9: LDH: MeWo Stauro und Malassezin, 6h	134
Tabelle 44: zu Abbildung 9: LDH: MeWo Stauro und Malassezin, 8h	134
Tabelle 45: zu Abbildung 10: LDH: WM115 Stauro und Malassezin, 4h	135
Tabelle 46: zu Abbildung 10: LDH: WM115 Stauro und Malassezin, 6h	135
Tabelle 47: zu Abbildung 10: LDH: WM115 Stauro und Malassezin, 8h	135
Tabelle 48: zu Abbildung 11: LDH: MeWo Malassezin, ANF u. Malassezin+ ANF, 24h	136
Tabelle 49: zu Abbildung 12: LDH: MeWo Malassezin, ANF u. Malassezin+ ANF, 48h	136
Tabelle 50: zu Abbildung 13: LDH: WM115 Malassezin, ANF u. Malassezin+ ANF, 48h	137
Tabelle 51: zu Abbildung 14: LDH: WM115 Malassezin, ANF u. Malassezin+ ANF, 96h	137
Tabelle 52: zu Abbildung 19: Facs MeWo, 4h	138
Tabelle 53: zu Abbildung 19: Facs MeWo, 6h	139
Tabelle 54: zu Abbildung 19: Facs MeWo, 8h	140
Tabelle 55: Facs MeWo, 12h	141
Tabelle 56: zu Abbildung 25: Facs WM115, 4h	142
Tabelle 57: zu Abbildung 25: Facs WM115, 6h	143
Tabelle 58: zu Abbildung 25: Facs WM115, 8h	144
Tabelle 59: Facs WM115, 12h	145
Tabelle 60: zu Abbildung 27: Facs MeWo ANF 4-12h	146
Tabelle 61: zu Abbildung 28: Facs MeWo Malassezin+ ANF 4-12h	147
Tabelle 62: zu Abbildung 29: Facs WM115 ANF 4-12h	148
Tabelle 63: zu Abbildung 30: Facs WM115 Malassezin+ ANF 4-12h	149
Tabelle 64: zu Abbildung 31: MeWo Zytotoxizität Staurosporine nach 4, 6, 8h	150
Tabelle 65: zu Abbildung 32: WM115 Zytotoxizität Staurosporine nach 4, 6, 8h	151
Tabelle 66: WM115, Vorversuch 1, komplette Resultat der RT-PCR	152
Tabelle 67: WM115, Vorversuch 2, komplette Resultat der RT-PCR	156
Tabelle 68: zu Abbildung 33: MeWo 3h, 12,5µM Malassezin, komplette Resultate der RT-PCR	160

Tabelle 69: zu Abbildung 34: MeWo 9h, 12,5µM Malassezin, komplette Resultate der RT-PCR	164
Tabelle 70: zu Abbildung 35: WM115 9h, 12,5µM Malassezin, komplette Resultate der RT-PCR	167
Tabelle 71: zu Abbildung 36: WM115 9h, 25µM Malassezin, komplette Resultate der RT-PCR	169
Tabelle 72: zu Abbildung 37: LDH: DMSO-Kontrolle, MeWo, 4h	174
Tabelle 73: zu Abbildung 37: LDH: DMSO-Kontrolle, MeWo, 6h	174
Tabelle 74: zu Abbildung 37: LDH: DMSO-Kontrolle, MeWo, 8h	174
Tabelle 75: zu Abbildung 37: LDH: DMSO-Kontrolle, MeWo, 12h	172
Tabelle 76: zu Abbildung 38: LDH: DMSO-Kontrolle, MeWo, 24h	173
Tabelle 77: zu Abbildung 38: LDH: DMSO-Kontrolle, MeWo, 48h	173
Tabelle 78: zu Abbildung 38: LDH: DMSO-Kontrolle, MeWo, 72h	173
Tabelle 79: zu Abbildung 39: LDH: DMSO-Kontrolle, WM115, 4h	174
Tabelle 80: zu Abbildung 39: LDH: DMSO-Kontrolle, WM115, 6h	174
Tabelle 81: zu Abbildung 39: LDH: DMSO-Kontrolle, WM115, 8h	174
Tabelle 82: zu Abbildung 39: LDH: DMSO-Kontrolle, WM115, 12h	174
Tabelle 83: zu Abbildungen 40: LDH: DMSO-Kontrolle, WM115, 24h	175
Tabelle 84: zu Abbildungen 40: LDH: DMSO-Kontrolle, WM115, 48h	175
Tabelle 85: zu Abbildungen 40: LDH: DMSO-Kontrolle, WM115, 72h	175
Tabelle 86: zu Abbildung 41: Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, MeWo, 4h	176
Tabelle 87: zu Abbildung 41: Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, MeWo, 6h	177
Tabelle 88: zu Abbildung 41: Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, MeWo, 8h	178
Tabelle 89: zu Abbildung 41: Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, MeWo, 12h	179
Tabelle 90: zu Abbildung 42: Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, WM115, 4h	180
Tabelle 91: zu Abbildung 42: Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, WM115, 6h	181
Tabelle 92: zu Abbildung 42: Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, WM115, 8h	182
Tabelle 93: zu Abbildung 42: Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, WM115, 12h	183

9.6 Literatur

- 1) Acehan, D, Jiang, X, Morgan, DG, Heuse, JE, Wang, X, Akey, CW: Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase 9 binding, and activation, *Mol. Cell* 9 (2): 423-432, 2002
- 2) <http://www.aerzteblatt.de/v4/news/news.asp?id=26668>
- 3) Ashkenazi, A, Dixit, VM: Death receptors: signalling and modulation, *Science* 281 (5381): 1305-1308, 1998
- 4) Balaban, GB, Herlyn, M., Clark, WH Jr., Nowell, PC: Karyotypic evolution in human malignant melanoma, *Cancer genet. Cytogenet.* 19: 113-122, 1986
- 5) Balch, CM., Gershenwald, JE et al., Final Version of 2009 AJCC Melanoma Classification, *JCO* 27 (36); 6199-6206, 12/2009
- 6) Balch, CM, Houghton, AN, Milton, GW, Soong, SJ: *Cutaneous melanoma* Lippincott, JB, Philadelphia, 1998
- 7) Bittinger, M, Nguyen, LP, Bradfield, CA: Aspartate Aminotransferase generates antagonists of the Aryl Hydrocarbon Receptor, *Mol. Pharmacol.* 64: 550-556, 2003
- 8) Borner, C: the Bcl-2 protein family: sensors and checkpoint for life- or- death decisions, *Mol. Immunol.* 39(11): 615- 647, 2003
- 9) Bratton, SB, MacFarlane, M, Cain, K, Cohen, GM: Protein complexes activate distinct caspase cascade in death receptor and stress-induces apoptosis, *Exp. Cell Res.* 256 (1): 27-33, 2000
- 10) Cocco, C, Pistoia, V, Airoidi, I: New perspectives for melanoma immune therapy : role of IL-12, *Curr. Mol. Med.* 9 (4): 459-469, 2009
- 11) Cook, JA, Mitchell, JB: Viability measurements in mammalian cell system: *Anal. Biochem.* 179 (1): 1-7, 1989
- 12) Crook, NE, Clem, RJ, Miller, LK: An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif, *J. Virol.* 67: 2168-2174, 1993
- 13) van Cruchten,S and van den Boeck,W: Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis: *Anat. Histol. Embryol* 31(4): 214-232
- 14) Danks, AM, Hammond, DN, Wainer, BH, van Buskirk, RG, Isaacson, RR: Cellular alteration produced by experimental increase in intracellular calcium and the nature of protective effects from pre-treatment with nimodipine, *Molecular Brain Research* 16 (1-2):168-172, 1992

- 15) Decker, T, Lohmann-Matthes, ML: A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity, *J. Immunol. Methods* 115 (1): 61- 69, 1988
- 16) Denault, JB, Salvesen, GS: Caspases: Keys in the ignition of cell death, *Chem Rev.* 102 (12): 4489-4500, 2002
- 17) Desmond, RA, Soong, SJ: Epidemiology of malignant melanoma, *Surg. Clin. North Am.* 83 (1): 1-29, 2003
- 18) Eberle, J, Hossini, AM: Expression and function of bcl- 2 proteins in melanoma, *Curr. Genomics* 9 (6): 409-419, 2008
- 19) Flaherty, KT., Puzanov, I., Kim, KB., et al.: Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma, *NEJM* 363 (9): 876-878, 2010
- 20) Fulda, S, Debatin, KM: Signaling through death receptors in cancer therapy, *Curr. Opin. Pharmacol* 4 (4): 327- 332, 2004
- 21) Garbe, C, Blum, A: Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide, *Skin Pharmacol Appl. Skin Physiol.* 14: 280-290, 2001
- 22) Garbe, C, Eigentler, TK: Therapie des malignen Melanoms im Stadium der Fernmetastasierung, *Hautarzt* 55:195-213, 2004
- 23) Garbe, C., Hauschild, A., Volkenandt, M., Schadendorf, D., Deutsche Leitlinien Malignes Melanom in interdisziplinäre Leitlinien zur Diagnostik und Behandlung von Hauttumoren Garbe, c. (Hrsg.) Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 23-55, 2005
- 24) Garbe, C, Hauschild, A, Volkenandt, M, et al.: Deutsche Leitlinie: Malignes Melanom, Kap. 1.4, S.5 Vers. 15 2/2005
- 26) Garbe, C, Kreuser, ED, Zoibolis, CC, Stadler, R, Orfanos, E: Combined treatment of metastatic melanoma with interferons and cytotoxic drugs, *Semin. Oncol.* 19: 63-69, 1992
- 27) Gesiewicz, TA, Kende, AS, Rucci, G, Witney, B, Willey, JJ, Analysis of structural requirements for ah receptor antagonist activity: Ellipticines, flavones, and related compounds, *Biochem. Pharm* 52 (11), 1787-1803, 1996
- 28) Gewies, A, ApoReview, 2003
- 29) Grose, C, Brunell, PA: Varizella- Zoster Virus: Isolation and Propagation in human melanoma cells at 36° and 32° C, *Infect. And Immun.* 19: 199-203, 1978

- 30) Helmbach, H, Kern, MA, Rossmann, E, Renz, K, Kissel, C, Gschwendt, B, Schadendorf, D: Drug Resistance towards Etoposid and Cisplatin in human melanoma cells is associated with drug- dependent Apoptosis Deficiency, Journal of Investigative Dermatology, 0022-202X, 2002
- 31) Hölzl, D: Fachgespräch „Gesundheitsgerfahren durch UV-Strahlung“ Statement von Prof. Dr. D. Hölzl: Entwicklung der Hautkrebs-Inzidenz in Bayern und Deutschland von München, S.60, 03. 12. 2003
- 32) Homburg, CHE, de Haas, M, von dem Borne, AEGK, Verhoeven, AJ, Reutelinsperger, CMP, Roos, D: Human neutrophils lose their surface FcgRIII and acquire Annexin V binding sites during apoptosis in vitro: Blood 85: 532-540, 1995
- 33) Inohara, N, Ding, L, Chen, S, Nunez, G: Harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X_L, the EMBO Journal 16 (7): 1686-1694, 1997
- 34) Irlinger, B, Bartsch, A, Krämer, HJ, Mayser, P, Steglich, W: New Tryptophan Metabolites from Cultures of the Lipophilic Yeast *Malassezia furfur*, Chem Inform 36, Issue 46, 2005
- 35) Jiang, Q, Wie, H, Tian, Z: Poly I: C enhances cycloheximide-induced apoptosis of tumor cells through TLR pathway, BMC Cancer 8 (12): 1471-2407, 2008
- 36) Jones, CL, Reiners, JJ: Differentiation status of cultured murine keratinocytes modulates induction of genes responsive to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, Ach. Biochem. Biophys. 347 (2): 163-173, 1997
- 37) Jones, KH, Senft, JA: An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate-propidium iodide: J.Histochem. Cytochem. 33 (1): 77-79, 1985
- 38) Katz, C, Benyamini, H, Rotem, S, Lebendiker, M et. al: Molecular basis of the interaction between the antiapoptotic Bcl-2 family proteins and the proapoptotic protein ASPP 2, Proc. Natl. Acad. Sci 105 (34): 12277-12282, 2008
- 39) Katzer, K, Berking, C: das akrolentiginöse maligne Melanom-eine besondere Herausforderung, Fuß-und Sprunggelenk 6 (3): 141-151, 2008

- 40) Kerr, JFR, Whyllie, AH, Currie, AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics, *Br. J. Cancer* 26: 239-257, 1972
- 41) Kissel, CK, Schadendorf, D, Rockmann, H: the altered pathways in cisplatin and etoposid-resistant melanoma cells are drug specific, *Melanoma Res.* 16: 527-535, 2006
- 42) Kolber, MA, Ominones, RR, Gress, RE, Henkart, PA: Measurement of cytotoxicity by target cell release and retention of fluorescent dye bis-carboxyethyl-carboxyfluorescein (BCECF): *J. Immun. Methods* 108 (1-2): 255-264, 1988
- 43) Koopman, G, Reutelinsperger, CMP, Kuijten, GAM, Keehnen, RMJ, Pals, ST, van Oers, MHJ: Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis: *Blood* 84: 1415-1420, 1994
- 44) Krämer, HJ, Podobinska, M, Barth, A, Battmann, A, Thoma, W, et al.: Malassezin, a Novel Agonist of Aryl Hydrocarbon Receptor from the Yeast *Malassezia furfur*, Induces Apoptosis in Primary Human Melanocytes: *Chembiochem* 6: 880-865, 2005
- 45) Kroemer, G: The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis, *Nat. Med.* 6: 614-620, 1997
- 46) Lahav, R, Heffner, G, Patterson, PH: An endothelin receptor B antagonist inhibits growth and induces cell death in human melanoma cells in vitro and in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 96 (20), 11496-11500, 1999
- 47) Leibold, W, Bridge, S: ⁷⁵Se-release: a short and long term assay system for cellular cytotoxicity: *Z. Immunitätsforschung* 155 (4), 287-311, 1979
- 48) Leveen, P, Betsholtz, C, Westermarck, B: Negative trans-acting controlling expression of platelet-derived growth factor A and B mRNA in somatic cell hybrids *Experim.cell res.* 207: 283-289, 1993
- 49) Li, H, Zhu, H, Xu, CJ, Yuan, J: Cleavage of BID by Caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis, *Cell* 94, 491-501, 1998
- 50) Lindsten, T, Ross, AJ, King, A, Zong, WX, et al.: The combined functions of proapoptotic Bcl-2 family members bak and bax are essential for normal development of multiple tissues, *Mol. Cell* 6(6): 1389-1399, 2000

- 51) Luo, X, Budihardjo, I, Zou, H, Slaughter, C, Wang, X: Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrom c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors, *Cell* 94 (4): 481-490, 1998
- 52) Lutz, RJ: Role of BH3 (Bcl-2 homology 3) domain in the regulation of apoptosis and Bcl-2- related proteins, *Biochem. Soc. Trans.* 28 (2): 51-56, 2000
- 53) Madesh, M, Zong, WX, Hawkins, BJ, et al.: Excetution of superoxide-induced cell death by the proapoptotic Bcl-2 related proteins Bid and Bak, *Mol. Cell.Biol.* 29 (11): 3099-3112, 2009
- 54) Martin, A, Clynes, M: Acid phosphatase: endpoint for in vitro toxicity tests, in *Vitro Cell Dev.Biol.* 27A: 183-184, 1991
- 55) Martin, JS, Reutelingsperger, CMP, McGahon, AJ, Rader, JA, van Schie RCAA, LaFace, DM, Green, DR: Early distibution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: Inhibition by overexpression of Bcl- 2 and Abl.: *J. Exp. Med.* 183: 1545-1556, 1995
- 56) Masanet, J, Gomez-Lechon, MJ, Castell, JV: Hepatic toxicity of paraquat in primary cultures of rat hepatocytes, *Toxicol in vitro* 2: 275-282, 1988
- 57) Mayser, P, Imkampe, A, Winkeler, M, Papavassilis, C: Growth requirements and nitrogen metabolism of *Malassezia furfur*, *Arch. Dermatol. Res.* 290:277-282, 1998a
- 58) Mayser P, Lang S, Hort W (2008) Pathogenicity of *Malassezia* Yeasts. In: Brakhage A, Zipfel P (Hrsg.): *The Mycota VI: Human and animal relationships.* 2. Aufl.; Springer Verlag, Heidelberg S. 115-154
- 59) Mayser, P, Wille, G, Imkampe, A, Thoma, W, Arnold, N, Monsees, T: Synthesis of fluorochromes and pigments in *Malassezia furfur* by use of tryptophan as single nitrogen source, *Mycoses* 41:265-271, 1998b
- 60) McCurrach, ME, Connor, TMF, Knudson, CM, Korsemeier, SJ, Lowe, SW: Bax-deficiency promotes drug resistance and oncogenic transformation by attenuating p53-dependent apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (6): 2345- 2349, 1997
- 61) Midgley, G: The diversity of *Pityrosporum orbiculare* (*Malassezia*) yeasts in vivo and in vitro, *Mycopathologia* 106: 143-153, 1989

- 62) Montgomery JP, Patterson, PH: Endothelin receptor B antagonists decrease glioma cell viability independently of their cognate receptor, *BMC Cancer* 8 (354), 1471-2407, 2008
- 63) Moore, G, Gerner, RE, Franklin, HA: Culture of normal human leukocytes, *JAMA* 199:519-524, 1967
- 64) Nagat, S: Apoptosis by death factor, *Cell* 88 (3): 355-365, 1997
- 65) N'Diaye, M, Le Ferrec, E, Lagadic-Gossman, D, et al.: Aryl hydrocarbon receptor-and calcium-dependent induction of the chemokine CCL1 by the environmental contaminant Benzo-[a]pyrene, *J.Biol. Chem.* 281(29): 19906-19915, 2006
- 66) Nechushtan, A, Smith, CL, Lamensdorf, I, Yoon, SH, Youle, RJ: Bax and Bak coalesce into novel mitochondria-associated clusters during apoptosis, *J. Cell Biol.* 153 (6): 1265-1276, 2001
- 67) Öberg, M, Bergander, L, Hakansson, H, Rannug, U, Rannug, A: Identification of Tryptophan Photoproduct 6-Formylindolo[3,2-*b*]carbazole, in cell culture medium, as a factor that controls the background Aryl Hydrocarbon Receptor activity, *Toxicol. Science* 85, 935-943, 2005
- 68) Oldham, RK, Ortaldo, JR, Holden, HT, Herberman, RB: Direct comparison of three isotopic release microtoxicity assays as measures of cell-mediated immunity to Gross virus-induced lymphomas in rats: *J. Natl. Cancer Inst.* 58 (4):1061-1067, 1977
- 69) Parks, DR, Bryan, VM, Oi, VT, Herzenberg, LA: Antigen-specific identification and cloning of hybridomas with a fluorescence-activated cell sorter, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 76(4): 1962-1966, 1979
- 70) Puga, A, Xia, Y, Elferink, C: Role of an aryl hydrocarbon receptor in cell cycle regulation, *Chem. Biol. Interact.* 141: 117-130, 2002
- 71) Puzanov, I, Flaherty, KT., Targeted molecular therapy in melanoma, *Semin Cutan Med Surg* 29 (3); 196-201, 2010
- 72) Qiagen, RNeasy Mini Handbook, 4th Edition, 4/2006
- 73) Raynal, P, Pollard HB: The problem of assessing the biological role for a gene family of multifunctional calcium and phospholipid-binding proteins, *Biochimica and Biophysica Acta* 1197:63-93, 1994

- 74) Reichrath, J, Rech, M, Moeini, M, Meese, E, Tilgen, W, Seifert, M: In vitro comparison of the vitamin D endocrine system in 1,25(OH)₂D₃-responsive and resistant melanoma cells, *Cancer Biol. Ther.* 4: 6, 2007
- 75) Rohmsdahl, MM, Cox, IS: Biologic aspects of pigment cells and malignant melanoma, Year book medical publishers, Chigago 251-277, 1976
- 76) Roche: Cytotoxicity Detection Kit, Instruction Manual, Version 6, 5/ 2004
- 77) Salas, A, Zhu, L, Canchez, C, et al.: Deciphering the late steps in the biosynthesis of the anti-tumorindolocarbazole staurosporine: sugar donor substrate flexibility of the StaGglycyltransferase, *Mol.Microbiol.* 58 (1): 17-27, 2005
- 78) Salvesen, GS, Ratus, M: Apoptosome: the seven-spoked death machine, *Dev. Cell* 2 (3): 256-257, 2002b
- 79) Sartorius, U, Schmitz, I, Krammer, PH: Molecular mechanism of death-receptor-mediated apoptosis, *Chembiochem.* 2 (1): 20-29, 2001
- 80) Slee, EA, Harte, MT, Kluck, RM, Wolf, BB, et al.: Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspase 2, 3, 6, 7, 8, and 10 in a caspase 9-dependent manner, *J. Cell Biol.* 144 (2): 281-292, 1999
- 81) Stang, A, Staberow, R, Eisinger, B, Jöckel, KH: Site-and gender-specific time trend analyses of the induce of skin melanomas in the former German Democratic Republic (GDR) including 19351 cases, *Eur. J. Cancer* 39 (11): 1610-1618, 2003
- 82) Strasser, A, Harris, AW, Jacks, T, Cory, S: DNA damage can induce apoptosis proliferating lymphoid cells via p53-independent mechanisms inhibitable by Bcl-2, *Cell* 79: 329-339, 1994
- 83) Strasser, A, O'Connor, L, Dixit, VM: Apoptosis Signaling, *Annu. Rev. Biochem.* 69: 217-245, 2000
- 84) Szekeres, J, Pacsa, AS, Pejtsik, B: Measurement of lymphocyte cytotoxicity by assessing endogenous alkaline phosphatase activity of the target cells, *J.Immun. Methods* 40 (2): 151-154, 1981
- 85) Taylor, BL, Zhulin, B: PAS domains: Internal sensors of oxygen, redox potential, and light, *Microbiol. Mol, Biol. Rev.* 63: 479-506, 1999
- 86) Thies, A, Mauer, S, Fodstad, O, Schumacher, U: Clinically proven markers of metastatic spread of human melanoma cells engrafted in scid mice, *Brit. Journ. of Cancer* 96: 609-616, 2007

- 87) Thoma, W., Tryptophanstoffwechsel von *Malassezia furfur*: Isolierung des ersten Metaboliten Malassezin, Giessener elektronische Bibliothek <http://geb.uni-giessen.de/geb/volltexte/1418>, 2004
- 88) Vaux, DL, Cory, S, Adams, JM: Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells, Nature 335: 440–442, 1988
- 89) Vermes, I, Haanen, C, Steffens-Nakken, H, Reutelingsperger C: A novel assay apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptosis cells using fluorescein labelled Annexin V: J. Immunol. Meth. 184:39-51, 1995
- 90) Volkenandt, M.: Maligne Melanom in: Dermatologie und Venerologie , Braun-Falco, O (Hrsg.) Springer Verlag, 1313-1324, 2005
- 91) Wallach, D. Kovalenko, AV, Varfolomeev, EE, Boldin, MB: Curr. Opin. Immunol. 10: 279-288, 1998
- 92) Wei, MC, Zong, WX, Cheng, EH, Lindsten, T, et al.: Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death, Science 292 (5517): 727-730, 2001
- 93) Westermarck, B, Johnsson, A, et al.: Human melanoma cell lines of primary and metastatic origin express the genes encoding the chains of platelet- derived growth factor (PDGF) and produce PDGF-like growth factor, Proc. Natl. Acad. Sci. Biochem. 83: 7197-7200, 1986
- 94) Whyllie, AH, Kerr, JFR, Currie, AR: Cell death: the significance of apoptosis, Int. Rev. Cytol. 68: 251-306, 1980
- 95) Wiecker, TS, Luther, H, Buettner, P, Bauer, J, Garbe, C: Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood, Cancer 97: 628-638, 2003
- 96) Wille, G, Mayser, P, Thoma, W, et al.: Malassezin-a novel agonist of the Arylhydrocarbon receptor from the yeast *Malassezia furfur*, Bioorg. and med. chem. 9: 955-960, 2001
- 97) Yuhas, JM, Toya, RE, Pazimino, NH: Neuraminidase and cell viability: failure to detect cytotoxic effects with dye-exclusion techniques: J. Nat. Cancer Inst. 53 (2): 465-468, 1974

98) Zhang, X, Gillespie, SK, Hersey, P: Staurosporine induces apoptosis of melanoma by both caspase-dependent and – independent apoptotic pathways, Mol.Cancer Ther. 3 (2): 187-197, 2004

10. Tabellenanhang

Tabelle 22: zu Abbildung 5: LDH-Vorversuch: MeWo, 24h

low control								
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Mittelwert	Stabw
3000	0,333	0,373	0,312	0,229	0,205	0,193	0,274	0,075
4000	0,354	0,381	0,346	0,237	0,207	0,192	0,286	0,083
5000	0,359	0,390	0,394	0,243	0,214	0,198	0,299	0,091
6000	0,341	0,424	0,316	0,246	0,222	0,197	0,291	0,085
7000	0,349	0,405	0,407	0,261	0,236	0,221	0,313	0,085
8000	0,451	0,419	0,428	0,318	0,250	0,224	0,348	0,098
9000	0,376	0,440	0,446	0,293	0,259	0,227	0,340	0,094
high control								
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Mittelwert	Stabw
3000	0,978	1,199	1,613	0,986	0,649	0,477	0,983	0,403
4000	1,237	1,488	1,821	1,225	0,768	0,603	1,190	0,450
5000	1,460	1,635	2,260	1,308	0,895	0,706	1,377	0,555
6000	1,688	1,911	2,560	1,479	1,048	0,834	1,587	0,621
7000	1,937	2,235	2,892	1,802	1,174	0,987	1,838	0,699
8000	2,144	2,433	3,253	1,792	1,304	1,050	1,996	0,801
9000	2,228	2,635	3,297	2,176	1,451	1,154	2,157	0,779

Anmerkung: Wert 1-6 sind bereits die Mittelwerte der einzelnen Messungen in Mehrfach-Bestimmung

Tabelle 23: zu Abbildung 5: LDH-Vorversuch: MeWo, 48h

low control								
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Mittelwert	Stabw
3000	0,353	0,387	0,421	0,271	0,253	0,203	0,315	0,085
4000	0,379	0,439	0,455	0,332	0,262	0,203	0,345	0,099
5000	0,401	0,458	0,542	0,579	0,268	0,203	0,408	0,149
6000	0,381	0,527	0,554	0,327	0,301	0,221	0,385	0,131
7000	0,452	0,501	0,552	0,381	0,320	0,241	0,408	0,116
8000	0,463	0,537	0,683	0,486	0,346	0,245	0,460	0,152
9000	0,472	0,572	0,689	0,460	0,335	0,251	0,463	0,158
high control								
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Mittelwert	Stabw
3000	0,819	1,311	1,647	0,901	0,751	0,530	0,993	0,410
4000	0,971	1,612	2,100	1,067	0,815	0,657	1,203	0,546
5000	1,155	1,989	2,430	1,135	0,965	0,743	1,403	0,657
6000	1,397	2,150	2,769	1,417	1,139	0,879	1,625	0,703
7000	1,476	2,648	2,876	1,695	1,211	1,030	1,822	0,766
8000	1,611	2,833	3,168	1,606	1,507	1,083	1,968	0,830
9000	1,698	2,971	3,111	2,187	1,734	1,259	2,160	0,744

Tabelle 24: LDH-Vorversuch: MeWo, 72h

low control								
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Mittelwert	Stabw
3000	0,403	0,382	0,433	0,339	0,330	0,220	0,351	0,075
4000	0,508	0,422	0,496	0,811	0,365	0,227	0,471	0,195
5000	0,473	0,495	0,882	0,523	0,393	0,242	0,501	0,212
6000	0,507	0,636	2,005	0,459	0,442	0,261	0,718	0,642
7000	0,556	0,513	1,532	0,499	0,464	0,278	0,640	0,447
8000	0,678	0,550	0,837	0,651	0,530	0,282	0,588	0,186
9000	0,760	0,604	1,457	0,640	0,503	0,320	0,714	0,393
high control								
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Mittelwert	Stabw
3000	0,841	1,142	1,399	1,051	0,963	0,503	0,983	0,301
4000	1,045	1,437	1,777	1,378	1,125	0,561	1,220	0,414
5000	1,136	1,714	2,192	1,444	1,321	0,616	1,404	0,532
6000	1,361	1,773	2,496	1,629	1,567	0,812	1,606	0,550
7000	1,553	2,251	2,797	1,963	1,828	0,892	1,880	0,643
8000	1,778	2,310	3,015	1,588	1,906	1,022	1,936	0,676
9000	1,740	2,619	3,028	1,621	2,068	1,254	2,055	0,662

Tabelle 25: LDH-Vorversuch: MeWo, 96h

low control								
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Mittelwert	Stabw
3000	0,506	0,451	1,547	0,426	0,413	0,271	0,602	0,469
4000	0,963	0,502	2,161	1,505	0,467	0,305	0,984	0,723
5000	0,617	0,961	2,806	2,494	0,978	0,344	1,367	1,026
6000	0,837	1,553	2,787	0,599	1,464	0,430	1,278	0,867
7000	0,771	0,631	2,637	0,699	0,675	0,386	0,967	0,829
8000	2,385	0,703	1,972	0,942	1,156	0,415	1,262	0,763
9000	1,997	0,832	3,117	0,906	0,673	0,440	1,327	1,029
high control								
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Mittelwert	Stabw
3000	0,959	1,127	1,398	1,026	0,969	0,516	0,999	0,287
4000	1,155	1,483	1,891	1,378	1,224	0,620	1,292	0,419
5000	1,411	1,380	2,197	1,502	1,426	0,696	1,435	0,476
6000	1,646	1,951	2,522	1,785	1,669	0,851	1,737	0,541
7000	1,815	2,294	2,762	2,087	1,937	1,010	1,984	0,581
8000	2,086	2,388	2,861	2,148	2,137	1,080	2,116	0,584
9000	2,496	2,605	3,089	1,595	2,374	1,216	2,229	0,693

Tabelle 26: LDH-Vorversuch: MeWo, 120h

low control							
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Mittelwerte	Stabw
3000	0,582	0,341	2,079	0,358	0,271	0,726	0,765
4000	1,701	0,390	2,270	0,391	0,305	1,011	0,912
5000	0,793	1,229	2,221	1,601	0,344	1,238	0,724
6000	1,345	1,754	2,646	2,055	0,430	1,646	0,829
7000	1,107	0,505	2,606	1,026	0,386	1,126	0,885
8000	2,539	0,578	2,412	0,993	0,415	1,387	1,016
9000	2,945	0,880	3,027	0,694	0,440	1,597	1,278
high control							
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Mittelwerte	Stabw
3000	1,113	0,588	0,884	0,643	0,606	0,767	0,228
4000	1,365	0,720	1,066	0,757	0,760	0,933	0,279
5000	1,587	0,811	1,242	0,920	0,881	1,088	0,324
6000	1,766	0,924	1,492	1,089	0,971	1,248	0,366
7000	1,989	1,152	1,666	1,196	1,152	1,431	0,380
8000	2,210	1,207	1,987	1,470	1,176	1,610	0,467
9000	2,414	1,442	2,246	1,589	1,440	1,826	0,468

Tabelle 27: LDH-Vorversuch: MeWo, 144h

low control								
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Mittelwert	Stabw
3000	0,725	0,498	2,169	0,442	0,607	0,547	0,831	0,663
4000	2,055	0,843	2,476	1,878	0,833	0,899	1,497	0,727
5000	1,183	2,253	2,348	2,323	2,368	1,227	1,950	0,579
6000	2,137	2,458	2,937	0,647	2,428	1,370	1,996	0,839
7000	1,677	1,173	2,854	0,719	1,626	1,143	1,532	0,737
8000	2,627	1,046	2,784	1,463	1,608	1,192	1,786	0,740
9000	4,213	2,561	3,150	1,495	1,523	1,117	2,343	1,191
high control								
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Mittelwert	Stabw
3000	1,117	0,700	0,832	0,968	0,716	0,637	0,828	0,184
4000	1,314	0,849	1,053	1,144	0,873	0,809	1,007	0,199
5000	1,683	1,029	1,168	1,316	0,883	0,919	1,166	0,300
6000	2,057	1,167	1,360	1,509	1,119	1,114	1,387	0,363
7000	2,241	1,395	1,628	1,699	1,228	1,235	1,571	0,382
8000	2,483	1,503	1,878	1,924	1,168	1,366	1,720	0,475
9000	2,575	1,716	2,246	2,397	1,679	1,574	2,031	0,426

Tabelle 28: zu Abbildung 6: LDH-Vorversuch: WM115, 24h

low control								
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Mittelwert	Stabw
3000	0,187	0,139	0,212	0,332	0,236	0,204	0,218	0,064
4000	0,214	0,130	0,226	0,359	0,278	0,194	0,233	0,078
5000	0,205	0,147	0,239	0,374	0,223	0,210	0,233	0,076
6000	0,235	0,149	0,251	0,331	0,252	0,217	0,239	0,059
7000	0,232	0,167	0,249	0,352	0,251	0,218	0,245	0,061
8000	0,249	0,152	0,238	0,371	0,266	0,221	0,249	0,071
9000	0,259	0,197	0,258	0,390	0,263	0,220	0,265	0,067
high control								
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Mittelwert	Stabw
3000	0,374	0,272	0,707	0,675	0,581	0,405	0,502	0,177
4000	0,796	0,332	1,023	1,110	1,301	0,460	0,837	0,380
5000	1,066	0,396	1,187	1,665	0,824	0,535	0,946	0,464
6000	1,188	0,324	1,372	1,846	0,945	0,626	1,050	0,543
7000	1,322	0,483	1,524	2,008	1,048	0,703	1,181	0,558
8000	1,503	0,508	1,605	2,329	1,227	0,734	1,318	0,655
9000	1,360	0,508	1,676	2,685	1,325	0,926	1,413	0,742

Tabelle 29: zu Abbildung 6: LDH-Vorversuch: WM115, 48h

low control								
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Mittelwert	Stabw
3000	0,205	0,153	0,283	0,360	0,271	0,209	0,247	0,073
4000	0,252	0,147	0,311	0,383	0,366	0,220	0,280	0,090
5000	0,308	0,166	0,311	0,407	0,301	0,234	0,288	0,081
6000	0,318	0,164	0,310	0,400	0,320	0,228	0,290	0,082
7000	0,328	0,404	0,336	0,409	0,333	0,241	0,342	0,061
8000	0,388	0,165	0,337	0,446	0,314	0,234	0,314	0,102
9000	0,394	0,207	0,356	0,434	0,344	0,243	0,330	0,087
high control								
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Mittelwert	Stabw
3000	0,371	0,306	0,720	0,684	0,618	0,425	0,521	0,175
4000	0,791	0,361	1,024	1,182	1,312	0,490	0,860	0,381
5000	1,064	0,425	1,048	1,657	0,826	0,575	0,932	0,436
6000	1,184	0,456	1,338	1,867	0,948	0,630	1,070	0,511
7000	1,186	0,540	1,546	2,160	1,050	0,698	1,196	0,592
8000	1,483	0,626	1,641	2,493	1,232	0,778	1,376	0,674
9000	1,664	0,676	1,739	2,639	1,318	0,872	1,485	0,705

Tabelle 30: LDH-Vorversuch: WM115, 72h

low control								
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Mittelwert	Stabw
3000	0,220	0,145	0,266	0,379	0,324	0,241	0,262	0,082
4000	0,305	0,145	0,279	0,417	0,864	0,248	0,376	0,255
5000	0,458	0,165	0,265	0,455	0,371	0,352	0,344	0,114
6000	0,399	0,159	0,268	0,470	0,389	0,271	0,326	0,114
7000	0,395	0,477	0,292	0,507	0,377	0,287	0,389	0,091
8000	0,501	0,165	0,301	0,582	0,408	0,291	0,375	0,153
9000	0,495	0,316	0,366	0,550	0,841	0,413	0,497	0,189
high control								
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Mittelwert	Stabw
3000	0,320	0,270	0,668	0,678	0,502	0,475	0,485	0,170
4000	0,661	0,293	0,935	1,131	1,233	0,521	0,795	0,366
5000	0,907	0,350	1,121	1,679	0,726	0,606	0,898	0,464
6000	1,055	0,381	1,278	1,902	0,723	0,607	0,991	0,549
7000	1,144	0,492	1,488	2,229	0,951	0,818	1,187	0,609
8000	1,389	0,532	1,573	2,371	1,105	0,851	1,303	0,642
9000	1,451	0,694	1,785	2,701	1,175	1,021	1,471	0,708

Tabelle 31: LDH-Vorversuch: WM115, 98h

low control								
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Mittelwert	Stabw
3000	0,251	0,167	0,337	0,494	0,452	0,322	0,337	0,122
4000	0,366	0,169	0,343	0,582	1,331	0,323	0,519	0,419
5000	0,581	0,223	0,349	0,601	0,580	0,715	0,508	0,183
6000	0,594	0,227	0,339	0,790	0,689	0,433	0,512	0,216
7000	0,448	0,544	0,418	0,838	0,576	0,420	0,541	0,160
8000	0,825	0,227	0,502	1,043	0,652	0,446	0,616	0,290
9000	0,721	0,497	0,616	0,914	1,212	1,257	0,869	0,314
high control								
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Mittelwert	Stabw
3000	0,343	0,292	0,807	0,683	0,529	0,516	0,528	0,196
4000	0,755	0,322	1,012	1,149	1,285	0,540	0,844	0,371
5000	0,977	0,395	1,189	1,678	0,758	0,627	0,937	0,455
6000	1,093	0,413	1,229	1,952	0,878	0,656	1,037	0,536
7000	1,190	0,532	1,489	2,201	0,954	0,649	1,169	0,615
8000	1,428	0,575	1,648	2,422	1,138	0,855	1,344	0,653
9000	1,530	0,684	1,849	2,710	1,144	0,974	1,482	0,729

Tabelle 32: LDH-Vorversuch: WM115, 120h

low control							
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Mittelwert	Stabw
3000	0,302	0,222	0,550	0,385	0,435	0,379	0,125
4000	0,447	0,221	0,680	1,296	0,455	0,620	0,411
5000	0,830	0,479	0,745	0,596	1,123	0,755	0,246
6000	0,974	0,350	0,770	0,632	0,738	0,693	0,228
7000	0,713	0,566	0,805	0,603	0,599	0,657	0,099
8000	1,224	0,365	1,243	0,686	1,016	0,907	0,377
9000	1,165	0,715	1,482	1,289	1,989	1,328	0,465
high control							
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Mittelwert	Stabw
3000	0,362	0,305	0,701	0,448	0,446	0,452	0,152
4000	0,828	0,340	0,992	1,066	0,555	0,756	0,304
5000	1,077	0,401	1,159	0,611	0,567	0,763	0,335
6000	1,162	0,450	1,380	0,738	0,670	0,880	0,381
7000	1,347	0,512	1,497	0,848	0,754	0,991	0,415
8000	1,557	0,497	1,799	0,845	0,797	1,099	0,552
9000	1,688	0,617	1,902	1,049	0,814	1,214	0,557

Tabelle 33: LDH-Vorversuch: WM115, 144h

low control						
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Mittelwert	Stabw
3000	0,333	0,793	0,473	0,666	0,566	0,203
4000	0,610	1,078	1,411	0,722	0,955	0,364
5000	0,965	1,086	0,827	1,316	1,048	0,207
6000	1,174	1,234	0,869	1,171	1,112	0,164
7000	1,375	1,272	0,841	1,072	1,140	0,236
8000	1,508	1,492	0,888	1,611	1,375	0,329
9000	1,417	1,717	1,832	2,184	1,787	0,317
high control						
Zellen/well	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Mittelwert	Stabw
3000	0,372	0,835	0,418	0,478	0,526	0,210
4000	0,850	1,148	0,990	0,613	0,900	0,227
5000	1,092	1,330	0,570	0,698	0,922	0,351
6000	1,217	1,518	0,686	0,771	1,048	0,391
7000	1,307	1,539	0,775	0,822	1,111	0,373
8000	1,552	1,682	0,917	0,861	1,253	0,424
9000	1,684	2,045	0,968	1,010	1,427	0,527

Tabelle 34: zu Abbildung 7: LDH: MeWo Malassezin, 4h

Konzentration von Malassezin in μM	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Mittelwert	Stabw
0	0,169	0,166	0,275	0,246	0,214	0,055
3,125	0,173	0,168	0,249	0,237	0,207	0,042
6,25	0,175	0,169	0,227	0,237	0,202	0,035
12,5	0,169	0,17	0,25	0,236	0,206	0,043
25	0,168	0,168	0,184	0,222	0,186	0,025
50	0,167	0,173	0,222	0,217	0,195	0,029
Triton-X-100	0,69	0,777	1,062	1,174	0,926	0,229

Tabelle 35: zu Abbildung 7: LDH: MeWo Malassezin, 6h

Konzentration von Malassezin in μM	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Mittelwert	Stabw
0	0,173	0,172	0,26	0,251	0,214	0,048
3,125	0,17	0,171	0,238	0,224	0,201	0,035
6,25	0,175	0,18	0,229	0,224	0,202	0,028
12,5	0,174	0,178	0,235	0,223	0,203	0,031
25	0,178	0,155	0,196	0,211	0,185	0,024
50	0,171	0,189	0,21	0,218	0,197	0,021
Triton-X-100	0,563	0,789	0,815	0,041	0,552	0,359

Tabelle 36: zu Abbildung 7: LDH: MeWo Malassezin, 8h

Konzentration von Malassezin in μM	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Mittelwert	Stabw
0	0,179	0,18	0,226	0,332	0,229	0,072
3,125	0,154	0,167	0,243	0,239	0,201	0,047
6,25	0,19	0,176	0,239	0,235	0,210	0,032
12,5	0,183	0,17	0,236	0,183	0,193	0,029
25	0,194	0,175	0,228	0,231	0,207	0,027
50	0,196	0,182	0,215	0,236	0,207	0,023
Triton-X-100	0,584	0,753	0,973	1,099	0,852	0,229

Tabelle 37: zu Abbildung 7: LDH: MeWo Malassezin, 12h

Konzentration von Malassezin in μM	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Mittelwert	Stabw
0	0,2	0,18	0,268	0,268	0,229	0,046
3,125	0,195	0,136	0,25	0,264	0,211	0,058
6,25	0,173	0,17	0,252	0,248	0,211	0,045
12,5	0,184	0,201	0,247	0,263	0,224	0,037
25	0,163	0,172	0,239	0,23	0,201	0,039
50	0,173	0,176	0,231	0,235	0,204	0,034
Triton-X-100	0,603	0,635	1,214	1,294	0,937	0,368

Tabelle 38: zu Abbildung 8: LDH: WM115 Malassezin, 4h

Konzentration von Malassezin in μM	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Mittelwert	Stabw
0	0,176	0,175	0,287	0,239	0,219	0,047
3,125	0,172	0,184	0,262	0,237	0,214	0,037
6,25	0,16	0,18	0,241	0,24	0,205	0,036
12,5	0,174	0,18	0,29	0,206	0,213	0,046
25	0,168	0,186	0,256	0,238	0,212	0,036
50	0,177	0,186	0,291	0,25	0,226	0,047
Triton-X-100	0,69	1,556	1,98	1,475	1,425	0,466

Tabelle 39: zu Abbildung 8: LDH: WM115 Malassezin, 6h

Konzentration von Malassezin in μM	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Mittelwert	Stabw
0	0,163	0,166	0,275	0,265	0,217	0,061
3,125	0,169	0,183	0,259	0,241	0,213	0,044
6,25	0,179	0,181	0,247	0,245	0,213	0,038
12,5	0,169	0,194	0,255	0,262	0,220	0,046
25	0,157	0,191	0,239	0,237	0,206	0,039
50	0,167	0,187	0,257	0,249	0,215	0,045
Triton-X-100	0,749	1,526	1,732	0,048	1,014	0,771

Tabelle 40: zu Abbildung 8: LDH: WM115 Malassezin, 8h

Konzentration von Malassezin in μM	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Mittelwert	Stabw
0	0,163	0,196	0,264	0,29	0,228	0,059
3,125	0,165	0,185	0,241	0,242	0,208	0,039
6,25	0,168	0,199	0,217	0,236	0,205	0,029
12,5	0,174	0,181	0,269	0,173	0,199	0,047
25	0,161	0,196	0,25	0,262	0,217	0,047
50	0,158	0,172	0,287	0,259	0,219	0,064
Triton-X-100	0,754	1,125	1,71	1,443	1,258	0,412

Tabelle 41: zu Abbildung 8: LDH: WM115 Malassezin, 12h

Konzentration von Malassezin in μM	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Mittelwert	Stabw
0	0,162	0,247	0,29	0,266	0,241	0,056
3,125	0,152	0,202	0,284	0,261	0,225	0,060
6,25	0,147	0,2	0,277	0,268	0,223	0,061
12,5	0,159	0,213	0,286	0,293	0,238	0,064
25	0,148	0,193	0,274	0,276	0,223	0,063
50	0,178	0,165	0,26	0,177	0,195	0,044
Triton-X-100	2,609	1,655	1,582	1,089	1,734	0,635

Tabelle 42: zu Abbildung 9: LDH: MeWo Staurosporin und Malassezin, 4h

Konzentration der Substanzen in μM	Staurosporin	Malassezin
0	0,174	0,152
3,125	0,151	0,146
6,25	0,142	0,148
12,5	0,153	0,144
25	0,143	0,147
50	0,142	0,149
Triton-X-100	0,597	0,597

Tabelle 43: zu Abbildung 9: LDH: MeWo Staurosporin und Malassezin, 6h

Konzentration der Substanzen in μM	Staurosporin	Malassezin
0	0,185	0,159
3,125	0,151	0,151
6,25	0,143	0,158
12,5	0,148	0,154
25	0,137	0,147
50	0,144	0,133
Triton-X-100	0,563	0,563

Tabelle 44: zu Abbildung 9: LDH: MeWo Staurosporin und Malassezin, 8h

Konzentration der Substanzen in μM	Staurosporin	Malassezin
0	0,18	0,171
3,125	0,155	0,145
6,25	0,148	0,148
12,5	0,159	0,155
25	0,142	0,15
50	0,15	0,148
Triton-X-100	0,584	0,584

Tabellen 45: zu Abbildung 10: LDH: WM115 Staurosporin und Malassezin, 4h

Konzentration der Substanzen in μM	Staurosporin	Malassezin
0	0,147	0,178
3,125	0,148	0,135
6,25	0,147	0,15
12,5	0,153	0,168
25	0,128	0,153
50	0,174	0,149
Triton-X-100	0,69	0,69

Tabelle 46: zu Abbildung 10: LDH: WM115 Staurosporin und Malassezin, 6h

Konzentration der Substanzen in μM	Staurosporin	Malassezin
0	0,186	0,151
3,125	0,144	0,148
6,25	0,147	0,148
12,5	0,151	0,152
25	0,148	0,139
50	0,153	0,156
Triton-X-100	0,749	0,749

Tabelle 47: zu Abbildung 10: LDH: WM115 Staurosporin und Malassezin, 8h

Konzentration der Substanzen in μM	Staurosporin	Malassezin
0	0,168	0,145
3,125	0,146	0,144
6,25	0,152	0,151
12,5	0,149	0,155
25	0,15	0,151
50	0,142	0,153
Triton-X-100	0,754	0,754

Tabelle 48: zu Abbildung 11: LDH: MeWo Malassezin, ANF u.Malassezin+ ANF, 24h

Konzentration der Substanz in μM	Malassezin	Naphtoflavin	M+N
0	0,290	0,69	0,690
0,019	0,367	0,352	0,156
0,039	0,198	0,221	0,210
0,078	0,217	0,229	0,195
0,156	0,184	0,24	0,202
0,313	0,285	0,379	0,308
0,625	0,265	0,443	0,237
1,25	0,186	0,208	0,228
2,5	0,230	0,179	0,234
5	0,161	0,28	0,210
10	0,173	0,237	0,199
Triton-X-100	1,533	1,533	1,533

Tabelle 49: zu Abbildung 12:MeWo: LDH von Malassezin, ANF u.Malassezin+ ANF, 48h

Konzentration der Substanz in μM	Malassezin	Naphtoflavin	M+N
0	0,368	0,368	0,368
0,095	0,382	0,470	0,397
0,19	0,294	0,361	0,368
0,39	0,311	0,302	0,371
0,78	0,256	0,348	0,277
1,56	0,397	0,631	0,880
3,13	0,389	0,480	0,572
6,25	0,295	0,414	0,380
12,5	0,279	0,312	0,281
25	0,241	0,265	0,280
50	0,554	0,406	0,555
Triton-X-100	1,520	1,520	1,520

Tabelle 50: zu Abbildung 13: LDH: WM115 Malassezin, ANF u. Malassezin+ ANF, 48h

Konzentration der Substanz in μM	M 1	M 2	Naphto 1	Naphto 2	M+N 1	M+N 2
0	0,245	0,245	0,245	0,245	0,245	0,245
0,095	0,231	0,234	0,243	0,232	0,269	0,243
0,19	0,239	0,22	0,251	0,285	0,248	0,249
0,39	0,233	0,237	0,25	0,246	0,243	0,242
0,78	0,207	0,23	0,236	0,242	0,232	0,239
1,56	0,267	0,308	0,231	0,304	0,328	0,28
3,13	0,243	0,233	0,202	0,252	0,252	0,266
6,25	0,230	0,241	0,186	0,252	0,283	0,236
12,5	0,219	0,258	0,226	0,263	0,27	0,197

Konzentration der Substanz in μM	Mi-Wert M	Mi-Wert N	Mi-Wert M+N	Stabw M	Stabw N
0	0,245	0,245	0,245	0,000	0,000
0,095	0,233	0,238	0,256	0,002	0,008
0,19	0,230	0,268	0,249	0,013	0,024
0,39	0,235	0,248	0,243	0,003	0,003
0,78	0,219	0,239	0,236	0,016	0,004
1,56	0,288	0,268	0,304	0,029	0,052
3,13	0,238	0,227	0,259	0,007	0,035
6,25	0,236	0,219	0,260	0,008	0,047
12,5	0,239	0,245	0,234	0,028	0,026
25	0,238	0,220	0,235	0,006	0,050
50	0,229	0,209	0,300	0,006	0,039
Triton-X-100	1,103	1,103	1,103	0,000	0,000

Tabelle 51: zu Abbildung 14: LDH: WM115 Malassezin, ANF u. Malassezin+ ANF, 96h

Konzentration der Substanzen in μM	Malassezin	Naphtoflavon	M+N
0	1,297	1,297	1,297
0,095	0,289	0,34	0,299
0,190	0,301	0,339	0,296
0,390	0,293	0,306	0,268
0,780	0,286	0,234	0,287
1,560	0,392	0,366	0,327
3,125	0,289	0,308	0,306
6,25	0,306	0,302	0,302
12,5	0,250	0,305	0,310
25	0,299	0,27	0,329
50	0,304	0,302	0,665
Triton-X-100	1,044	1,044	1,044

Tabelle 52: zu Abbildung 19: Facs MeWo, 4h

Facs-Analytik: MeWo, Nekrose nach 4h							
Malassezin- Konz. (µM)	Nekrose %					Mittelwert	Stabw
0	1,66	1,8	3,33	2,57	1,46	2,164	0,776
3,125	2,03	1,18	2,64	1,96	1,51	1,864	0,555
6,25	1,6	2,73	2	1,18	1,28	1,758	0,631
12,5	1,47	1,34	1,4	1,7	0,39	1,260	0,505
25	1,77	2,28	1,31	2,82	0,31	1,698	0,959
50	3,15	1,68	2,46	2,06	0,27	1,924	1,073

Facs-Analytik: MeWo, Apoptose nach 4h							
Malassezin- Konz. (µM)	Apoptose %					Mittelwert	Stabw
0	42,69	37	29,63	42,44	42,52	38,856	5,691
3,125	44,2	33,2	31,11	36,83	38,12	36,684	5,051
6,25	46,56	34,7	32,68	26,93	41,8	36,526	7,727
12,5	42,69	36,9	28,16	25,17	31,12	32,816	7,027
25	76,04	75,7	37,07	30,52	38,74	51,608	22,347
50	85,5	87,3	48,23	33,43	54,95	61,884	23,708

Facs-Analytik: MeWo, vitale Zellen nach 4h							
Malassezin- Konz. (µM)	vitale Zellen %					Mittelwert	Stabw
0	55,65	61,2	29,63	54,99	56,02	51,498	12,472
3,125	53,77	65,7	31,11	61,21	60,37	54,424	13,708
6,25	51,86	62,6	32,68	71,83	56,92	55,180	14,601
12,5	55,84	61,7	28,16	73,13	68,49	57,468	17,653
25	22,19	22	37,07	66,66	60,95	41,778	21,112
50	11,59	11	48,23	64,51	44,78	36,024	23,769

Tabelle 53: zu Abbildung 19: Facs MeWo, 6h

Facs-Analytik: MeWo, Nekrose nach 6h							
Malassezin- Konz. (µM)	Nekrose %					Mittelwert	Stabw
0	7,77	1,17	1,2	2,85	1,4	2,878	2,822
3,125	2,81	0,9	1,45	1,36	1,84	1,672	0,719
6,25	2,32	1,07	0,76	0,69	0,73	1,114	0,691
12,5	1,33	0,63	2,16	0,79	0,8	1,142	0,627
25	1,43	0,75	1,36	1,01	0,43	0,996	0,419
50	2,05	1,03	1,66	1,19	0,71	1,328	0,529

Facs-Analytik: MeWo, Apoptose nach 6h							
Malassezin- Konz. (µM)	Apoptose %					Mittelwert	Stabw
0	46,13	29,5	29,97	39,4	41,93	37,386	7,388
3,125	50,77	29,87	35,73	25,38	44,28	37,206	10,367
6,25	46,55	39,84	29,66	24,85	61,18	40,416	14,380
12,5	58,33	52,26	40,01	25,49	26,97	40,612	14,703
25	84,64	80,33	50,89	34,58	40,21	58,130	23,042
50	90,99	90,89	46,66	41,4	64,58	66,904	23,564

Facs-Analytik: MeWo, vitale Zellen nach 6h							
Malassezin- Konz. (µM)	vitale Zellen %					Mittelwert	Stabw
0	46,1	69,33	68,83	57,75	56,67	59,736	9,670
3,125	46,42	69,2	62,82	73,26	53,88	61,116	11,001
6,25	51,13	59,09	69,58	74,46	38,09	58,470	14,566
12,5	40,34	47,11	57,83	73,72	72,23	58,246	14,831
25	13,93	18,92	47,75	64,41	59,36	40,874	23,189
50	6,96	8,08	51,68	57,41	34,71	31,768	23,660

Tabelle 54: zu Abbildung 19: Facs MeWo, 8h

Facs-Analytik: MeWo, Nekrose nach 8h							
Malassezin- Konz. (µM)	Nekrose %					Mittelwert	Stabw
0	4,18	0,91	0,65	5,7	0,15	2,318	2,468
3,125	3,16	1,05	0,76	2,13	0,24	1,468	1,171
6,25	1,57	1,08	0,47	0,64	0,18	0,788	0,545
12,5	0,61	0,78	0,73	0,34	0,21	0,534	0,249
25	0,85	0,72	0,46	0,56	0,18	0,554	0,257
50	1,53	2,87	0,68	0,99	0,2	1,254	1,024

Facs-Analytik: MeWo, Apoptose nach 8h							
Malassezin-Konz.(µM)	Apoptose%					Mittelwert	Stabw
0	59,94	29,33	36,75	53,28	25,06	40,872	15,147
3,125	48,98	40,08	35,15	45,82	28,39	39,684	8,251
6,25	65,69	42,87	29,84	38,05	22,04	39,698	16,563
12,5	64,77	54,04	32,04	27,09	22,05	39,998	18,459
25	86,68	83,83	40	25,23	39,83	55,114	28,178
50	91,21	87,42	53,85	51,11	63,71	69,460	18,769

Facs-Analytik: MeWo, vitale Zellen nach 8h							
Malassezin- Konz. (µM)	vitale Zellen %					Mittelwert	Stabw
0	35,88	69,8	62,6	41	74,79	56,810	17,406
3,125	47,86	58,9	64,09	52,1	71,37	58,848	9,371
6,25	32,74	56,1	69,69	60,4	77,78	59,338	17,079
12,5	34,62	45,2	67,23	72,6	77,74	59,468	18,624
25	12,47	15,5	59,54	74,2	59,99	44,332	28,366
50	7,26	9,71	45,47	47,9	36,09	29,286	19,513

Tabellen 55: Facs MeWo, 12h

Facs-Analytik: MeWo, Nekrose nach 12h						
Malassezin- Konz. (µM)	Nekrose %				Mittelwert	Stabw
0	4,77	2,65	5,32	2,98	3,930	1,314
3,125	3,33	3,74	1,14	1,56	2,443	1,284
6,25	2,25	2,41	1,99	0,4	1,763	0,925
12,5	1,17	1,86	1,05	1,14	1,305	0,373
25	0,95	0,97	1,35	1,12	1,098	0,185
50	1,38	1,01	1,4	1,26	1,263	0,179

Facs-Analytik: MeWo, Apoptose nach 12h						
Malassezin- Konz. (µM)	Apoptose %				Mittelwert	Stabw
0	57,58	55,35	42,59	46,4	50,480	7,142
3,125	6,67	53,46	30,7	40,06	32,723	19,721
6,25	51,95	54,02	25,29	26,43	39,423	15,690
12,5	42,2	41,68	33,86	29,21	36,738	6,304
25	46,28	40,95	43,13	39,55	42,478	2,932
50	46,25	53,37	50,83	49,95	50,100	2,948

Facs-Analytik: MeWo, vitale Zellen nach 12h						
Malassezin- Konz. (µM)	vitale Zellen %				Mittelwert	Stabw
0	37,65	42	52,09	50,62	45,590	6,916
3,125	90	42,8	68,16	58,38	64,835	19,761
6,25	45,8	43,57	72,72	73,17	58,815	16,342
12,5	56,63	56,46	65,09	69,65	61,958	6,522
25	52,77	58,08	55,52	59,33	56,425	2,907
50	52,37	45,62	47,77	48,79	48,638	2,817

Tabelle 56: zu Abbildung 25: Facs WM115, 4h

Facs-Analytik: WM115, Nekrose nach 4h								
Malassezin- Konz. (µM)	Nekrose %					Mittelwert	Stabw	
0	1,16	0,73	1,87	2,38	1,02	1,432	0,676	
3,125	0,9	0,59	1,62	0,87	1,11	1,018	0,384	
6,25	0,61	0,33	1,26	0,68	0,99	0,774	0,359	
12,5	0,73	0,47	0,93	2,12	0,83	1,016	0,640	
25	0,42	0,35	1,91	0,92	2,52	1,224	0,956	
50	0,422	0,47	1,41	0,7	1,64	0,928	0,561	

Facs-Analytik: WM115, Apoptose nach 4h								
Malassezin- Konz. (µM)	Apoptose %					Mittelwert	Stabw	
0	6,84	9,69	16,79	15,1	13,6	12,412	4,073	
3,125	6,32	8,33	19,62	10,67	13	11,578	5,138	
6,25	5,75	6,9	19,75	10,43	14,4	11,436	5,734	
12,5	4,99	6,96	19,05	11,19	13,6	11,158	5,566	
25	5,46	6,15	24,26	14,56	14,4	12,960	7,663	
50	5,35	7,45	27,93	21,51	24,7	17,394	10,316	

Facs-Analytik: WM115, vitale Zellen nach 4h								
Malassezin- Konz. (µM)	vitale Zellen %					Mittelwert	Stabw	
0	92	89,58	81,34	82,52	85,34	86,156	4,554	
3,125	92,78	91,08	78,76	88,46	85,94	87,404	5,486	
6,25	93,64	92,77	78,99	88,89	84,66	87,790	6,072	
12,5	94,28	92,57	80,02	86,71	85,57	87,830	5,732	
25	94,12	93,5	73,83	84,52	83,11	85,816	8,377	
50	94,21	92,08	70,66	77,79	73,63	81,674	10,800	

Tabelle 57: zu Abbildung 25: Facs WM115, 6h

Facs-Analytik: WM115, Nekrose nach 6h							
Malassezin- Konz. (µM)	Nekrose %					Mittelwert	Stabw
0	4,2	0,9	0,9	0,8	1,51	1,662	1,446
3,125	1,29	0,61	0,85	1,76	2,08	1,318	0,612
6,25	1,06	0,53	0,94	0,63	1,28	0,888	0,308
12,5	0,51	0,25	1,44	1,45	1,04	0,938	0,543
25	0,75	0,33	1,16	1,02	1,67	0,986	0,496
50	2,4	1,01	6,51	0,71	1,32	2,390	2,390

Facs-Analytik: WM115, Apoptose nach 6h							
Malassezin-Konz. (µM)	Apoptose %					Mittelwert	Stabw
0	10,39	5,29	10,1	14,31	14,99	11,016	3,894
3,125	11,08	6,63	7,78	18,81	12,81	11,422	4,818
6,25	14,06	10,81	12,35	9,49	15,36	12,414	2,372
12,5	25,41	15,75	10,68	12,86	14,78	15,896	5,661
25	49,62	38,66	13,24	18,51	19,48	27,902	15,504
50	78,61	74,49	56,01	26,97	29,69	53,154	24,226

Facs-Analytik: WM115, vitale Zellen nach 6h							
Malassezin- Konz. (µM)	vitale Zellen %					Mittelwert	Stabw
0	85,41	93,81	89	84,89	83,5	87,322	4,156
3,125	87,63	92,76	91,37	79,43	85,1	87,260	5,320
6,25	84,88	88,66	86,71	89,88	83,4	86,698	2,666
12,5	74,08	84	87,88	85,69	84,2	83,166	5,312
25	49,63	61,01	85,6	80,47	78,9	71,112	15,173
50	18,99	24,5	37,42	72,32	69	44,444	24,873

Tabelle 58: zu Abbildung 25: Facs WM115, 8h

Facs-Analytik: WM115, Nekrose nach 8h								
Malassezin- Konz. (µM)	Nekrose %						Mittelwert	Stabw
0	0,38	0,35	0,85	1,98	0,93		0,898	0,660
3,125	0,57	0,11	0,81	1,15	0,8		0,688	0,384
6,25	0,29	0,27	1,41	0,45	0,76		0,636	0,475
12,5	0,42	0,37	0,74	0,53	0,58		0,528	0,145
25	0,36	0,37	0,86	0,4	0,42		0,482	0,213
50	0,92	0,82	0,56	0,42	0,82		0,708	0,209

Facs-Analytik: WM115, Apoptose nach 8h								
Malassezin- Konz. (µM)	Apoptose %						Mittelwert	Stabw
0	12,95	11,35	9,89	12,46	14,2		12,170	1,634
3,125	18,34	7,5	11,27	11,92	13,72		12,550	3,951
6,25	18,44	12,6	10,66	13,69	14,54		13,986	2,882
12,5	29,4	21,31	15,04	13,71	16,31		19,154	6,409
25	52,88	47,01	21,3	14,57	22,63		31,678	17,080
50	80,62	81,94	23,03	26,25	33,25		49,018	29,686

Facs-Analytik: WM115, vitale Zellen nach 8h								
Malassezin- Konz. (µM)	vitale Zellen %						Mittelwert	Stabw
0	86,67	88,3	89,26	85,56	84,87		86,932	1,837
3,125	81,09	92,39	87,92	86,93	85,48		86,762	4,088
6,25	81,27	87,13	87,93	85,86	84,7		85,378	2,605
12,5	70,18	78,32	84,22	85,76	83,11		80,318	6,313
25	46,76	52,62	77,84	85,03	76,95		67,840	16,989
50	18,46	17,24	76,41	73,33	65,93		50,274	29,846

Tabelle 59: Facs WM115, 12h

Facs-Analytik: WM115, Nekrose nach 12h						
Malassezin- Konz. (µM)	Nekrose %				Mittelwert	Stabw
0	1,18	0,91	1,52	2,03	1,410	0,483
3,125	0,66	0,88	0,79	0,55	0,720	0,145
6,25	0,48	0,49	0,66	0,57	0,550	0,084
12,5	0,35	0,49	0,51	0,94	0,573	0,255
25	0,39	0,34	0,63	0,4	0,440	0,129
50	0,29	0,48	0,7	0,96	0,608	0,289

Facs-Analytik: WM115, Apoptose nach 12h						
Malassezin- Konz. (µM)	Apoptose %				Mittelwert	Stabw
0	6,9	10,72	12,72	17,48	11,955	4,404
3,125	8,95	10,88	15,53	14,64	12,500	3,108
6,25	9,3	10,08	11,6	16,07	11,763	3,026
12,5	11	10,08	12,84	18,66	13,145	3,852
25	11,94	11,67	14,83	55,92	23,590	21,601
50	19,34	13,63	15,32	27,87	19,040	6,355

Facs-Analytik: WM115, vitale Zellen nach 12h						
Malassezin- Konz. (µM)	vitale Zellen %				Mittelwert	Stabw
0	91,92	88,37	85,73	80,49	86,628	4,814
3,125	90,39	88,24	83,68	84,81	86,780	3,091
6,25	90,22	89,43	87,74	83,36	87,688	3,065
12,5	88,65	89,43	86,65	80,4	86,283	4,093
25	87,67	87,99	84,54	43,68	75,970	21,583
50	80,37	85,89	83,98	71,17	80,353	6,536

Tabelle 60: zu Abbildung 27:Facs MeWo ANF 4-12h

Facs-Analytik: MeWo, α -Naphtoflavon nach 4h			
α - Naphtoflavon- Konz. (μ M)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	4,09	28,28	67,63
3,125	3,69	37,02	59,29
6,25	2,52	31,86	65,62
12,5	1,89	25,62	72,49
25	2,2	26,99	70,81
50	2,28	24,18	73,54

Facs-Analytik: MeWo, α -Naphtoflavon nach 6h			
α - Naphtoflavon- Konz. (μ M)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	6,9	20,46	72,64
3,125	7,43	31,79	60,78
6,25	5,16	23,06	71,78
12,5	2,24	25,43	72,34
25	2,07	21,1	76,83
50	1,64	30,33	68,03

Facs-Analytik: MeWo, α -Naphtoflavon nach 8h			
α - Naphtoflavon- Konz. (μ M)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	1,47	28,64	69,89
3,125	1,84	24,36	73,8
6,25	1,75	26,16	72,09
12,5	2,14	28,34	69,52
25	2,1	34,49	63,41
50	2,22	35,26	62,52

Facs-Analytik: MeWo, α -Naphtoflavon nach 12h			
α - Naphtoflavon- Konz. (μ M)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	2,58	31,86	65,56
3,125	2,01	28,33	69,66
6,25	1,79	24,24	73,97
12,5	3,65	32,14	64,21
25	2,76	33,91	63,33
50	3,66	36,63	59,71

Tabelle 61: zu Abbildung 28: Facs MeWo Malassezin+ ANF 4-12h

Facs-Analytik: MeWo α -Naphtoflavon und Malassezin nach 4h			
α - Naphtoflavon- Konz. (μ M)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	8,01	27,44	64,55
3,125	6,6	64,54	28,86
6,25	3,75	61,56	34,69
12,5	4,39	62,53	33,08
25	5,33	68,02	26,65
50	3,38	70,56	26,06

Facs-Analytik: MeWo α -Naphtoflavon und Malassezin nach 6h			
α - Naphtoflavon- Konz. (μ M)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	6,71	28,16	65,13
3,125	5,3	58,46	36,24
6,25	3,43	63,06	33,51
12,5	3,14	67,11	29,75
25	2,53	65,25	32,22
50	1,63	72,72	25,65

Facs-Analytik: MeWo α -Naphtoflavon und Malassezin nach 8h			
α - Naphtoflavon- Konz. (μ M)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	3,75	36,96	59,29
3,125	4,55	70,43	25,02
6,25	2,76	71,05	26,19
12,5	2,87	70,94	26,19
25	5,92	78,81	15,27
50	2,43	81,78	15,79

Facs-Analytik: MeWo α -Naphtoflavon und Malassezin nach 12h			
α - Naphtoflavon- Konz. (μ M)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	0,85	23,09	76,06
3,125	1,82	74,51	23,67
6,25	1,85	79,77	18,38
12,5	1,82	81,36	16,82
25	2,41	84,8	12,79
50	2,01	88,81	9,18

Tabelle 62: zu Abbildung 29: Facs WM115 ANF 4-12h

Facs-Analytik: WM115, α -Naphtoflavon nach 4h			
α - Naphtoflavon- Konz. (μ M)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen%
0	1,81	11,03	87,16
3,125	1,52	7,39	91,09
6,25	1,49	9,34	89,17
12,5	1,54	9,61	88,85
25	1,53	10,74	87,73
50	1,96	10,54	87,5

Facs-Analytik: WM115, α -Naphtoflavon nach 6h			
α - Naphtoflavon- Konz. (μ M)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	1,53	11,46	87,01
3,125	1,4	9,82	88,78
6,25	1,66	18,82	79,52
12,5	2,23	12,42	85,35
25	3,35	12,85	83,8
50	1,67	9,33	89

Facs-Analytik: WM115, α -Naphtoflavon nach 8h			
α - Naphtoflavon- Konz. (μ M)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	2,04	2,64	95,32
3,125	2,05	14,11	83,84
6,25	1,76	10,87	87,37
12,5	2,77	12,69	84,54
25	1,23	11,52	87,25
50	1,39	12,81	85,8

Facs-Analytik: WM115, α -Naphtoflavon nach 12h			
α - Naphtoflavon- Konz. (μ M)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	4,95	21,36	73,69
3,125	4,41	18,1	77,49
6,25	1,55	13,7	84,75
12,5	2,67	14,98	82,35
25	2,63	18,51	78,86
50	1,62	12,91	85,47

Tabelle 63: zu Abbildung 30: Facs WM115 Malassezin+ ANF 4-12h

Facs-Analytik: WM115, α -Naphtoflavon und Malassezin nach 4h

Konzentrationen 1:1 (μ M)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	3,78	8,52	87,7
3,125	4,84	31,1	64,06
6,25	4,69	31,51	63,8
12,5	3,64	32,26	64,1
25	2,48	34,02	63,5
50	1,63	32,16	66,21

Facs-Analytik: WM115, α -Naphtoflavon und Malassezin nach 6h

Konzentrationen 1:1 (μ M)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	1,47	10,31	88,22
3,125	3,1	31,75	65,15
6,25	3,38	25,59	71,03
12,5	4,09	34,17	61,74
25	5,05	26,5	68,45
50	2,5	31,87	65,63

Facs-Analytik: WM115, α -Naphtoflavon und Malassezin nach 8h

Konzentrationen 1:1 (μ M)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen%
0	3,65	9,01	87,34
3,125	2,16	29,64	68,2
6,25	2,01	29,37	68,62
12,5	2,58	29,55	67,87
25	2,21	29,9	67,89
50	1,28	30,37	68,35

Facs-Analytik: WM115, α -Naphtoflavon und Malassezin nach 12h

Konzentrationen 1:1 (μ M)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	1,94	14,06	84
3,125	3,21	25,63	71,16
6,25	3,46	37,09	59,45
12,5	2,98	34,32	62,7
25	4,24	33,46	62,3
50	2,24	39,49	58,27

Tabelle 64: zu Abbildung 31: MeWo Zytotoxizität Staurosporin nach 4, 6, 8h

Facs-Analytik: MeWo, Staurosporin nach 4h			
Staurosporin- Konz. (μM)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	1,89	44,75	53,36
3,125	1,49	30,01	68,5
6,25	0,84	12,16	87
12,5	0,79	25,07	74,14
25	1,74	31,34	66,92
50	1,35	21,15	77,5

Facs-Analytik: MeWo, Staurosporin nach 6h			
Staurosporine- Konz. (μM)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	0,43	31,43	68,14
3,125	0,76	39,17	60,07
6,25	0,55	25,9	73,55
12,5	0,82	28,89	70,29
25	1,02	31,12	67,86
50	1,91	51,69	46,4

Facs-Analytik: MeWo, Staurosporin nach 8h			
Staurosporin- Konz. (μM)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	0,63	28,04	71,33
3,125	0,65	27,17	72,18
6,25	0,75	37,05	62,2
12,5	1,8	50,64	47,56
25	0,74	27,67	71,59
50	0,84	29,02	70,14

Tabelle 65: zu Abbildung 32: WM115 Zytotoxizität Staurosporin nach 4, 6, 8h

Facs-Analytik: WM115, Staurosporin nach 4h			
Staurosporin- Konz. (μM)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	1,73	16,34	81,93
3,125	0,6	15,14	84,26
6,25	0,51	10,62	88,87
12,5	0,82	12,68	86,5
25	0,54	13,46	86
50	0,67	27,92	71,41

Facs-Analytik: WM115, Staurosporin nach 6h			
Staurosporin- Konz. (μM)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	0,94	11,09	87,97
3,125	0,42	12,36	87,22
6,25	0,38	12,54	87,08
12,5	1,04	12,63	86,33
25	0,35	15,75	83,9
50	1,21	29,09	69,7

Facs-Analytik: WM115, Staurosporin nach 8h			
Staurosporin- Konz. (μM)	Nekrose %	Apoptose %	vitale Zellen %
0	0,89	18,38	80,73
3,125	0,24	17,49	82,27
6,25	0,57	23,52	75,91
12,5	0,43	20,7	78,87
25	0,66	23,32	76,02
50	7,44	39,71	52,85

Tabelle 66: WM115, Vorversuch 1, komplette Resultat der RT-PCR nach $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode

Gene	Well	Sample	Sample	Sample	Fold change	T-TEST
		1	2	2		
		exp1	exp1	exp2		
ABL1	A01	35,0000	35,0000	35,0000	-1,86	N/A
AKT1	A0	18,0965	20,7900	17,7 66	1,	0,5106
APAF1	A03	20,8719	23,1960	21,6760	1 62	0,17 8
BAD	A04	23,0210	25,3695	23,0483	1,25	0,4137
BAG1	A05	21,7253	23,3228	21,7907	-1,03	0,3912
BAG3	A06	21,1795	23,7565	20,2773	-1,02	0,6778
BAG4	A07	20,4521	24,0513	20,6061	2,01	0,3897
BAK1	A08	22,0108	23,3667	21,1223	-1,55	0,8543
BAX	A09	17,9802	19,6418	18,2280	1,06	0,3094
BCL10	A10	20,2050	22,0478	20,1295	1,01	0,4542
BCL2	A11	22,0970	24,8377	24,2409	2,98	0,0146
BCL2A1	A12	19,9236	22,5574	19,4279	1,15	0,5650
BCL2L1	B01	18,6095	20,8518	20,2282	2,09	0,0251
BCL2L10	B02	28,1270	31,3269	30,1155	3,31	0,0504
BCL2L11	B03	25,2170	27,3825	24,9660	1,06	0,5113
BCL2L2	B04	22,9107	25,0767	22,1818	-1,11	0,6688
BCLAF1	B05	18,2242	21,5595	18,1926	1,72	0,4299
BFAR	B06	18,7285	21,3396	18,8966	1,44	0,3732
BID	B07	20,3617	22,1076	19,9280	-1,16	0,6083
BIK	B08	25,5652	28,3371	25,1777	1,25	0,5292
BIRC1	B09	26,7069	29,7878	27,2770	1,94	0,2831
BIRC2	B10	19,2623	21,7889	20,3029	1,89	0,1384
BIRC3	B11	23,2080	26,5179	24,2249	2,46	0,1998
BIRC4	B12	20,5294	22,7228	20,2415	1,06	0,5228
BIRC6	C01	20,4894	22,8799	20,5536	1,28	0,4020
BIRC8	C02	26,6765	35,0000	29,5829	26,86	0,1739
BNIP1	C03	22,3999	24,3730	22,6732	1,19	0,3172

BNIP2	C04	18,3406	21,0201	18,4623	1,45	0,3877
BNIP3	C05	19,6742	22,2509	19,4253	1,23	0,4966
BNIP3L	C06	18,0936	20,9502	18,0314	1,44	0,4394
BRAF	C07	23,8164	26,9995	24,3914	2,02	0,2863
CARD4	C08	23,2532	25,1561	22,6170	-1,18	0,6673
CARD6	C09	24,2030	26,1967	23,5583	-1,14	0,6600
CARD8	C10	20,4772	22,7795	21,2505	1,59	0,1819
CASP1	C11	22,0258	23,2838	20,3089	-2,14	0,8916
CASP10	C12	26,5081	31,1202	27,6132	3,98	0,2446
CASP14	D01	33,7858	35,0000	35,0000	1,25	N/A
CASP2	D02	19,2866	21,5318	19,5852	1,32	0,3213
CASP3	D03	18,6066	21,3611	18,9209	1,59	0,3355
CASP4	D04	18,3233	21,3261	18,4127	1,60	0,3997
CASP5	D05	26,8182	32,7226	28,0404	6,48	0,2674
CASP6	D06	20,7239	23,4875	21,6427	1,96	0,1840
CASP7	D07	21,0514	23,9373	21,0566	1,49	0,4213
CASP8	D08	22,3713	24,6626	21,2860	-1,20	0,7551
CASP9	D09	25,2177	27,0550	24,1331	-1,41	0,8208
CD40	D10	26,2377	29,5011	27,7416	2,86	0,1135
CD40LG	D11	31,1898	37,1228	33,6486	4,81	0,0435
CFLAR	D12	19,8935	22,5485	20,0842	1,47	0,3675
CIDEA	E01	28,0463	35,0000	28,1549	6,34	0,4106
CIDEB	E02	29,3966	37,6491	30,0218	4,75	0,3374
CRADD	E03	22,0659	24,0003	22,0836	1,08	0,4156
DAPK1	E04	24,5161	26,3962	24,3343	-1,01	0,4967
DFFA	E05	18,8013	21,0220	19,2158	1,37	0,2820
FADD	E06	19,5074	21,4610	19,5775	1,11	0,3950
FAS	E07	21,3294	24,2051	21,5749	1,62	0,3572
FASLG	E08	29,3905	30,6502	26,9134	-2,78	0,7755
GADD45A	E09	19,0793	21,2352	19,2095	1,21	0,3763
HRK	E10	27,1138	30,2457	26,9851	1,55	0,4543
IGF1R	E11	20,1183	22,3067	19,9194	1,09	0,4923
LTA	E12	29,7947	33,9052	29,0639	1,77	0,5574

LTBR	F01	17,9490	20,7104	18,2110	1,56	0,3500
MCL1	F02	18,0814	20,8168	18,1236	1,44	0,4108
NOL3	F03	25,0153	26,9224	23,8143	-1,43	0,8414
PYCARD	F04	26,8724	28,3643	25,1534	-1,97	0,9501
RIPK2	F05	22,4365	25,1681	22,7922	1,60	0,3234
TNF	F06	26,9832	30,4046	26,8561	1,72	0,4512
TNFRSF10A	F07	24,8490	28,1462	25,8907	2,47	0,1943
TNFRSF10B	F08	18,4737	20,7404	17,6110	-1,12	0,6976
TNFRSF11B	F09	23,3552	25,1355	22,1235	-1,51	0,8723
TNFRSF1A	F10	20,9741	24,6075	20,9114	1,89	0,4359
TNFRSF21	F11	19,0521	21,0244	17,3825	-1,64	0,9413
TNFRSF25	F12	28,0484	30,6209	25,2494	-1,97	0,9702
TNFRSF7	G01	28,1288	29,6939	27,0686	-1,53	0,8652
TNFRSF9	G02	27,0516	31,3784	28,2612	3,73	0,2177
TNFSF10	G03	28,2010	35,0000	28,2158	5,69	0,4210
TNFSF7	G04	22,8516	25,0385	22,7376	1,12	0,4627
TNFSF8	G05	29,2938	33,7193	29,0877	2,37	0,4585
TP53	G06	17,7003	20,5240	18,1925	1,73	0,2909
TP53BP2	G07	22,1459	24,9403	22,5414	1,66	0,3150
TP73	G08	26,8938	31,1018	28,1549	3,65	0,2046
TRADD	G09	22,6878	24,0478	21,5284	-1,70	0,9438
TRAF2	G10	21,3026	24,0055	22,1688	1,89	0,1915
TRAF3	G11	20,2448	22,0150	20,0584	-1,05	0,5032
TRAF4	G12	18,5047	20,5469	18,5547	1,13	0,4038
18S rRNA	H01	35,0000	35,0000	35,0000	-1,86	N/A
HPRT1	H02	19,9155	22,3052	20,8647	1,74	0,1463
RPL13A	H03	18,2989	21,0476	18,3529	1,45	0,4075
GAPDH	H04	13,6720	14,9115	13,7037	-1,17	0,4030
ACTB	H05	13,1343	14,4729	13,3621	-1,06	0,2939
ACTB	H06	14,8753	17,3024	15,1951	1,42	0,3223
ACTB	H07	17,3146	20,4518	18,0869	2,12	0,2401
ACTB	H08	20,4003	23,7002	21,1543	2,23	0,2523
ACTB	H09	23,9791	26,8652	24,2638	1,64	0,3471

ACTB	H10	26,5434	34,7148	27,5535	13,21	0,3283
ACTB	H11	31,3958	35,0000	28,1764	-1,63	0,9602
ACTB	H12	35,0000	35,0000	35,0000	-1,86	N/A

Tabelle 67: WM115, Vorversuch 2, komplette Resultat der RT-PCR nach $\Delta\Delta\text{Ct}$ Methode

Gene	Well	Sample	Sample	Sample	Fold change	T-TEST
		1	2	2		
		exp1	exp1	exp2		
ABL1	A01	35,0000	35,0000	35,0000	-1,77	N/A
AKT1	A02	18,3873	18,5639	20,79	1,38	0,3662
APAF1	A03	21,1485	20,6669	23,196	-1,03	,5989
BAD	A 4	22,6717	23,0187	25,3695	1,63	0,3246
BAG1	A05	22,0446	22,2677	23,3228	-1,05	0,2907
BAG3	A06	21,3461	20,2643	23,7565	-1,11	0,7402
BAG4	A07	20,2578	19,8144	24,0513	1,81	0,5120
BAK1	A08	22,0614	21,8485	23,3667	-1,21	0,5465
BAX	A09	17,2730	17,4920	19,6418	1,39	0,3518
BCL10	A10	19,3933	20,0828	22,0478	1,81	0,2309
BCL2	A11	22,6189	22,3354	24,8377	1,11	0,5202
BCL2A1	A12	18,6080	18,5192	22,5574	2,16	0,4400
BCL2L1	B01	20,1110	20,0133	20,8518	-1,41	0,5233
BCL2L10	B02	29,6307	29,2379	31,3269	-1,12	0,5964
BCL2L11	B03	25,5491	24,0005	27,3825	-1,60	0,9406
BCL2L2	B04	23,3810	22,6479	25,0767	-1,26	0,7302
BCLAF1	B05	18,5144	17,4710	21,5595	1,13	0,6729
BFAR	B06	18,5511	18,2356	21,3396	1,33	0,5092
BID	B07	19,4872	19,8920	22,1076	1,62	0,3054
BIK	B08	26,7477	25,7785	28,3371	-1,42	0,8311
BIRC1	B09	27,9211	28,2504	29,7878	1,21	0,2894
BIRC2	B10	18,8122	19,2301	21,7889	1,84	0,3158
BIRC3	B11	23,5847	22,5722	26,5179	1,10	0,6745
BIRC4	B12	20,0568	19,4924	22,7228	1,17	0,5821
BIRC6	C01	20,5628	20,5480	22,8799	1,26	0,4276
BIRC8	C02	30,7437	31,9020	35,0000	3,70	0,2226
BNIP1	C03	21,9886	21,7440	24,373	1,19	0,5012

BNIP2	C04	18,2552	17,8370	21,0201	1,28	0,5377
BNIP3	C05	18,8300	19,2326	22,2509	2,13	0,3328
BNIP3L	C06	17,5942	17,0691	20,9502	1,51	0,5416
BRAF	C07	23,6674	23,5732	26,9995	1,74	0,4444
CARD4	C08	23,5987	22,6569	25,1561	-1,43	0,8284
CARD6	C09	23,3627	23,7126	26,1967	1,71	0,3285
CARD8	C10	20,1362	20,5033	22,7795	1,61	0,3170
CASP1	C11	20,5641	20,3358	23,2838	1,34	0,4870
CASP10	C12	27,0075	26,4143	31,1202	1,92	0,5325
CASP14	D01	33,1793	33,5100	35,0000	1,19	0,2856
CASP2	D02	19,4250	19,2931	21,5318	1,12	0,4707
CASP3	D03	18,6263	18,4478	21,3611	1,37	0,4728
CASP4	D04	17,8900	17,1297	21,3261	1,43	0,5890
CASP5	D05	29,1586	37,5227	32,7226	14,75	0,0539
CASP6	D06	21,0122	22,3070	23,4875	2,09	0,0856
CASP7	D07	21,0209	20,6536	23,9373	1,37	0,5188
CASP8	D08	21,0693	20,7503	24,6626	1,76	0,4907
CASP9	D09	24,4979	24,1138	27,055	1,20	0,5370
CD40	D10	27,4541	27,4494	29,5011	1,15	0,4244
CD40LG	D11	32,0485	35,2757	37,1228	4,38	N/A
CFLAR	D12	19,5683	19,2919	22,5485	1,45	0,4937
CIDEA	E01	29,4085	30,1763	35,0000	5,13	0,3181
CIDEB	E02	33,9692	32,2692	37,6491	-2,23	0,8293
CRADD	E03	21,9431	21,1957	24,0003	-1,12	0,6864
DAPK1	E04	24,4581	22,0440	26,3962	-2,08	0,9229
DFFA	E05	18,9697	18,1696	21,022	-1,14	0,7035
FADD	E06	19,6721	20,5480	21,461	1,43	0,1001
FAS	E07	21,2330	20,7384	24,2051	1,34	0,5490
FASLG	E08	28,1196	30,0621	30,6502	2,67	0,0168
GADD45A	E09	18,9127	18,0656	21,2352	-1,06	0,6874
HRK	E10	28,3102	26,7850	30,2457	-1,53	0,9165
IGF1R	E11	19,6261	19,1629	22,3067	1,22	0,5537
LTA	E12	30,1695	29,6022	33,9052	1,70	0,5382

LTBR	F01	17,3541	16,8969	20,7104	1,55	0,5265
MCL1	F02	18,2356	18,3815	20,8168	1,46	0,3792
NOL3	F03	26,1527	25,7175	26,9224	-1,57	0,8074
PYCARD	F04	25,3187	25,7165	28,3643	1,87	0,3231
RIPK2	F05	22,8569	21,4718	25,1681	-1,28	0,8256
TNF	F06	28,2126	27,4419	30,4046	-1,08	0,6788
TNFRSF10A	F07	26,0066	25,0466	28,1462	-1,17	0,7401
TNFRSF10B	F08	18,0410	17,8185	20,7404	1,34	0,4859
TNFRSF11B	F09	23,0330	22,5222	25,1355	-1,02	0,6044
TNFRSF1A	F10	20,4108	20,6312	24,6075	2,62	0,3823
TNFRSF21	F11	18,2980	17,5421	21,0244	1,12	0,6285
TNFRSF25	F12	30,0081	27,9173	30,6209	-2,95	0,6394
TNFRSF7	G01	28,4624	27,0269	29,6939	-1,89	0,9460
TNFRSF9	G02	28,2456	27,5664	31,3784	1,33	0,5858
TNFSF10	G03	28,5144	28,2285	35,0000	4,86	0,4565
TNFSF7	G04	22,0422	23,1785	25,0385	2,37	0,1564
TNFSF8	G05	30,5010	31,4441	33,7193	2,40	0,2089
TP53	G06	18,0178	16,8252	20,524	-1,12	0,7564
TP53BP2	G07	22,1529	21,0230	24,9403	1,01	0,7134
TP73	G08	29,4017	27,6708	31,1018	-1,78	0,9937
TRADD	G09	21,9724	22,1183	24,0478	1,22	0,3687
TRAF2	G10	21,4985	21,5595	24,0055	1,38	0,4039
TRAF3	G11	19,8785	20,1095	22,015	1,29	0,3400
TRAF4	G12	17,6646	18,5541	20,5469	2,09	0,1989
18S rRNA	H01	35,0000	35,0000	35,0000	-1,77	N/A
HPRT1	H02	19,8472	20,2062	22,3052	1,50	0,3116
RPL13A	H03	18,1052	17,4824	21,0476	1,27	0,5820
GAPDH	H04	13,3060	13,4519	14,9115	1,04	0,3530
ACTB	H05	13,1213	13,0795	14,4729	-1,12	0,4464
ACTB	H06	14,5507	14,7186	17,3024	1,56	0,3758
ACTB	H07	17,3255	17,4933	20,4518	1,77	0,3814
ACTB	H08	20,6397	20,8790	23,7002	1,78	0,3627
ACTB	H09	23,7201	23,5075	26,8652	1,57	0,4746

ACTB	H10	27,1274	26,4977	34,7148	6,32	0,4863
ACTB	H11	30,1349	30,5310	38,1153	3,51	0,3602
ACTB	H12	35,0000	35,0000	35,0000	-1,77	N/A

Tabelle 68: zu Abbildung 33: MeWo 3h Inkubationszeit mit 12,5µM Malassezin, komplette Resultate der RT-PCR

Gen	Well	Kontrolle	Test	Test	Fold change	T-
		Sample 1	Sample 2	Sample 2		TEST
		exp1	exp1	exp2	Sample1/Sample2	p value
ABL1	A01	35,0000	35,0000	35,0000	-2,39	N/A
AKT1	A02	18,0434	20,4374	20,5504	2,29	0,0005
APAF1	A03	22,0453	24,2156	24,2164	1,88	0,0000
BAD	A04	23,4417	26,4742	26,0925	3,00	0,0045
BAG1	A05	21,3101	23,5322	23,3090	1,81	0,0028
BAG3	A06	21,2620	22,2585	22,7159	-1,02	0,0331
BAG4	A07	21,6116	22,2751	22,3352	-1,48	0,0019
BAK1	A08	22,8691	26,4047	25,1896	3,19	0,0405
BAX	A09	19,6107	20,8882	20,8193	-1,01	0,0008
BCL10	A10	21,0604	22,8038	22,4116	1,22	0,0157
BCL2	A11	21,1451	22,2468	22,0164	-1,21	0,0134
BCL2A1	A12	23,2375	22,3569	22,3430	-4,42	0,0001
BCL2L1	B01	21,8671	23,5006	23,4403	1,27	0,0004
BCL2L10	B02	29,5546	29,4451	29,9995	-2,13	0,6067
BCL2L11	B03	26,0127	27,0882	27,2221	-1,08	0,0034
BCL2L2	B04	23,4722	26,0500	25,4235	2,01	0,0186
BCLAF1	B05	19,2293	19,1419	19,3448	-2,37	0,9025
BFAR	B06	18,1389	19,8586	19,2157	1,10	0,0490
BID	B07	19,8735	21,7032	21,4497	1,36	0,0055
BIK	B08	27,9173	29,8562	29,0768	1,23	0,0578
BIRC1	B09	29,3917	29,9586	29,2167	-2,09	0,6501
BIRC2	B10	23,9212	23,8827	23,3812	-2,92	0,3679
BIRC3	B11	29,1706	28,5866	29,7787	-2,37	0,9857
BIRC4	B12	20,7222	22,4715	21,9685	1,18	0,0271
BIRC6	C01	21,7860	23,7408	23,1472	1,32	0,0306

BIRC8	C02	30,0463	30,4628	27,8891	-4,37	0,5686
BNIP1	C03	23,1329	24,7205	24,0048	-1,02	0,0752
BNIP2	C04	18,6875	19,6908	19,2375	-1,39	0,0756
BNIP3	C05	17,9033	19,3864	19,0832	1,05	0,0127
BNIP3L	C06	17,0471	18,4046	18,1053	-1,03	0,0150
BRAF	C07	25,5546	25,5127	25,6067	-2,38	0,9235
CARD4	C08	23,7979	26,0519	24,7531	1,27	0,1321
CARD6	C09	28,5740	29,2407	29,0644	-1,60	0,0224
CARD8	C10	24,2246	24,9562	25,0982	-1,37	0,0077
CASP1	C11	27,2917	29,0302	28,3029	1,09	0,0634
CASP10	C12	27,5184	28,5816	28,6305	-1,12	0,0005
CASP14	D01	34,1871	34,6392	34,9156	-1,59	0,0507
CASP2	D02	20,5935	21,2267	21,2290	-1,54	0,0000
CASP3	D03	20,8649	22,4704	21,9894	1,08	0,0297
CASP4	D04	19,1590	20,1489	20,1770	-1,19	0,0002
CASP5	D05	29,7818	30,0719	28,7428	-3,10	0,6299
CASP6	D06	21,5269	24,0436	22,7920	1,55	0,0943
CASP7	D07	21,4110	23,2698	23,1512	1,46	0,0011
CASP8	D08	24,0297	26,0383	25,2963	1,30	0,0477
CASP9	D09	25,2151	26,8663	26,5480	1,18	0,0112
CD40	D10	25,3206	28,2104	27,4745	2,40	0,0206
CD40LG	D11	32,2443	33,3249	32,5877	-1,46	0,1931
CFLAR	D12	22,0962	24,2682	23,8058	1,61	0,0139
CIDEA	E01	33,8598	35,000	31,8942	-3,18	0,8153
CIDEB	E02	29,9857	29,8700	29,6858	-2,76	0,1527
CRADD	E03	23,3921	25,4467	25,1704	1,58	0,0052
DAPK1	E04	20,5262	23,1535	22,7033	2,21	0,0087
DFFA	E05	18,7730	20,1299	19,9346	1,00	0,0060
FADD	E06	18,7318	21,4116	21,0800	2,39	0,0043
FAS	E07	25,9355	27,5557	27,8519	1,43	0,0069
FASLG	E08	29,4474	30,2409	29,5212	-1,77	0,3514
GADD45A	E09	22,0716	23,0581	22,5013	-1,46	0,1260
HRK	E10	22,0208	25,2493	25,2915	3,98	0,0000

IGF1R	E11	19,8086	22,2957	21,9859	2,11	0,0044
LTA	E12	32,0458	35,000	35,000	3,24	N/A
LTBR	F01	18,9915	19,5077	20,0374	-1,39	0,0983
MCL1	F02	20,7158	23,0318	22,6550	1,83	0,0078
NOL3	F03	24,2336	28,0946	27,5865	5,10	0,0049
PYCARD	F04	23,1405	26,1092	25,1820	2,38	0,0326
RIPK2	F05	22,0220	24,3283	23,5423	1,58	0,0397
TNF	F06	27,5588	28,4025	27,2153	-2,01	0,7145
TNFRSF10 A	F07	26,4955	27,4708	27,0665	-1,40	0,0621
TNFRSF10B	F08	20,0207	22,5932	22,0225	2,04	0,0152
TNFRSF11B	F09	26,4124	28,0873	28,1074	1,35	0,0000
TNFRSF1A	F10	24,0897	25,2369	25,5594	1,04	0,0149
TNFRSF21	F11	23,5160	24,5300	24,4995	-1,20	0,0002
TNFRSF25	F12	29,0786	33,1823	32,1863	5,10	0,0185
TNFRSF7	G01	30,1436	30,1906	30,0457	-2,43	0,7589
TNFRSF9	G02	27,9585	28,7716	29,1357	-1,20	0,0319
TNFSF10	G03	31,9098	30,4969	29,5621	-8,79	0,0566
TNFSF7	G04	30,0860	30,5753	30,3603	-1,83	0,0709
TNFSF8	G05	29,9443	30,5703	30,0263	-1,87	0,3228
TP53	G06	19,5655	20,6594	20,5947	-1,14	0,0009
TP53BP2	G07	23,3601	24,0630	24,0299	-1,48	0,0006
TP73	G08	27,6039	28,4801	28,1057	-1,48	0,0665
TRADD	G09	21,2884	24,1514	23,5640	2,48	0,0128
TRAF2	G10	21,8635	24,5695	24,2985	2,49	0,0028
TRAF3	G11	21,0042	23,4013	23,0284	1,94	0,0070
TRAF4	G12	20,5652	24,5757	23,7927	5,14	0,0115
18SrRNA	H01	35,0000	35,000	35,000	-2,39	N/A
HPRT1	H02	20,2013	21,8625	21,8518	1,32	0,0000
RPL13A	H03	16,5713	20,0455	19,3713	3,68	0,0114
GAPDH	H04	14,7079	15,8387	15,5312	-1,21	0,0239
ACTB	H05	14,3531	15,0718	14,6567	-1,68	0,1328

ACTB	H06	16,6003	17,1796	16,8245	-1,81	0,1520
ACTB	H07	19,5084	19,8975	20,0372	-1,74	0,0224
ACTB	H08	22,9177	23,1428	23,7177	-1,67	0,2165
ACTB	H09	26,1665	26,2448	26,6492	-1,97	0,2997
ACTB	H10	29,7663	29,4255	29,9533	-2,52	0,7982
ACTB	H11	35,0000	35,0000	35,0000	-2,39	N/A
ACTB	H12	35,0000	35,0000	35,0000	-2,39	N/A

Tabelle 69: zu Abbildung 34: MeWo 9h Inkubationszeit mit 12,5µM Malassezin, komplette Resultate der RT-PCR

Symbol	Well	Kontrolle	Test	Test	Fold change	T-
		Sample 1	Sample 2	Sample 2		TEST
		exp1	exp1	exp2	Sample1/Sample2	P value
ABL1	A01	35,0000	35,0000	35,0000	1,35	0,6907
AKT1	A02	23,5998	23,0386	20,8827	4,21	0,0040
APAF1	A03	24,8773	25,9078	23,5647	1,49	0,1254
BAD	A04	27,7708	26,5439	24,9193	5,56	0,0029
BAG1	A05	25,4253	27,7946	26,0303	-2,07	0,0036
BAG3	A06	20,2929	21,5514	19,8307	1,03	0,7079
BAG4	A07	24,8327	25,0167	22,9422	2,44	0,0050
BAK1	A08	22,1976	22,3370	20,8714	2,04	0,0403
BAX	A09	21,5121	20,8566	19,5183	3,39	0,0238
BCL10	A10	22,6376	23,0805	21,5541	1,69	0,0537
BCL2	A11	25,4674	28,0258	24,3317	-1,21	0,7881
BCL2A1	A12	24,2981	23,3175	21,8694	4,41	0,0106
BCL2L1	B01	26,0146	24,9433	23,6483	4,45	0,0186
BCL2L10	B02	30,3315	32,8172	30,6164	-1,93	0,0255
BCL2L11	B03	23,9932	25,1851	23,7339	-1,02	0,9000
BCL2L2	B04	22,3220	22,7067	21,3181	1,68	0,0976
BCLAF1	B05	22,0200	23,1934	21,6409	1,03	0,8439
BFAR	B06	20,6302	22,6629	20,3238	-1,35	0,1959
BID	B07	23,1300	24,4749	22,7429	-1,03	0,6373
BIK	B08	30,1754	30,2676	29,0936	1,91	0,1222
NAIP	B09	24,6014	25,5085	24,3422	1,08	0,7883
BIRC2	B10	23,3035	21,7890	21,2733	4,62	0,0849
BIRC3	B11	29,8326	26,5919	26,2721	14,28	0,0395
BIRC4	B12	24,1768	24,8481	23,2700	1,47	0,0718
BIRC6	C01	24,0026	24,6810	23,6728	1,20	0,6148
BIRC8	C02	34,8776	35,0000	32,0664	3,43	0,0761

BNIP1	C03	23,9923	24,4288	22,7626	1,78	0,0178
BNIP2	C04	20,2723	22,0630	19,9367	-1,22	0,1304
BNIP3	C05	19,2573	22,4362	19,4126	-2,35	0,1615
BNIP3L	C06	19,9321	21,6646	19,6272	-1,21	0,0622
BRAF	C07	26,3967	27,0746	25,8230	1,30	0,3540
NOD1	C08	24,9119	25,6136	23,9462	1,48	0,0369
CARD6	C09	27,2012	24,9851	24,7259	6,87	0,0764
CARD8	C10	28,2198	27,0032	26,5429	3,69	0,1193
CASP1	C11	29,4707	23,8016	23,6414	72,72	0,0190
CASP10	C12	35,0475	32,7560	31,3369	10,47	0,0048
CASP14	D01	35,0000	35,0000	36,1211	1,35	0,6907
CASP2	D02	23,9360	24,3683	22,4058	1,98	0,0013
CASP3	D03	23,1877	23,1880	22,2745	1,86	0,2099
CASP4	D04	22,1546	22,3042	21,3913	1,67	0,2687
CASP5	D05	31,6343	32,3602	30,8564	1,38	0,1405
CASP6	D06	23,4073	25,6852	23,3600	-1,60	0,0884
CASP7	D07	23,4598	24,9037	23,1613	-1,10	0,2059
CASP8	D08	26,4188	26,4830	25,5737	1,77	0,2348
CASP9	D09	23,3830	24,2920	23,1064	1,09	0,7684
CD40	D10	26,8183	31,5909	26,0833	-3,00	0,4734
CD40LG	D11	34,4945	35,0000	31,6993	2,99	0,1542
CFLAR	D12	25,3329	24,1533	23,0874	4,43	0,0350
CIDEA	E01	35,0000	31,6990	30,3804	21,04	0,0042
CIDEB	E02	26,7190	27,4335	24,9015	1,98	0,0912
CRADD	E03	21,9643	24,1399	21,7841	-1,48	0,1363
DAPK1	E04	23,0883	27,3138	23,6542	-3,89	0,1568
DFFA	E05	21,8338	23,5248	21,7006	-1,27	0,0094
FADD	E06	22,9792	24,0492	20,9727	1,87	0,2669
FAS	E07	28,2007	24,9365	24,3762	15,77	0,0269
FASLG	E08	33,5067	31,0054	30,3387	9,64	0,0333
GADD45A	E09	25,7803	23,8534	23,0310	6,84	0,0352
HRK	E10	23,1010	31,0120	23,8057	-14,65	0,2823
IGF1R	E11	22,5847	23,6127	22,6877	-1,09	0,8125

LTA	E12	34,5538	32,7676	32,2523	5,57	0,0692
LTBR	F01	20,9998	21,3850	20,0038	1,67	0,1010
MCL1	F02	20,8661	20,0690	19,5310	2,83	0,1568
NOL3	F03	21,6358	23,9964	21,8716	-1,82	0,0178
PYCARD	F04	25,2049	27,6995	25,2871	-1,81	0,0819
RIPK2	F05	22,3922	25,0845	21,9964	-1,64	0,3555
TNF	F06	31,4363	33,1000	30,4613	1,06	0,8309
TNFRSF10 A	F07	29,1959	30,3246	28,8012	1,05	0,7471
TNFRSF10B	F08	22,4242	21,1264	20,1155	4,72	0,0366
TNFRSF11B	F09	28,6568	25,4622	25,2949	13,12	0,0499
TNFRSF1A	F10	28,1856	25,6617	25,1829	9,18	0,0455
TNFRSF21	F11	25,0034	21,1706	21,0597	20,02	0,0399
TNFRSF25	F12	39,0554	30,0464	29,6104	48,73	0,0164
CD27	G01	30,1781	31,2127	29,6023	1,15	0,2809
TNFRSF9	G02	33,9567	34,1751	32,5231	2,06	0,0129
TNFSF10	G03	32,3050	30,1679	30,0331	6,23	0,0952
CD70	G04	30,2358	23,3470	23,1434	171,92	0,0127
TNFSF8	G05	38,2265	35,0000	32,2354	3,52	0,0532
TP53	G06	22,4975	22,2191	21,0004	2,50	0,0590
TP53BP2	G07	22,4730	23,1068	22,0297	1,27	0,4918
TP73	G08	27,1420	28,3427	27,1885	-1,14	0,6598
TRADD	G09	22,2337	23,6019	21,6318	1,04	0,3180
TRAF2	G10	25,8296	26,5061	24,3822	1,77	0,0195
TRAF3	G11	24,2442	24,2983	22,7473	2,23	0,0210
TRAF4	G12	24,2059	22,6992	22,2340	4,51	0,0928
B2M	H01	18,0253	17,9219	16,6277	2,27	0,0580
HPRT1	H02	20,9192	23,5022	20,8312	-1,76	0,1725
RPL13A	H03	16,8510	19,9886	16,7375	-2,11	0,2540
GAPDH	H04	14,9980	15,3750	14,4505	1,43	0,3944
ACTB	H05	14,8260	15,7355	14,4191	1,14	0,5883

Tabelle 70: zu Abbildung 35: MeWo 9h Inkubationszeit mit 12,5µM Malassezin, komplette Resultate der RT-PCR

Symbol	Well	Kontrolle	Test	Test	Fold change	T-
		Sample 1	Sample 2	Sample 2		TEST
		exp1	exp1	exp2	Sample1/Sample 2	p value
ABL1	A01	35,00	35,00	35,00	1,32	0,0126
AKT1	A02	21,45	21,76	23,04	-1,46	0,4534
APAF1	A03	23,87	24,53	25,91	-1,93	0,2791
BAD	A04	25,12	25,16	26,54	-1,26	0,6584
BAG1	A05	27,07	27,57	27,79	-1,15	0,0890
BAG3	A06	21,22	21,74	21,55	-1,02	0,8833
BAG4	A07	23,78	24,07	25,02	-1,29	0,4874
BAK1	A08	22,20	22,29	22,34	1,22	0,0053
BAX	A09	19,87	20,11	20,86	-1,16	0,5766
BCL10	A10	23,02	23,67	23,08	1,03	0,9059
BCL2	A11	27,79	27,08	28,03	1,56	0,2736
BCL2A1	A12	23,07	23,34	23,32	1,10	0,1339
BCL2L1	B01	22,96	24,06	24,94	-2,21	0,1024
BCL2L10	B02	31,68	35,00	32,82	-3,56	0,2486
BCL2L11	B03	25,26	24,78	25,19	1,60	0,0492
BCL2L2	B04	21,97	22,38	22,71	-1,12	0,3002
BCLAF1	B05	23,00	23,47	23,19	1,05	0,7530
BFAR	B06	22,33	22,99	22,66	-1,07	0,6861
BID	B07	23,53	24,24	24,47	-1,34	0,0284
BIK	B08	29,60	30,37	30,27	-1,25	0,0837
NAIP	B09	24,39	25,48	25,51	-1,62	0,0019
BIRC2	B10	20,55	21,76	21,79	-1,77	0,0012
BIRC3	B11	24,08	26,82	26,59	-4,68	0,0051
BIRC4	B12	23,51	24,61	24,85	-1,77	0,0078
BIRC6	C01	24,01	24,45	24,68	-1,12	0,1429
BIRC8	C02	38,77	35,00	35,00	1,32	0,0126

BNIP1	C03	24,07	24,30	24,43	1,08	0,0344
BNIP2	C04	21,63	21,93	22,06	1,03	0,2187
BNIP3	C05	22,03	22,44	22,44	-1,00	0,9537
BNIP3L	C06	21,03	21,45	21,66	-1,09	0,1636
BRAF	C07	26,75	27,12	27,07	1,04	0,5384
NOD1	C08	25,09	25,28	25,61	1,03	0,7606
CARD6	C09	24,43	25,06	24,99	-1,14	0,1501
CARD8	C10	26,08	27,02	27,00	-1,45	0,0109
CASP1	C11	23,21	24,12	23,80	-1,28	0,2291
CASP10	C12	30,72	33,06	32,76	-3,45	0,0122
CASP14	D01	35,00	35,00	35,00	1,32	0,0126
CASP2	D02	23,21	23,64	24,37	-1,31	0,3425
CASP3	D03	22,81	23,19	23,19	1,02	0,6198
CASP4	D04	22,03	22,40	22,30	1,05	0,5187
CASP5	D05	31,65	33,79	32,36	-2,03	0,3113
CASP6	D06	25,32	25,49	25,69	1,10	0,1202
CASP7	D07	24,55	24,76	24,90	1,09	0,0407
CASP8	D08	25,92	26,21	26,48	-1,02	0,7750
CASP9	D09	24,06	24,22	24,29	1,15	0,0015
CD40	D10	31,45	31,23	31,59	1,36	0,0811
CD40LG	D11	33,51	34,88	35,00	-2,04	0,0002
CFLAR	D12	23,25	24,28	24,15	-1,48	0,0358
CIDEA	E01	29,86	31,45	31,70	-2,49	0,0035
CIDEB	E02	25,94	25,70	27,43	-1,17	0,8094
CRADD	E03	23,76	23,93	24,14	1,09	0,1706
DAPK1	E04	27,22	27,52	27,31	1,15	0,2958
DFFA	E05	23,24	23,91	23,52	-1,06	0,7700
FADD	E06	22,88	23,37	24,05	-1,35	0,2817
FAS	E07	24,30	25,00	24,94	-1,20	0,0753
FASLG	E08	30,22	30,91	31,01	-1,26	0,0000
GADD45A	E09	23,48	23,52	23,85	1,15	0,2490
HRK	E10	31,61	30,37	31,01	2,50	0,0404
IGF1R	E11	23,09	23,62	23,61	-1,09	0,1225

LTA	E12	32,36	32,64	32,77	1,04	0,0766
LTBR	F01	21,04	21,13	21,39	1,14	0,1517
MCL1	F02	19,47	19,61	20,07	1,02	0,8833
NOL3	F03	23,79	23,84	24,00	1,21	0,0151
PYCARD	F04	27,54	27,75	27,70	1,16	0,0908
RIPK2	F05	24,98	25,09	25,08	1,22	0,0257
TNF	F06	31,99	31,94	33,10	-1,09	0,8310
TNFRSF10 A	F07	29,49	29,92	30,32	-1,18	0,2700
TNFRSF10 B	F08	20,11	20,59	21,13	-1,27	0,2650
TNFRSF11 B	F09	25,41	25,69	25,46	1,18	0,2705
TNFRSF1A	F10	25,07	25,01	25,66	1,10	0,6766
TNFRSF21	F11	20,16	20,65	21,17	-1,27	0,2476
TNFRSF25	F12	29,17	29,21	30,05	-1,04	0,8882
CD27	G01	30,29	30,83	31,21	-1,26	0,1528
TNFRSF9	G02	35,54	33,33	34,18	3,13	0,0485
TNFSF10	G03	30,34	30,73	30,17	1,22	0,4704
CD70	G04	22,49	23,50	23,35	-1,45	0,0492
TNFSF8	G05	35,00	34,34	35,00	1,66	0,1252
TP53	G06	21,31	21,46	22,22	-1,09	0,7422
TP53BP2	G07	22,37	23,14	23,11	-1,28	0,0297
TP73	G08	28,47	28,89	28,34	1,20	0,4972
TRADD	G09	23,48	23,72	23,60	1,17	0,1723
TRAF2	G10	24,99	25,90	26,51	-1,76	0,0860
TRAF3	G11	22,92	23,70	24,30	-1,59	0,1190
TRAF4	G12	22,04	22,24	22,70	-1,02	0,8661
B2M	H01	17,28	17,28	17,92	1,05	0,8053
HPRT1	H02	22,66	23,52	23,50	-1,37	0,0153
RPL13A	H03	19,58	19,52	19,99	1,17	0,3597
GAPDH	H04	15,40	15,61	15,38	1,24	0,1978
ACTB	H05	15,37	16,13	15,74	-1,11	0,5842

Tabelle 71: zu Abbildung 36: MeWo 9h Inkubationszeit mit 12,5µM Malassezin, komplette Resultate der RT-PCR

Symbol	Well	Kontrolle	Test	Test	Fold change	T-
		Sample 1	Sample 2	Sample 2		TEST
		exp1	exp1	exp2	Sample1/Sample 2	p value
ABL1	A01	35,0000	35,0000	35,0000	-1,20	0,2874
AKT1	A02	21,4941	21,8610	24,9257	-4,48	0,2499
APAF1	A03	24,0308	25,0909	26,0817	-3,53	0,0281
BAD	A04	25,0466	25,0795	28,2773	-3,72	0,3123
BAG1	A05	27,0656	27,0993	27,1379	-1,25	0,1938
BAG3	A06	21,2528	20,9512	21,1033	-1,03	0,7552
BAG4	A07	24,0386	24,8411	24,6226	-1,94	0,0823
BAK1	A08	22,3464	21,5562	22,3458	1,10	0,5971
BAX	A09	19,8799	20,0966	21,0914	-1,97	0,0893
BCL10	A10	23,1438	23,1469	23,1011	-1,18	0,3588
BCL2	A11	27,7185	26,7304	28,9180	-1,29	0,7239
BCL2A1	A12	23,0649	23,0360	23,0136	-1,17	0,3696
BCL2L1	B01	22,6920	24,0123	26,2389	-6,49	0,1011
BCL2L10	B02	31,4255	31,2333	32,1596	-1,45	0,1956
BCL2L11	B03	24,7705	24,3829	24,4039	1,08	0,5810
BCL2L2	B04	21,9507	22,0745	22,5002	-1,52	0,0023
BCLAF1	B05	22,9706	22,9586	22,8399	-1,14	0,5112
BFAR	B06	22,2958	21,7959	22,4319	-1,06	0,6029
BID	B07	23,4711	23,8325	24,2388	-1,78	0,0005
BIK	B08	29,6816	29,7943	29,9247	-1,36	0,0651
NAIP	B09	24,3118	25,3869	25,4423	-2,58	0,0128
BIRC2	B10	20,4740	21,8434	22,1316	-3,43	0,0005
BIRC3	B11	24,0645	26,5562	27,0816	-8,10	0,0007
BIRC4	B12	23,5689	24,5368	25,2257	-2,98	0,0102
BIRC6	C01	23,9424	24,4663	24,5793	-1,80	0,0220
BIRC8	C02	38,8179	35,0000	35,0000	-1,20	0,2874

BNIP1	C03	24,0278	23,5407	24,6098	-1,24	0,4682
BNIP2	C04	21,6203	21,2629	21,5162	-1,02	0,6192
BNIP3	C05	22,0218	21,3086	22,0865	1,04	0,7968
BNIP3L	C06	21,0264	20,7091	21,6143	-1,32	0,2757
BRAF	C07	26,7518	26,4554	26,9000	-1,14	0,0388
NOD1	C08	25,0773	24,6646	25,6725	-1,28	0,3827
CARD6	C09	24,4044	24,9474	24,7883	-1,66	0,1099
CARD8	C10	26,0622	26,8736	26,8621	-2,10	0,0300
CASP1	C11	23,2153	23,6957	23,7838	-1,73	0,0300
CASP10	C12	30,9118	34,7270	34,3385	-14,77	0,0093
CASP14	D01	35,0000	35,0000	35,0000	-1,20	0,2874
CASP2	D02	23,1688	23,6641	25,2672	-2,95	0,1274
CASP3	D03	22,8583	22,8760	22,7228	-1,15	0,5134
CASP4	D04	22,0137	21,8794	22,0805	-1,17	0,1096
CASP5	D05	31,7284	32,3780	32,4554	-1,93	0,0224
CASP6	D06	25,3426	24,5843	25,0359	1,20	0,0236
CASP7	D07	24,5446	24,2372	24,5184	-1,07	0,1532
CASP8	D08	25,9413	26,2195	26,0052	-1,35	0,2734
CASP9	D09	24,0833	23,7265	23,5430	1,14	0,5720
CD40	D10	31,6250	28,2206	32,3164	2,13	0,6172
CD40LG	D11	33,6373	34,3842	35,0000	-2,49	0,0087
CFLAR	D12	23,3349	23,7169	24,7048	-2,20	0,0667
CIDEA	E01	29,6937	30,8444	31,0972	-2,91	0,0014
CIDEB	E02	25,9977	26,1622	28,1982	-2,73	0,2251
CRADD	E03	23,7323	23,2393	23,5805	1,04	0,0474
DAPK1	E04	27,2290	25,4137	26,4916	2,02	0,1042
DFFA	E05	23,2687	22,8146	23,3096	-1,04	0,4626
FADD	E06	22,9143	22,0234	25,2862	-2,01	0,5595
FAS	E07	24,3147	24,7056	24,4568	-1,44	0,2273
FASLG	E08	30,2574	31,1243	31,1611	-2,22	0,0201
GADD45A	E09	23,4925	23,1080	23,4573	-1,04	0,0273
HRK	E10	31,5019	26,0473	29,4877	11,08	0,1524
IGF1R	E11	23,0792	23,4022	22,9496	-1,28	0,4718

LTA	E12	32,5197	32,3106	32,1422	1,02	0,9230
LTBR	F01	21,1224	20,5973	20,9161	1,07	0,0530
MCL1	F02	19,4111	19,8579	19,3294	-1,36	0,4239
NOL3	F03	23,7929	23,0688	23,2583	1,29	0,0546
PYCARD	F04	27,5902	26,6596	27,0275	1,40	0,0000
RIPK2	F05	25,0321	23,6359	24,6858	1,52	0,2171
TNF	F06	32,0632	33,0955	31,2917	-1,31	0,7512
TNFRSF10 A	F07	29,5873	29,9572	32,4377	-3,67	0,2181
TNFRSF10 B	F08	20,1100	20,4022	21,6017	-2,23	0,1088
TNFRSF11 B	F09	25,4414	25,5737	25,3536	-1,22	0,4327
TNFRSF1A	F10	25,1122	25,5274	27,2748	-2,93	0,1533
TNFRSF21	F11	20,1664	21,1802	21,5052	-2,71	0,0002
TNFRSF25	F12	29,3045	29,0158	31,7172	-2,51	0,3736
CD27	G01	30,4824	31,6626	30,5895	-1,88	0,3348
TNFRSF9	G02	35,0000	34,0940	34,3118	1,45	0,0192
TNFSF10	G03	30,3265	30,4168	29,9530	-1,09	0,7961
CD70	G04	22,4863	22,8303	22,8862	-1,55	0,0551
TNFSF8	G05	35,0000	34,5081	35,0000	-1,01	0,7987
TP53	G06	21,3074	21,5767	22,8882	-2,28	0,1280
TP53BP2	G07	22,3817	23,5095	22,5835	-1,90	0,2875
TP73	G08	28,6779	28,1315	28,2703	1,16	0,2036
TRADD	G09	23,5164	22,5836	23,4243	1,19	0,4038
TRAF2	G10	25,0249	25,5214	27,9132	-3,88	0,1929
TRAF3	G11	22,9409	23,7492	25,0571	-3,31	0,0668
TRAF4	G12	22,0628	22,4277	23,5688	-2,30	0,0901
B2M	H01	17,1630	17,1171	16,8591	-1,06	0,8025
HPRT1	H02	22,7776	22,3420	22,9217	-1,09	0,3809
RPL13A	H03	19,5952	18,1708	19,3029	1,51	0,2603
GAPDH	H04	14,8540	14,3427	14,5960	1,09	0,1691
ACTB	H05	14,8454	15,0236	15,1543	-1,42	0,0504

Tabelle 72: zu Abbildung 37: LDH: DMSO-Kontrolle, MeWo nach 4h

DMSO/3ml (µl)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Wert 7	Wert 8	Mittelwert	Stabw
0	0,246	0,215	0,232			0,214	0,243	0,274	0,237	0,022
1,875	0,401	0,463	0,42	0,589	0,378	0,244	0,22	0,256	0,371	0,126
3,75	0,373	0,349	0,418	0,446	0,376	0,398	0,242	0,261	0,358	0,072
7,5	0,421	0,381	0,422	0,448	0,47	0,34	0,314	0,264	0,383	0,071
15	0,361	0,328	0,451	0,394	0,396	0,26	0,258	0,252	0,338	0,075
30	0,239	0,194	0,273	0,273	0,255	0,297	0,481	0,313	0,291	0,085
60	0,176	0,177	0,187	0,21	0,195	0,172	0,48	0,28	0,235	0,105
Triton-X-100	0,982	0,9	0,915			0,57	1,938	0,792	1,016	0,474

Tabelle 73: zu Abbildung 37: LDH: DMSO-Kontrolle, MeWo nach 6h

DMSO/3ml (µl)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Wert 7	Wert 8	Mittelwert	Stabw
0	0,254	0,211	0,229			0,214	0,258	0,241	0,235	0,020
1,875	0,331	0,426	0,451	0,567	0,329	0,214	0,224	0,246	0,349	0,125
3,75	0,378	0,335	0,402	0,459	0,382	0,378	0,22	0,231	0,348	0,083
7,5	0,383	0,379	0,417	0,424	0,479	0,331	0,237	0,23	0,360	0,089
15	0,368	0,33	0,407	0,383	0,394	0,256	0,219	0,249	0,326	0,074
30	0,226	0,194	0,267	0,262	0,254	0,288	0,395	0,262	0,269	0,059
60	0,181	0,177	0,172	0,201	0,191	0,194	0,291	0,237	0,206	0,040
Triton-X-100	0,929	0,998	1			0,571	1,88	0,935	1,052	0,436

Tabelle 74: zu Abbildung 37: LDH: DMSO-Kontrolle, MeWo nach 8h

DMSO/3ml (µl)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Wert 7	Wert 8	Mittelwert	Stabw
0	0,239	0,206	0,226			0,216	0,265	0,263	0,236	0,024
1,875	0,393	0,401	0,464	0,563	0,361	0,229	0,218	0,24	0,359	0,123
3,75	0,374	0,344	0,395	0,437	0,367	0,292	0,23	0,243	0,335	0,074
7,5	0,439	0,364	0,405	0,426	0,44	0,259	0,249	0,248	0,354	0,088
15	0,376	0,322	0,389	0,372	0,378	0,216	0,228	0,235	0,315	0,076
30	0,247	0,193	0,257	0,255	0,244	0,268	0,317	0,269	0,256	0,034
60	0,178	0,173	0,173	0,197	0,184	0,169	0,282	0,267	0,203	0,045
Triton-X-100	0,982	0,952	1,013			0,694	1,828	0,915	1,064	0,391

Tabelle 75: zu Abbildung 37: LDH: DMSO-Kontrolle, MeWo nach 12h

DMSO/3ml (µl)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Wert 7	Wert 8	Mittelwert	Stabw
0	0,268	0,236	0,25			0,248	0,269	0,257	0,255	0,013
1,875	0,428	0,508	0,519	0,589	0,401	0,218	0,34	0,237	0,405	0,134
3,75	0,434	0,38	0,447	0,499	0,413	0,419	0,267	0,244	0,388	0,089
7,5	0,489	0,427	0,461	0,459	0,509	0,422	0,264	0,242	0,409	0,101
15	0,408	0,367	0,444	0,419	0,43	0,371	0,27	0,228	0,367	0,078
30	0,259	0,221	0,294	0,298	0,28	0,382	0,273	0,297	0,288	0,046
60	0,206	0,197	0,198	0,223	0,209	0,242	0,261	0,296	0,229	0,035
Triton-X-100	1,046	1,07	1,045			0,386	1,711	0,758	1,003	0,436

Tabelle 76: zu Abbildung 38: LDH: DMSO-Kontrolle, MeWo, 24h

DMSO/3ml (µl)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Mittelwert	Stabw
0	0,356	0,306	0,325			0,3290	0,025
1,875	0,554	0,531	0,49	0,681	0,459	0,5430	0,085
3,75	0,491	0,454	0,492	0,565	0,49	0,4984	0,041
7,5	0,506	0,5	0,571	0,565	0,593	0,5470	0,042
15	0,49	0,436	0,482	0,503	0,509	0,4840	0,029
30	0,343	0,285	0,337	0,334	0,355	0,3308	0,027
60	0,268	0,288	0,272	0,321	0,305	0,2908	0,022
Triton-X-100	1,102	1,083	0,987			1,0573	0,062

Tabelle 77: zu Abbildung 38: LDH: DMSO-Kontrolle, MeWo, 48h

DMSO/3ml (µl)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Mittelwert	Stabw
0	0,916	0,527	0,444			0,6290	0,252
1,875	0,453	0,505	0,5	0,539	0,421	0,4836	0,047
3,75	0,455	0,416	0,461	0,501	0,437	0,4540	0,032
7,5	0,497	0,452	0,473	0,495	0,529	0,4892	0,029
15	0,446	0,403	0,429	0,453	0,454	0,4370	0,021
30	0,347	0,268	0,326	0,359	0,358	0,3316	0,038
60	0,526	0,475	0,455	0,479	0,487	0,4844	0,026
Triton-X-100	0,933	0,966	0,903			0,9340	0,032

Tabelle 78: zu Abbildung 38: LDH: DMSO-Kontrolle, MeWo, 72h

DMSO/3ml (µl)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Mittelwert	Stabw
0	1,335	1,108	0,802			1,0817	0,267
1,875	0,381	0,481	0,53	0,53	0,415	0,4674	0,068
3,75	0,428	0,387	0,401	0,44	0,431	0,4174	0,022
7,5	0,498	0,433	0,478	0,515	0,566	0,4980	0,049
15	0,471	0,459	0,492	0,498	0,515	0,4870	0,022
30	0,455	0,407	0,491	0,463	0,505	0,4642	0,038
60	0,691	0,763	0,73	0,747	0,77	0,7402	0,032
Triton-X-100	0,935	0,814	0,739			0,8293	0,099

Tabelle 79: zu Abbildung 39: LDH: DMSO-Kontrolle, WM115 nach 4h

DMSO/3ml (µl)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Wert 7	Wert 8	Mittelwert	Stabw
0	0,203	0,197	0,192			0,249	0,256	0,235	0,222	0,028
1,875	0,269	0,319	0,252	0,276	0,321	0,245	0,245	0,233	0,270	0,034
3,75	0,252	0,29	0,284	0,304	0,361	0,397	0,256	0,305	0,306	0,050
7,5	0,33	0,256	0,209	0,248	0,256	0,374	0,281	0,23	0,273	0,054
15	0,295	0,326	0,259	0,299	0,323	0,314	0,243	0,254	0,289	0,033
30	0,201	0,21	0,22	0,215	0,287	0,379	0,498	0,379	0,299	0,109
60	0,172	0,178	0,174	0,187	0,195	0,226	0,505	0,312	0,244	0,115
Triton-X-100	0,712	0,83	0,797			0,695	1,752	1,021	0,968	0,401

Tabelle 80: zu Abbildung 39: LDH: DMSO-Kontrolle, WM115 nach 6h

DMSO/3ml (µl)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Wert 7	Wert 8	Mittelwert	Stabw
0	0,184	0,186	0,19			0,228	0,249	0,278	0,219	0,039
1,875	0,277	0,326	0,248	0,255	0,321	0,227	0,211	0,236	0,263	0,042
3,75	0,266	0,29	0,278	0,294	0,347	0,364	0,251	0,251	0,293	0,042
7,5	0,303	0,263	0,208	0,24	0,243	0,372	0,251	0,241	0,265	0,051
15	0,277	0,32	0,261	0,293	0,317	0,264	0,237	0,28	0,281	0,028
30	0,201	0,225	0,217	0,21	0,282	0,292	0,341	0,289	0,257	0,051
60	0,161	0,173	0,173	0,183	0,188	0,214	0,284	0,272	0,206	0,047
Triton-X-100	0,807	0,846	0,816			0,643		1,054	0,833	0,147

Tabelle 81: zu Abbildung 39: LDH: DMSO-Kontrolle, WM115 nach 8h

DMSO/3ml (µl)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Wert 7	Wert 8	Mittelwert	Stabw
0	0,239	0,206	0,226			0,249	0,284	0,275	0,247	0,029
1,875	0,393	0,401	0,464	0,563	0,361	0,255	0,216	0,234	0,361	0,121
3,75	0,374	0,344	0,395	0,437	0,367	0,34	0,233	0,259	0,344	0,068
7,5	0,439	0,364	0,405	0,426	0,44	0,299	0,213	0,256	0,355	0,089
15	0,376	0,322	0,389	0,372	0,378	0,274	0,221	0,257	0,324	0,065
30	0,247	0,193	0,257	0,255	0,244	0,297	0,263	0,3	0,257	0,033
60	0,178	0,173	0,173	0,197	0,184	0,215	0,247	0,266	0,204	0,036
Triton-X-100	0,982	0,952	1,013			0,662	1,332	1,055	0,999	0,215

Tabelle 82: zu Abbildung 39: LDH: DMSO-Kontrolle, WM115 nach 12h

DMSO/3ml (µl)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Wert 6	Wert 7	Wert 8	Mittelwert	Stabw
0	0,196	0,203	0,204			0,249	0,311	0,243	0,234	0,044
1,875	0,318	0,362	0,275	0,292	0,354	0,23	0,418	0,231	0,310	0,066
3,75	0,3	0,319	0,307	0,289	0,382	0,36	0,286	0,248	0,311	0,043
7,5	0,342	0,291	0,235	0,268	0,278	0,316	0,321	0,232	0,285	0,040
15	0,331	0,368	0,296	0,326	0,356	0,283	0,387	0,236	0,323	0,050
30	0,247	0,256	0,249	0,236	0,319	0,341	0,314	0,315	0,285	0,041
60	0,201	0,197	0,194	0,204	0,213	0,213	0,301	0,285	0,226	0,042
Triton-X-100	0,823	0,845	0,815			0,627	1,498	0,939	0,925	0,299

Tabelle 83: zu Abbildungen 40: LDH: DMSO-Kontrolle, WM115 nach 24h

DMSO/3ml (µl)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Mittelwert	Stabw
0	0,245	0,249	0,254			0,249	0,005
1,875	0,353	0,428	0,333	0,357	0,427	0,380	0,045
3,75	0,349	0,376	0,372	0,391	0,445	0,387	0,036
7,5	0,391	0,359	0,291	0,328	0,333	0,340	0,037
15	0,369	0,368	0,341	0,388	0,414	0,376	0,027
30	0,271	0,304	0,286	0,283	0,356	0,300	0,033
60	0,223	0,228	0,226	0,231	0,259	0,233	0,015
Triton-X-100	0,903	0,902	0,913			0,906	0,006

Tabelle 84: zu Abbildung 40: LDH: DMSO-Kontrolle, WM115 nach 48h

DMSO/3ml (µl)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Mittelwert	Stabw
0	0,216	0,21	0,258			0,228	0,026
1,875	0,315	0,357	0,298	0,304	0,367	0,328	0,032
3,75	0,299	0,317	0,321	0,323	0,384	0,329	0,032
7,5	0,319	0,294	0,271	0,283	0,297	0,293	0,018
15	0,315	0,357	0,311	0,333	0,354	0,334	0,021
30	0,24	0,258	0,252	0,235	0,33	0,263	0,039
60	0,208	0,223	0,21	0,22	0,281	0,228	0,030
Triton-X-100	0,717	0,769	0,651			0,712	0,059

Tabelle 85: zu Abbildung 40: LDH: DMSO-Kontrolle, WM115 nach 72h

DMSO/3ml (µl)	Wert 1	Wert 2	Wert 3	Wert 4	Wert 5	Mittelwert	Stabw
0	0,444	0,637	0,804			0,628	0,180
1,875	0,472	0,47	0,404	0,426	0,52	0,458	0,045
3,75	0,43	0,445	0,399	0,457	0,526	0,451	0,047
7,5	0,49	0,446	0,394	0,43	0,482	0,448	0,039
15	0,541	0,546	0,467	0,516	0,608	0,536	0,051
30	0,476	0,478	0,473	0,478	0,665	0,514	0,084
60	0,623	0,572	0,556	0,572	0,862	0,637	0,128
Triton-X-100	0,886	0,943	0,86			0,896	0,042

Tabelle 86: zu Abbildung 41: Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, MeWo, 4h

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, Nekrose ,MeWo, 4h					
DMSO-Anteil	Nekrose %			Mittelwert	Stabw
0	7,69	3,17	6,4	5,753	2,328
0,94	1,63	1,48	16,55	6,553	8,658
1,875	0,97	0,75	4,81	2,177	2,283
3,75	8,21	1,75	7,86	5,940	3,633
7,5	1,8	1,33	7,53	3,553	3,452
15	2,14	1,3	3,93	2,457	1,343
30	4,68	2,02	5,37	4,023	1,769
60	2,27	1,61	4,31	2,730	1,408

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, Apoptose ,MeWo, 4h					
DMSO-Anteil	Apoptose %			Mittelwert	Stabw
0	45,16	18,25	34,03	32,480	13,522
0,94	30,63	31,44	38,85	33,640	4,530
1,875	21,63	15,12	31,3	22,683	8,141
3,75	46,11	26,33	34,66	35,700	9,931
7,5	23,49	16,66	32,05	24,067	7,711
15	54,38	19,71	20,74	31,610	19,726
30	57,05	19,12	21,67	32,613	21,201
60	47,6	15,68	18,66	27,313	17,632

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, vitale Zellen ,MeWo, 4h					
DMSO-Anteil	vitale Zellen %			Mittelwert	Stabw
0	47,15	78,58	59,57	61,767	15,830
0,94	67,74	67,06	44,6	59,800	13,168
1,875	77,4	84,13	63,89	75,140	10,308
3,75	45,68	71,92	57,48	58,360	13,142
7,5	74,71	82,01	60,42	72,380	10,982
15	43,48	78,99	75,33	65,933	19,531
30	38,27	78,86	72,96	63,363	21,931
60	50,13	82,71	77,03	69,957	17,404

Tabelle 87: zu Abbildung 41: Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, MeWo, 6h

Facs-Analytik: DMSO- Kontrolle, Nekrose ,MeWo, 6h						
DMSO-Anteil	Nekrose %			Mittelwert	Stabw	
0	1,58	1,73	4,2	2,503	1,471	
0,94	2,77	1,22	3,32	2,437	1,089	
1,875	1,62	1,38	2,02	1,673	0,323	
3,75	1,41	5,72	9,75	5,627	4,171	
7,5	1,42	2,98	5,17	3,190	1,884	
15	1,15	2,05	4,43	2,543	1,695	
30	3,42	1,91	3,36	2,897	0,855	
60	2,22	1,6	3,47	2,430	0,953	

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, Apoptose ,MeWo, 6h						
DMSO-Anteil	Apoptose %			Mittelwert	Stabw	
0	30,4	21	21,64	24,347	5,252	
0,94	41,42	26,6	32,22	33,413	7,482	
1,875	28,67	28,47	24,32	27,153	2,456	
3,75	25,28	54,35	28,89	36,173	15,845	
7,5	22,49	37,29	21,43	27,070	8,867	
15	21,07	31,38	22,09	24,847	5,681	
30	29,67	27,89	21,36	26,307	4,375	
60	26,67	18,57	18,46	21,233	4,709	

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, vitale Zellen ,MeWo, 6h						
DMSO-Anteil	vitale Zellen %			Mittelwert	Stabw	
0	68,02	77,27	74,16	73,150	4,707	
0,94	55,81	72,18	64,46	64,150	8,189	
1,875	69,71	70,15	73,66	71,173	2,165	
3,75	73,31	39,93	61,36	58,200	16,913	
7,5	76,09	59,73	73,4	69,740	8,773	
15	77,78	66,57	73,48	72,610	5,655	
30	66,91	70,2	75,28	70,797	4,217	
60	71,11	79,83	78,07	76,337	4,611	

Tabelle 88: zu Abbildung 41: Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, MeWo, 8h

Facs- Analytik: DMSO- Kontrolle, Nekrose ,MeWo, 8h					
DMSO-Anteil	Nekrose %			Mittelwert	Stabw
0	1,33	1,72	3,36	2,137	1,077
0,94	1,38	1,1	3,08	1,853	1,072
1,875	1,22	0,54	2,41	1,390	0,947
3,75	0,81	1,65	5,78	2,747	2,660
7,5	1,48	0,84	4,46	2,260	1,932
15	0,96	1,97	3,51	2,147	1,284
30	1,89	1,45	2,8	2,047	0,689
60	2,19	1,46	2,71	2,120	0,628

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, Apoptose ,MeWo, 8h					
DMSO-Anteil	Apoptose %			Mittelwert	Stabw
0	23,28	34,95	21,52	26,583	7,299
0,94	28,34	32,65	33,94	31,643	2,933
1,875	20,76	25,28	20,55	22,197	2,672
3,75	23	44,34	35,07	34,137	10,701
7,5	26,38	25,31	27,09	26,260	0,896
15	19,97	28,27	26,53	24,923	4,377
30	21,85	20,2	24,18	22,077	2,000
60	27,07	26,06	21,89	25,007	2,746

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, vitale Zellen, MeWo, 8h					
DMSO-Anteil	vitale Zellen %			Mittelwert	Stabw
0	75,39	63,33	75,12	71,280	6,886
0,94	70,28	66,25	62,98	66,503	3,657
1,875	78,02	74,18	77,04	76,413	1,995
3,75	76,19	54,01	59,15	63,117	11,610
7,5	72,14	73,85	68,45	71,480	2,760
15	79,07	69,76	69,96	72,930	5,318
30	76,26	78,35	73,02	75,877	2,686
60	70,74	72,48	75,4	72,873	2,355

Tabelle 89: zu Abbildung 41: Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, MeWo, 12h

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, Nekrose ,MeWo, 12h

DMSO-Anteil	Nekrose %			Mittelwert	Stabw
0	3,37	2,74	3,85	3,320	0,557
0,94	2,8	1,59	4,48	2,957	1,451
1,875	4,29	1,85	9,21	5,117	3,749
3,75	6,37	2,19	12,31	6,957	5,085
7,5	2,41	1,53	19,76	7,900	10,280
15	3,64	1,32	12,41	5,790	5,849
30	3,12	2,15	14,36	6,543	6,787
60	2,75	2,69	11,21	5,550	4,902

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, Apoptose ,MeWo, 12h

DMSO-Anteil	Apoptose %			Mittelwert	Stabw
0	31,81	57,28	25,95	38,347	16,656
0,94	37,44	62,24	33,93	44,537	15,432
1,875	36,06	62,73	45,46	48,083	13,527
3,75	47,45	47,92	39,34	44,903	4,824
7,5	34,6	43,8	39,26	39,220	4,600
15	30,92	40,55	39,22	36,897	5,218
30	31,1	40,09	38,76	36,650	4,852
60	32,49	35,26	34,28	34,010	1,405

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, vitale Zellen ,MeWo, 12h

DMSO-Anteil	vitale Zellen %			Mittelwert	Stabw
0	64,82	39,98	70,2	58,333	16,120
0,94	59,76	36,17	61,59	52,507	14,178
1,875	59,65	35,42	45,33	46,800	12,182
3,75	46,18	49,89	48,35	48,140	1,864
7,5	62,99	54,67	40,98	52,880	11,114
15	65,44	58,13	48,37	57,313	8,564
30	65,78	57,76	46,88	56,807	9,486
60	64,76	62,05	54,51	60,440	5,311

Tabelle 90: zu Abbildung 42: Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, WM115, 4h

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, Nekrose ,WM115, 4h					
DMSO-Anteil	Nekrose %			Mittelwert	Stabw
0	1,96	1,41	6,74	3,370	2,931
0,94	6,07	1,93	1,56	3,187	2,504
1,875	1,55	4,14	1,28	2,323	1,579
3,75	1,99	1,72	10,15	4,620	4,791
7,5	1,32	2,88	6,94	3,713	2,901
15	2,34	2,87	5,25	3,487	1,550
30	4,47	6,19	9,31	6,657	2,454
60	5,7	3,23	4,71	4,547	1,243

FacsAnalytik: DMSO-Kontrolle, Apoptose ,WM115, 4h					
DMSO-Anteil	Apoptose %			Mittelwert	Stabw
0	6,37	8,33	17,73	10,810	6,072
0,94	28,6	10,03	17,5	18,710	9,344
1,875	5,42	10,25	18,61	11,427	6,673
3,75	3,71	6,45	25,74	11,967	12,006
7,5	3,28	7,76	23,72	11,587	10,744
15	5,09	6,28	22,43	11,267	9,686
30	6,31	9,15	23,75	13,070	9,358
60	10,51	7,92	17,51	11,980	4,961

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, vitale Zellen, WM115, 4h					
DMSO-Anteil	vitale Zellen %			Mittelwert	Stabw
0	91,67	90,25	75,53	85,817	8,937
0,94	65,33	88,04	80,94	78,103	11,618
1,875	93,03	85,63	80,11	86,257	6,483
3,75	94,3	91,81	64,11	83,407	16,758
7,5	95,4	89,36	69,34	84,700	13,641
15	92,57	90,85	72,32	85,247	11,228
30	89,22	84,66	66,94	80,273	11,770
60	83,79	88,85	77,78	83,473	5,542

Tabelle 91: zu Abbildung 42: Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, WM115, 6h

Facs- Analytik: DMSO- Kontrolle, Nekrose ,WM115, 6h

DMSO-Anteil	Nekrose %			Mittelwert	Stabw
0	0,91	0,71	1,88	1,167	0,626
0,94	1,6	0,82	10,2	4,207	5,205
1,875	1,68	1,81	1,17	1,553	0,338
3,75	1,31	1,45	11,44	4,733	5,809
7,5	1,44	2,39	10,43	4,753	4,939
15	1,33	1,2	6,12	2,883	2,804
30	2,41	2,05	4,49	2,983	1,317
60	1,98	0,89	4,09	2,320	1,627

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, Apoptose ,WM115, 6h

DMSO-Anteil	Apoptose %			Mittelwert	Stabw
0	8,9	7,09	15,93	10,640	4,670
0,94	6,66	6,52	56,01	23,063	28,533
1,875	6,68	6,77	16,69	10,047	5,753
3,75	6,76	5,74	22,39	11,630	9,332
7,5	6,02	6,22	26,92	13,053	12,009
15	5,76	4,59	19,01	9,787	8,009
30	8,77	6,82	19,42	11,670	6,782
60	9,39	6,44	20,11	11,980	7,194

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, vitale Zellen ,WM115, 6h

DMSO-Anteil	vitale Zellen %			Mittelwert	Stabw
0	90,19	92,2	82,19	88,193	5,295
0,94	91,74	92,66	33,8	72,733	33,720
1,875	91,64	91,42	82,14	88,400	5,422
3,75	91,93	92,81	66,17	83,637	15,133
7,5	92,54	91,39	62,65	82,193	16,935
15	92,91	94,21	74,87	87,330	10,810
30	88,82	91,13	76,09	85,347	8,099
60	88,63	92,67	75,8	85,700	8,808

Tabelle 92: zu Abbildung 42: Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, WM115, 8h

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, Nekrose ,WM115, 8h

DMSO-Anteil	Nekrose %			Mittelwert	Stabw
0	1,28	2,32	0,63	1,410	0,852
0,94	0,66	0,68	0,86	0,733	0,110
1,875	0,8	1,25	0,82	0,957	0,254
3,75	1,14	2,55	45,91	16,533	25,451
7,5	1,07	0,88	5,98	2,643	2,891
15	0,64	0,86	3,05	1,517	1,332
30	1,05	1,74	33,16	11,983	18,343
60	1,72	2,51	2,97	2,400	0,632

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, Apoptose ,WM115, 8h

DMSO-Anteil	Apoptose %			Mittelwert	Stabw
0	6,6	8,82	16,09	10,503	4,964
0,94	7,59	5,79	13,23	8,870	3,882
1,875	4,7	8,56	16,74	10,000	6,148
3,75	6,43	12,09	19,11	12,543	6,352
7,5	5,18	5,89	20,44	10,503	8,613
15	5,91	8,24	18,94	11,030	6,949
30	8,18	8,71	15,38	10,757	4,013
60	5,9	9,41	16,63	10,647	5,471

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, vitale Zellen ,WM115, 8h

DMSO-Anteil	vitale Zellen %			Mittelwert	Stabw
0	92,12	88,86	83,28	88,087	4,470
0,94	91,75	93,53	85,91	90,397	3,986
1,875	94,5	90,19	82,44	89,043	6,111
3,75	92,43	85,36	34,98	70,923	31,328
7,5	93,75	93,23	73,58	86,853	11,498
15	93,45	90,9	78,01	87,453	8,277
30	90,77	89,55	51,46	77,260	22,352
60	92,38	88,08	80,4	86,953	6,069

Tabelle 93: zu Abbildung 42: Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, WM115, 12h

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, Nekrose ,WM115, 12h					
DMSO-Anteil	Nekrose %			Mittelwert	Stabw
0	6,56	1,95	3,07	3,860	2,404
0,94	6,23	1,93	2,43	3,530	2,352
1,875	6,65	2,17	3,62	4,147	2,286
3,75	2,64	2,7	9,77	5,037	4,099
7,5	3,56	2,38	5,04	3,660	1,333
15	4,23	5,06	8,53	5,940	2,281
30	4,72	5,54	8,43	6,230	1,949
60	4,43	4,4	5,11	4,647	0,402

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, Apoptose ,WM115, 12h					
DMSO-Anteil	Apoptose %			Mittelwert	Stabw
0	10,37	8,5	18,26	12,377	5,180
0,94	11,25	15,37	22,11	16,243	5,482
1,875	12,27	17,25	18,63	16,050	3,346
3,75	8,39	8,81	20,86	12,687	7,081
7,5	7,84	9,74	25,24	14,273	9,545
15	8,48	11,95	21,48	13,970	6,731
30	10,44	14,84	21,25	15,510	5,436
60	12,03	11,52	17,79	13,780	3,482

Facs-Analytik: DMSO-Kontrolle, vitale Zellen ,WM115, 12h					
DMSO-Anteil	vitale Zellen %			Mittelwert	Stabw
0	83,07	89,55	78,67	83,763	5,473
0,94	82,52	82,7	75,46	80,227	4,129
1,875	81,08	80,58	77,75	79,803	1,796
3,75	88,97	88,49	69,37	82,277	11,180
7,5	88,6	87,88	69,72	82,067	10,699
15	87,29	82,99	69,99	80,090	9,007
30	84,84	79,62	70,32	78,260	7,355
60	83,54	84,08	77,1	81,573	3,883

11. Danksagung

Mein besonderer Dank richtet sich an:

Herrn Prof. Dr. P. Mayser (Zentrum für Dermatologie und Andrologie der JLU-Giessen) für die Anregung zur Durchführung dieser Arbeit, seine unermühtlichen Ermutigung und den Glauben an das Gelingen meiner Arbeit, insbesondere in Zeiten, in denen die Zellkultur nicht gedeihen wollte.

Herrn Dr.med. Dipl.Chem. H.-J. Krämer (Klinische Pharmakologie) für die professionelle Hilfe und Unterstützung ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Er wurde niemals müde, mich zu ermuntern weiterzumachen. Danke für die vielen Gespräche, wenn der Zeitplan nicht mehr in meine Planung gepasst hat. Mir dadurch immer wieder deutlich wurde, wie wichtig mir diese Arbeit ist. Danke für die viel investierte Zeit mit mir. Und für die Option, dass ich Tag und Nacht anrufen darf.

Frau Gabriela Thiele (Institut für Anatomie und Zellbiologie), die mir alles über die Zellkultur beigebracht hat. Die ich auch nach ihrem Wechsel zur Anatomie immer wieder anrufen und um Rat fragen durfte.

Dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin. PD Dr. med Holger Hackstein und PD Dr. Ulrich Sachs für die Benutzung des TaqMan und des Facs.

Ganz besonders gilt mein Dank Frau Gabriela Haley, Frau Angelika Nockher und Frau Christina Lang für die vielen Hilfen, Einweisungen, Unterstützung und Zeit bei der Benutzung der Geräte in der Immunologie.

Ein ganz großes Dankeschön geht an Frau Sarah Lang, die mir die unendlichen Tiefen der Molekularbiologie versucht hat näher zu bringen. Und immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte, auch wenn sie selber im Experimentier-Streß war.

Mein größter Dank gilt meiner Mutter Senta-Maria Töppler und meinem Bruder Jendrik Töppler, sowie allen Freunden, die mich auf meinem Lebensweg insbesondere während des experimentellen Arbeitsteils begleitet haben.

12. Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

