

Die Rolle von MIA (Melanoma Inhibitory Activity) in der melanozytären Seneszenz



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Lena Feuerer (geb. Honold)

aus

Landshut

Im Jahr

2019

Die Rolle von MIA (Melanoma Inhibitory Activity) in der melanozytären Seneszenz



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin

der Universität Regensburg

vorgelegt von

Lena Feuerer (geb. Honold)

aus

Landshut

Im Jahr

2019

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am:

Die Arbeit wurde angeleitet von Frau Prof. Dr. Anja Bosserhoff

Unterschrift:

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung.....	3
2.1. Melanozyten.....	3
2.1.1. Klassifikation melanozytärer Nävi.....	4
2.1.2. Nävogenese und Melanomentstehung	5
2.1.3. Inzidenz und Risikofaktoren des malignen Melanoms	6
2.1.4. Melanom-assoziierte Mutationen und Signalwege.....	8
2.1.5. Therapiemöglichkeiten des malignen Melanoms	11
2.2. <i>Melanoma Inhibitory Activity</i> (MIA)	13
2.2.1. MIA-Proteinfamilie	13
2.2.2. Funktionen von MIA	14
2.3. Seneszenz	15
2.3.1. Merkmale von Seneszenz	15
2.3.2. Wichtige Signalwege der zellulären Seneszenz	16
2.3.3. <i>DNA Damage Response</i> (DDR)	18
2.3.4. Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp (SASP)	18
2.3.5. Onkogen-induzierte Seneszenz in Melanozyten.....	19
3. Vordaten	21
4. Zielsetzung	24
5. Ergebnisse.....	25
5.1. Rolle von MIA in der replikativen Seneszenz in Melanozyten	25
5.2. Induktion der MIA-Expression in der Onkogen-induzierten Seneszenz.....	26
5.3. Rolle von MIA bei der Induktion von Seneszenz in Melanozyten	31
5.4. Einfluss des MIA <i>Knockdowns</i> auf Onkogen-induzierte Seneszenz	35
5.5. Untersuchungen der Seneszenz-assoziierten Funktion von MIA <i>in vivo</i>	38
5.6. Auswirkungen des MIA <i>Knockdowns</i> im Melanom.....	41
6. Diskussion	44
6.1. Die Seneszenz-assoziierte Rolle von MIA in Melanozyten	44

6.2.	Die Funktion von MIA im malignen Melanom.....	46
6.3.	Die Rolle von p21 in der MIA-vermittelten Seneszenz	48
6.4.	Die Rolle von MIA in einem <i>in vivo</i> Melanommausmodell.....	50
6.5.	MIA als Teil des SASP?	52
6.6.	Die Reversibilität von Seneszenz	54
6.7.	Seneszenz als therapeutisches Ziel bei Krebserkrankungen.....	55
7.	Material	59
7.1.	Allgemeine Materialien.....	59
7.2.	Geräte.....	62
7.3.	Software.....	65
7.4.	Bakterien.....	65
7.5.	Virale Vektoren und Viren.....	65
7.6.	Primäre Zellen und Tumorzelllinien Säugerzelllinien	66
7.7.	Murine Gewebeprobe.....	66
7.8.	Säugetiere.....	66
7.9.	Antikörper und rekombinante Proteine	67
7.10.	Oligonukleotide.....	68
7.11.	siRNA und siPool.....	70
7.12.	Medien, Puffer und Lösungen	70
7.12.1.	Medien zur Anzucht von Säugerzelle und Bakterien	70
7.12.2.	Puffer und Lösungen	72
8.	Methoden	74
8.1.	Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	74
8.1.1.	Transformation von <i>E.coli</i>	74
8.1.2.	Kultivierung von <i>E. coli</i>	74
8.1.3.	Isolierung von Plasmid-DNA.....	74
8.2.	Molekularbiologische Methoden	75
8.2.1.	Isolierung von genomischer DNA aus murinen Geweben.....	75
8.2.2.	Isolierung von RNA aus Zellen und Mausgewebe	75
8.2.3.	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA.....	75

8.2.4.	Reverse Transkription von RNA (RT)	75
8.2.5.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	76
8.2.6.	Agarose-Gelelektrophorese.....	77
8.2.7.	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR).....	77
8.3.	Proteinbiochemische Methoden	78
8.3.1.	Herstellung von Gesamtproteinextrakten.....	78
8.3.2.	Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten	79
8.3.3.	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	79
8.3.4.	Western Blot.....	79
8.3.5.	Densitometrie	80
8.3.6.	Immunfluoreszenz	80
8.4.	Zellkulturmethoden.....	81
8.4.1.	Kultivierung von humanen Zelllinien	81
8.4.2.	Isolierung und Kultivierung von Melanozyten aus neugeborenen Mäusen.....	81
8.4.3.	Einfrieren und Auftauen von murinen und humanen Zellen	82
8.4.4.	Transiente Transfektion von Zellkulturzellen.....	82
8.4.5.	Transduktion von humanen Melanozyten	82
8.4.6.	Nachweis von seneszenten Zellen (SA- β -Galaktosidase-Färbung)	83
8.4.7.	Messung von Proliferation mittels xCELLience/RTCA	84
8.5.	Arbeiten mit Mäusen	85
8.5.1.	Zucht- und Haltingsbedingungen.....	85
8.5.2.	Genotypisierung der Mäuse	85
8.6.	Statistik	86
9.	Abkürzungsverzeichnis	87
10.	Literaturverzeichnis	93
11.	Publikationen.....	109
12.	Selbständigkeitserklärung.....	110
13.	Danksagung.....	111

1. Zusammenfassung

In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass MIA (*melanoma inhibitory activity*) von Melanomzellen stark exprimiert und sekretiert wird, jedoch nicht von Melanozyten. MIA bindet dabei an Komponenten der extrazellulären Matrix und ist dadurch an der Invasion, Metastasierung und Progression des malignen Melanoms beteiligt. Entsprechend korreliert der MIA-Serumspiegel von Melanompatienten mit der Progression der Erkrankung. In Vordaten zu dieser Arbeit konnte jedoch für MIA auch tumorsuppressive Effekte nachgewiesen werden, die im Zusammenhang mit dem Mechanismus der zellulären Seneszenz stehen. Bei zellulärer Seneszenz handelt sich um einen permanenten Wachstumsarrest, der durch verschiedene Stimuli wie beispielsweise Verkürzung der Telomere (replikative Seneszenz) oder aktivierende Onkogene (Onkogen-induzierte Seneszenz, OIS) ausgelöst werden kann.

Erste Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigten, dass MIA in hohen Passagen (replikative Seneszenz) von normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM) exprimiert wird und diese Expression mit der Anzahl seneszenter Zellen korreliert. Die Induktion der MIA-Expression konnte im weiteren Verlauf der Arbeit auch für verschiedene Modelle der OIS detektiert werden. So führte im humanen System die lentivirale Überexpression von B-Raf^{V600E} in NHEM zu einem seneszenten Phänotyp und erhöhter MIA-Expression. Ebenso konnte in einem murinen Modellsystem, der murinen Melanozytenzelllinie Melan A, die das EGFR-Ortholog *Xiphophorus melanoma receptor kinase* (Xmrk) stark überexprimiert und somit Seneszenz auflöst, eine verstärkte MIA-Expression detektiert werden.

Durch die Überexpression von MIA in NHEM und Behandlung von NHEM mit rekombinantem MIA sollte die Funktion von MIA bei der Induktion von Seneszenz geklärt werden. Sowohl nach Überexpression als auch nach Behandlung mit rekombinantem MIA konnte keine Veränderung in der Anzahl der seneszenten Zellen, im Proliferationsverhalten oder in der Genexpression Zellzyklusinhibitoren p14, p15, p16, p21 und p27 detektiert werden, was zur Hypothese führte, dass MIA allein nicht ausreichend ist, um Seneszenz zu induzieren. Da die bisherigen Daten aber auf einen Zusammenhang zwischen MIA und Seneszenz hinwiesen, wurde der Einfluss eines *Knockdowns* von MIA auf den seneszenten Zustand in B-Raf^{V600E}-transduzierten NHEM überprüft. In diesem Versuchsansatz wurde eine Reduktion der prozentualen Anzahl seneszenter Zellen und eine Erhöhung der Zellproliferation im Vergleich zu B-Raf^{V600E}-transduzierten NHEM festgestellt, was einen Einfluss von MIA auf die Aufrechterhaltung von Seneszenz nahelegt.

In *in vivo* Vordaten zu dieser Arbeit wurde bereits die Kreuzung des Tg(*Grm1*) Melanommausmodell mit einer MIA-defizienten Mauslinie (*MIA*^{-/-}) etabliert. Interessanterweise wiesen die Tg(*Grm1*)/*MIA*^{-/-} Mäuse ein signifikant früheres Tumor-Onset als die Tg(*Grm1*)-

Kontrolltiere auf. Für die vorliegende Arbeit wurden aus den beschriebenen Mäusen murine Melanozyten isoliert. Dabei wiesen die Melanozyten aus MIA-defizienten Tieren ein signifikant höheres Proliferationsverhalten als die entsprechenden Kontrolltiere auf. Anschließende Analysen an Hautproben von MIA-defizienten Melanommäusen und entsprechenden Kontrollmelanommäusen ergaben sowohl im tumorfreien als auch tumorösen Gewebe bei den Tg(*Grm1*)/MIA^{-/-} Mäuse eine reduzierte p21-Expression. P21 ist neben den anderen bereits erwähnten Zellzyklusinhibitoren an der Regulation des Zellzyklus beteiligt und kann dadurch einen Wachstumsarrest und Seneszenz auslösen. Einen Einfluss von MIA auf die p21-Expression konnte zudem in *in vitro* Experimenten nachgewiesen werden, in denen der *Knockdown* von MIA in NHEM in hohen Passagen zu reduzierten p21 Proteinleveln führte. Im Gegensatz dazu lässt sich dieser regulatorische Effekt von MIA auf p21 im Melanom (untersucht an den Melanomzelllinien Mel Im und WM35) nicht mehr nachweisen. Aufgrund der erhöhten Expression der Telomerase in Tumorzellen und der beschriebenen Regulation der p21-Expression durch die Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT) wurde die Hypothese aufgestellt, dass es sich bei der Regulation von p21 im Melanom durch die Expression von TERT um einen vorgeschalteten Signalweg handelt und somit der *Knockdown* von MIA im Melanom keinen Einfluss auf die Expressionslevel von p21 hat. Experimente mit einer immortalisierten Melanozytenzelllinie (Mel-STV), die TERT stabil exprimiert, legten die Vermutung nahe, dass durch die Expression von TERT die B-Raf^{V600E}-vermittelte Induktion von MIA verhindert wird und bestätigt die zuvor aufgestellte Theorie, dass TERT in der Signalkaskade vor MIA liegt.

Diese Arbeit beschreibt zum ersten Mal, dass die MIA-Expression in Melanozyten und im Melanom unterschiedliche Auswirkungen hat. Es konnte gezeigt werden, dass MIA in Melanozyten die replikative Seneszenz über die Regulation von p21 beeinflussen kann und darüber hinaus an der Aufrechterhaltung der Onkogen-induzierten Seneszenz beteiligt ist. Neben den bereits beschriebenen protumorigenen Eigenschaften von MIA konnten somit erstmals regulatorische Effekte von MIA auf zelluläre Seneszenz detektiert und folglich eine neue biologische Funktion von MIA identifiziert werden.

2. Einleitung

2.1. Melanozyten

Melanozyten sind Zellen, die die einzigartige Fähigkeit besitzen, Melanin in den Melanosomen zu synthetisieren. Melanin-Pigmente können dabei in zwei Varianten unterteilt werden: das braun-schwärzliche Eumelanin und das gelblich-rötliche Phäomelanin (Ito and Wakamatsu, 2003). Melanozyten liegen entlang der Basalmembran, die die Epidermis und die Dermis trennt (**Abbildung 1**). Es lassen sich in etwa 1500 Melanozyten pro Quadratmillimeter in der humanen Epidermis finden, was mit etwa 3 Milliarden Melanozyten in der Haut des Durchschnittsmenschen korrespondiert (Kanitakis, 2002).

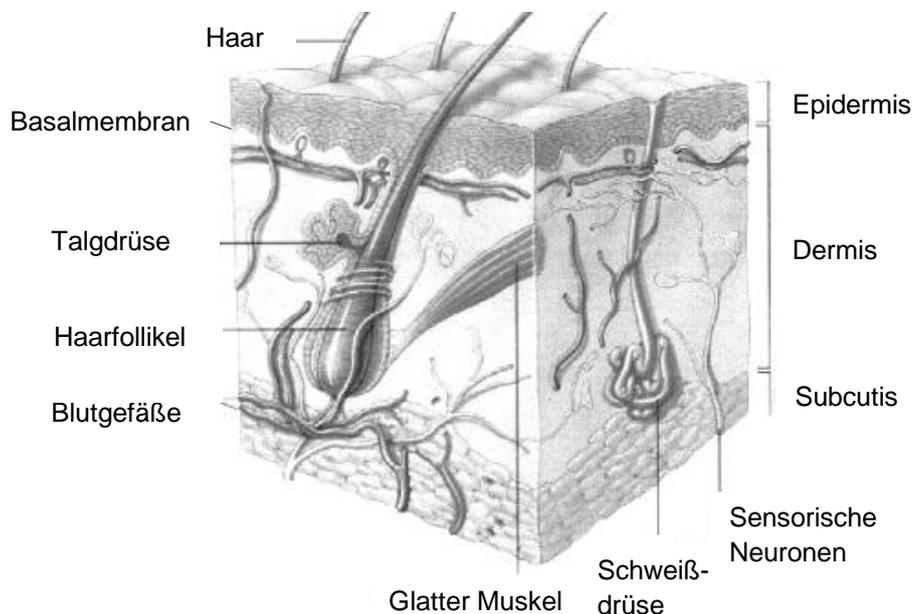


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Haut.

Die Haut wird in die drei Schichten Epidermis, Dermis sowie Subcutis unterteilt. Die Melanozyten liegen auf der Basalmembran der Epidermis (Al-Kaisy and Salih Sahib, 2005) (modifiziert).

Melanozyten kommen beim Menschen nicht nur in der Epidermis und den Haarfollikeln vor, sondern auch in der Mundschleimhaut, der Aderhaut des Auges, sowie in der Cochlea des Ohres und anderen Geweben (Plonka et al., 2009). Hauptfunktion der Melanozyten ist es, das produzierte Pigment Melanin an die umgebenden Keratinozyten abzugeben (Costin and Hearing, 2007). Melanin kann UV-Strahlung absorbieren und schützt somit die epidermalen Keratinozyten vor strahlungsinduzierten DNA-Schäden (Kaidbey et al., 1979). Einzelne Melanozyten haben eine relativ hohe Lebensspanne und können Jahrzehnte in der Epidermis

bestehen (Quevedo et al., 1969). Zudem besitzen sie, unter anderem durch die konstitutive Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl2 (*B-cell lymphoma 2*), eine hohe Resistenz gegen Apoptose (Plettenberg et al., 1995). Diese Eigenschaften sorgen allerdings auch dafür, dass Melanozyten für Mutationen anfällig sind, die über Jahre durch beispielsweise intensive Sonnenexposition entstehen können. Zudem gibt es zahlreiche Erkrankungen, die mit einer Fehlregulation von Melanozyten in Zusammenhang stehen. So kann eine Fehlregulation der Pigmentierung zu Krankheitsbildern mit Hyperpigmentierung (z.B. Melasma) oder Hypopigmentierung (z.B. Vitiligo) führen. Die wohl bekannteste Erkrankung im Zusammenhang mit Melanozyten stellt deren Entartung und das dadurch entstehende maligne Melanom dar.

2.1.1. Klassifikation melanozytärer Nävi

Gutartige melanozytäre Neoplasien können grundsätzlich anhand ihrer klinischen und histologischen Eigenschaften in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Prinzipiell wird zwischen kongenitalen und erworbenen Nävi unterschieden. Kongenitale Nävi sind bereits bei der Geburt vorhanden oder treten kurz danach im Neugeborenenalter bei etwa 1 % aller Kinder auf. Charakteristisch für kongenitale Nävi ist ihr enorme Größe, da diese melanozytären Riesennävi größer als 20 cm werden können (Tannous et al., 2005). Bei den erworbenen melanozytären Nävi werden weitere Subtypen unterschieden. Gewöhnliche melanozytäre Nävi weisen eine regelmäßige Oberfläche auf und sind scharf begrenzt. Sie treten bereits im Kindesalter auf und ihre Anzahl nimmt bis ins Erwachsenenalter zu (Schaffer, 2015). Dabei ist die Sonnenexposition ein wichtiger Faktor, der sich auf die Entstehung melanozytärer Nävi auswirkt. Bei Kindern, die in einer sonnenreichen Gegend aufwachsen, lässt sich auf der sonnenexponierten Haut eine erhöhte Anzahl an Nävi finden (Harrison et al., 2000). Zudem ist Anzahl und Größe der Nävi stark durch genetische Veranlagung beeinflusst, wie Arbeiten mit Zwillingen zeigten (Bataille et al., 2000). Die Anzahl gewöhnlicher und atypischer Nävi wiederum ist ein entscheidender Risikofaktor für die Entwicklung eines malignen Melanoms (Bauer and Garbe, 2003). Atypische melanozytäre Nävi zählen ebenfalls zur Gruppe der erworbenen Nävi. Die Definition dieses Nävi-Typs anhand von histologischen und klinischen Kriterien fällt deutlich komplexer aus als bei gewöhnlichen melanozytären Nävi. Darauf weist schon die Bezeichnung hin. Das *National Institute of Health* (NIH) empfiehlt die Bezeichnung atypischer Nävus, wobei sich auch Bezeichnungen wie Clark Nävus oder dysplastischer Nävus finden lassen (NIH, 1992; Perkins and Duffy, 2015). Eine klinische Definition beinhaltet eine Kombination der folgenden Kriterien: Asymmetrie des Aufbaus, unscharfe Begrenzung, Färbung hell- bis dunkelbraun, Durchmesser größer als 5 mm, Auftreten von Erythemen und Erhabenheit (Gandini et al., 2005; Mitsui et al., 2016). Dabei korreliert die Definition eines atypischen Nävus teilweise mit der allgemein gültigen „ABCD“-Regel (Asymmetrie des

Aufbaus, Begrenzung unscharf, Colorit inhomogen, Durchmesser größer als 6 mm), die zur Diagnose eines malignen Melanoms dient (Perkins and Duffy, 2015). Die Abgrenzung zum Melanom fällt somit teilweise schwer.

2.1.2. Nävogengese und Melanomentstehung

Melanozyten stammen aus der Neuralleiste ab, die in der Embryogenese aus dem Neuralrohr entsteht. Sowohl Zeitpunkt der Zellwanderung als auch Migrationsweg entscheiden, ob aus den gemeinsamen Vorläuferzellen Neurone und Gliazellen (ventrale Migration) oder Melanozyten (dorsoventrale Migration) entstehen (Erickson and Goins, 1995). Dass dieser Vorgang weitaus komplexer als eben beschrieben ist, zeigen Studien, die nahelegen, dass eine Subpopulation von Melanozyten von Schwann-Zell-Vorläuferzellen abstammt (Adameyko et al., 2009). Die direkten Vorläuferzellen von Melanozyten werden Melanoblasten genannt, die unpigmentiert sind und erst nach ihrer Wanderung in die Epidermis zu den pigmentbildenden Melanozyten differenzieren.

Angeborene (kongenitale) oder erworbene Nävi entstehen als benignes Neoplasma durch eine erhöhte Proliferation von Melanozyten (Grichnik et al., 2014). Dieser benigne Nävus besteht aus einer klonalen Population an Melanozyten und wächst nach der anfänglichen Wachstumsphase nicht weiter, da die Zellen in den Zustand der zellulären Seneszenz übergehen (Gray-Schopfer et al., 2006; Mooi and Peepers, 2006). Wird die zelluläre Seneszenz überwunden, kann sich ein dysplastischer Nävus entwickeln, der größer ist und einige atypische Zellen enthält. Wie in **Abbildung 2** gezeigt, geht man davon aus, dass die Entstehung eines malignen Melanoms schrittweise abläuft und in unterschiedliche Stufen eingeteilt werden kann. Auf den dysplastischen Nävus folgt das erste maligne Stadium, die radiale Wachstumsphase (RGP, *radial growth phase*). Diese frühe Tumorform ist begrenzt auf die Epidermis und hat nur ein geringes invasives Potenzial. In der nächsten Stufe, der vertikalen Wachstumsphase (VGP, *vertical growth phase*), erlangen die Zellen die Fähigkeit, die Basalmembran zu durchdringen und in die Dermis einzudringen, wo sie letztendlich über das Blut- oder Lymphsystem in andere Organe wie Leber, Lunge und Gehirn metastasieren (Miller and Mihm, 2006). Wie viele Melanome tatsächlich aus Nävi als Vorläuferläsionen entstehen, ist noch nicht abschließend geklärt: Schätzungen schwanken zwischen 25 - 50 % (Bevona et al., 2003; Huang et al., 2017; Sagebiel, 1993), wobei es auch neuere Studien gibt, die belegen, dass bis zu 90 % der superfiziell spreitenden Melanome (SSM) mit Nävi assoziiert sind (Shitara et al., 2014).

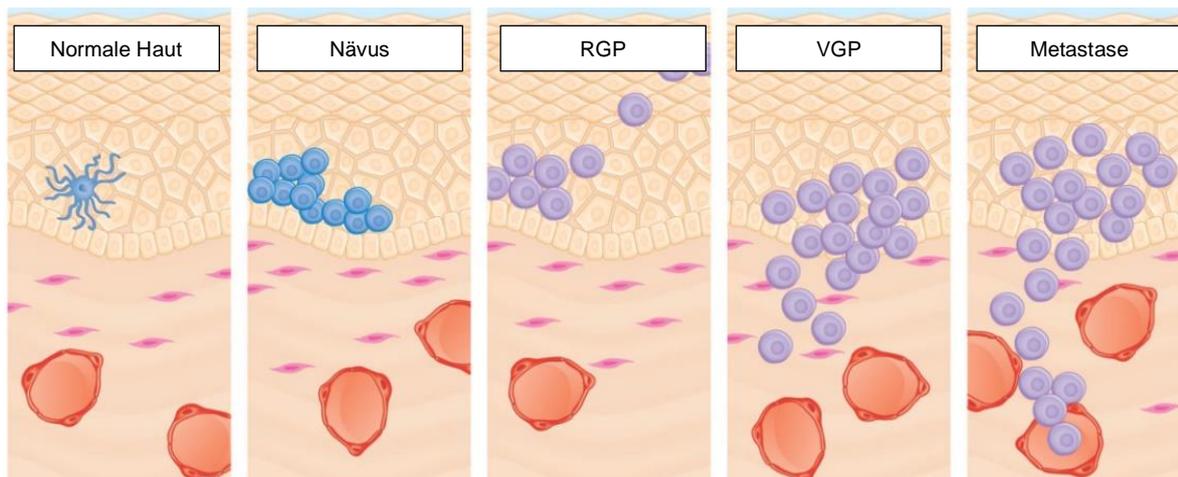


Abbildung 2: Schrittweise Pathogenese des malignen Melanoms.

Ausgehend von einzelnen Melanozyten entwickelt sich über mehrere Stufen das maligne Melanom. (Zaidi et al., 2008) (modifiziert).

Prinzipiell kann das maligne Melanom in 4 Subtypen unterteilt werden. Das bereits erwähnte SSM stellt dabei mit einer Inzidenz von etwa 66 % die am häufigsten auftretende Form in Deutschland dar. Klinisch tritt das SSM in einer Variation an Farben (braun, schwarz, grau, aber auch blau oder weiß) auf und ist dabei scharf begrenzt. Oft tritt es auf der Rückseite der Beine oder am Rücken auf und ist gekennzeichnet durch langsames, intraepidermales und horizontales Wachstum. In etwa 16 % der auftretenden Melanome werden zu den nodulären Melanomen (NM) gezählt und betreffen häufig Patienten zwischen 50 und 60 Jahren. Das NM ist häufig ulzeriert und ist charakterisiert durch das Fehlen einer radialen Wachstumsphase. Durch die ausschließlich auftretende vertikale Wachstumsphase steigt die Metastasierungsrate dieser Melanomform. Das Lentigo-maligna-Melanom (LMM) tritt mit 12 % am dritthäufigsten in Deutschland auf und korreliert mit der Dauer der UV-Exposition und dem Alter. Zudem ist das Auftreten des LMM meistens auf den Bereich des Nackens und des Kopfes beschränkt. Ein histologisches Merkmal ist die Lokalisation der profilierenden Zellen an der Basalmembran der Epidermis. Die seltenste Form der vier Subtypen ist das akrolentigöse Melanom (ALM) mit einer Inzidenz von 2 % in Deutschland. Das ALM tritt meistens an unbehaarten Körperteilen wie Finger, Handflächen oder Fußsohlen auf. Unter der weißen Bevölkerung stellt das die seltenste Form der vier Subtypen dar, allerdings ist das ALM die häufigste Melanomform unter asiatischen, hispanischen und afrikanischen Patienten (Duncan, 2009; Friedrich and Kraywinkel, 2018; Markovic et al., 2007; Rastrelli et al., 2014).

2.1.3. Inzidenz und Risikofaktoren des malignen Melanoms

Im Gegensatz zu vielen anderen Krebserkrankungen steigt die Inzidenz des malignen Melanoms weltweit jährlich an. Die *American Cancer Society* rechnet mit über 96.000

Neuerkrankungen und über 7000 Todesfällen in den USA für das Jahr 2019. Damit stellt das maligne Melanom die fünfthäufigste prognostizierte Tumorneuerkrankung in den USA dar (Siegel et al., 2019). In den letzten 10 Jahren (2008 bis 2018) ist der prozentuale Anteil der Neuerkrankungen um 53 % gestiegen (Jemal et al., 2008; Siegel et al., 2018). Die 5-Jahresüberlebensrate liegt in den USA bei 99 %, wenn das Melanom früh erkannt wird. Diese Rate sinkt auf 63 %, wenn Melanomzellen bereits in die Lymphknoten metastasiert sind und auf 20 %, wenn das Melanom in weitere Organe gestreut hat (Siegel et al., 2018). Die Inzidenzraten für Europa variieren, aber es lässt sich feststellen, dass die höchsten, prozentualen Anzahlen der Neuerkrankungen in der Schweiz und in den skandinavischen Ländern zu finden sind (MacKie et al., 2009; Rastrelli et al., 2014).

Zu den Inzidenzraten des malignen Melanoms in Bezug auf das Geschlecht existieren unterschiedliche Studien. Zum einen gibt es Untersuchungen, die belegen, dass Männer 1,5-mal häufiger an einem Melanom erkranken als Frauen. Andere Studien weisen darauf hin, dass die Prävalenz in beiden Geschlechtern in Bezug auf das Alter analysiert werden sollte. So ist das Erkrankungsrisiko bei Frauen bis zu einem Alter von 40 Jahren größer; ab einem Alter von 75 Jahren ist jedoch die Inzidenz bei Männern dreimal höher als bei Frauen (Lasithiotakis et al., 2010; Rastrelli et al., 2014; Rigel, 2010). Je nach Geschlecht tritt das Melanom an bevorzugten Körperstellen auf: bei Männer meist am Rücken und bei Frauen an den Armen und Beinen (Markovic et al., 2007).

Es wird angenommen, dass das Melanom eine multifaktorielle Erkrankung ist, die auf einem Zusammenspiel von genetischer Prävalenz und Umweltfaktoren beruht. Der gefährlichste Umweltfaktor ist aufgrund ihrer genotoxischen Wirkung die ultraviolette Strahlung (UV). Im Durchschnitt verdoppelt sich die Gefahr der Melanomentstehung nach mehr als 5 Sonnenbränden (Pfahlberg et al., 2001). Dabei geht offenbar die größte Gefahr von Sonnenbränden in der Kindheit aus (Elwood and Jopson, 1997). UV-Strahlung wird unterteilt in UVC (200-280 nm), UVB (280-320 nm) und UVA (320-400 nm), wobei vor allem die UVB-Strahlung eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Melanoms spielt. UVB-Strahlung kann bis zur Basalzellschicht der Epidermis durchdringen, in der unter anderem die Melanozyten sitzen. Die UV-Strahlung ist vermutlich auch der Grund für eine erhöhte Rate an Mutationen im Melanom im Vergleich zu anderen Krebsarten. Dabei stellt die Transition von Cytidin zu Thymin (C>T) den größten Anteil an Basenmutationen dar (Hodis et al., 2012). Zudem löst UV-Strahlung die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) aus, verändert die Expression von Wachstumsfaktoren und beeinflusst das kutane Immunsystem und fördert somit die Entstehung, Progression und Metastasierung des Melanoms (Anna et al., 2007; Brenner et al., 2005).

Neben Umweltfaktoren hat auch die Familiengeschichte einen wichtigen Einfluss auf das Risiko, an einem Melanom zu erkranken. In einer 2004 veröffentlichten Studie konnte ein autosomal-dominantes Vererbungsmuster bei mehreren Familienmitgliedern in unterschiedlichen Generationen nachgewiesen werden. Dabei gehörten Mutationen des *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitors 2A*) - und *CDK4* (*cyclin-dependent kinase 4*) - Genlokus zu den häufigsten gefundenen genetischen Abweichungen, die im folgenden Abschnitt „2.1.4 Melanom-assoziierte Mutationen und Signalwege“ genauer beschrieben werden. Bei Patienten mit einer genetischen Prädisposition für die Entwicklung eines malignen Melanoms tritt die Erkrankung meist in einem Alter unter 40 Jahren auf und es bilden sich oft mehrere primäre Melanome (Stam-Posthuma et al., 2001; Tsao and Niendorf, 2004). Zudem erhöhen bestimmte phänotypische Charakteristika wie rote Haare, helle Haut und Augenfarbe, zahlreiche Sommersprossen und Sonnenempfindlichkeit das Risiko, an einem Melanom zu erkranken, um 50 % (Rastrelli et al., 2014; Titus-Ernstoff et al., 2005).

2.1.4. Melanom-assoziierte Mutationen und Signalwege

Genomsequenzierungen von Melanomen konnten eine bemerkenswerte genetische Komplexität aufdecken. So wurden tausende Mutationen, Deletionen, Amplifikationen, Translokationen und Veränderungen in der DNA-Methylierung in einem einzigen Tumor gefunden (Hodis et al., 2012). Daher sollen die wichtigsten Mutationen, die auch im Zuge dieser Doktorarbeit angesprochen werden, in diesem Kapitel vorgestellt werden.

Die Mutationen des Gens *B-Raf* (*V-raf murine sarcoma virus oncogene homolog B1*) sind die wahrscheinlich am häufigsten untersuchten onkogenen Veränderungen des Melanoms. *B-Raf* kodiert eine Serin/ Threonin Protein Kinase und ist Bestandteil des MAPK (*mitogen activated protein kinase*) – Signalwegs (**Abbildung 3**). Dieser Signalweg wird über eine Rezeptor-Tyrosinkinase wie beispielsweise den EGF-Rezeptor (*epidermal growth factor receptor*) nach Aktivierung durch einen Liganden initiiert, welche das nachstehende Ras-Protein (H-, K- und N-Ras) (*rat sarcoma*), das an die Plasmamembran gebunden ist, aktiviert. In dieser aktivierten Form kann Ras an Raf (Raf-1, B-Raf und A-Raf) binden und dieses aktivieren. Die aktivierte Raf-Kinase phosphoryliert die Kinase MEK (MAP/ERK-Kinase), die wiederum ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*) phosphoryliert. Die aktivierten Kinasen ERK1/2 ihrerseits sind in der Lage zahlreiche zytoplasmatische und nukleäre Ziele zu phosphorylieren, darunter weitere Kinasen, Phosphatasen, Transkriptionsfaktoren und Zytoskelett-Proteine (Yoon and Seger, 2006). Je nach Zelltyp reguliert der ERK-Signalweg dadurch unterschiedliche Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Zellfortbestand, Migration, Angiogenese und die Umstrukturierung des Chromatins (Dunn et al., 2005).

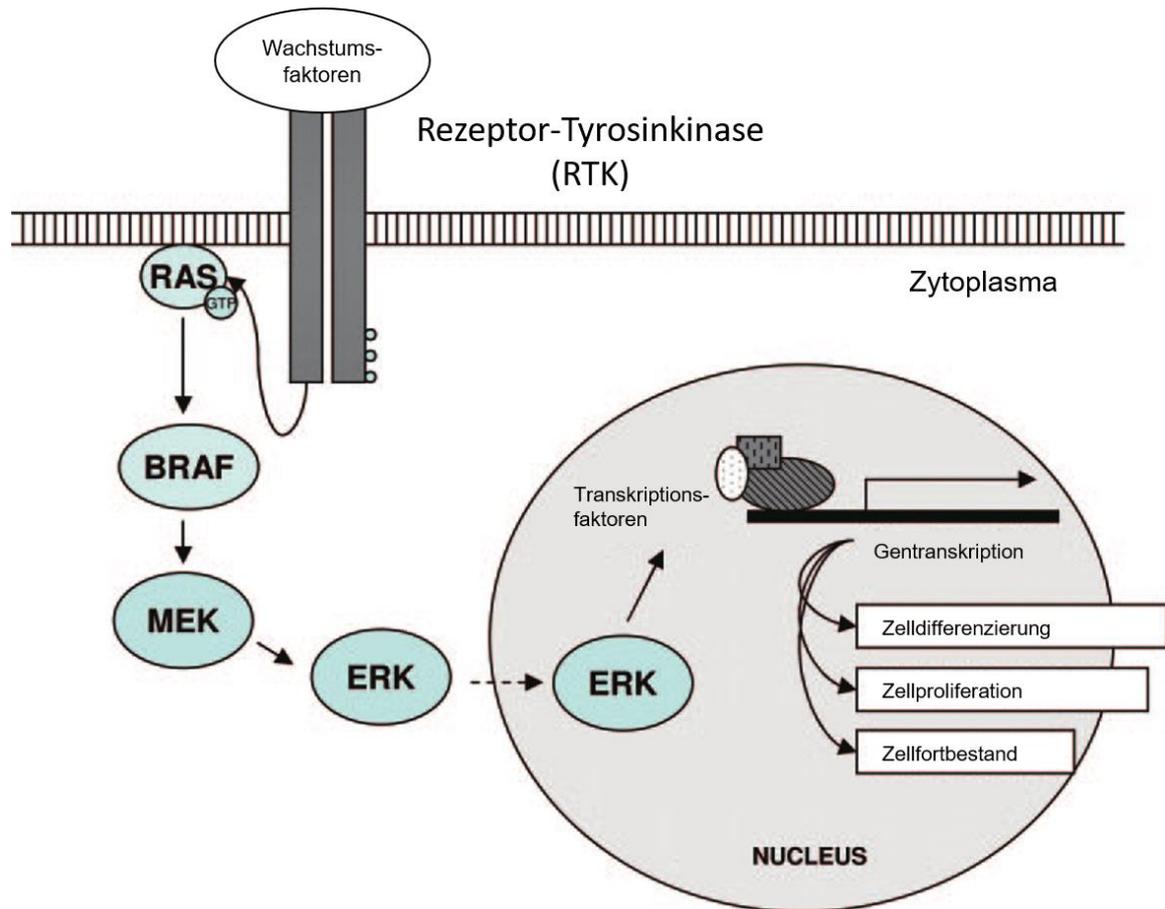


Abbildung 3: Schematische Darstellung des MAPK-Signalwegs.

Durch die Induktion dieses Signalwegs werden Transkriptionsfaktoren aktiviert, die wiederum unter anderem die Differenzierung und Proliferation der Zelle initiieren (Ciampi and Nikiforov, 2007) (modifiziert).

In über 50 % aller Melanome können aktivierende Mutation von *B-Raf* gefunden werden, wobei die häufigste Mutation die Substitution von Valin (V) durch Glutamat (E) im Exon 15 an Position 600 (V600E) darstellt. Am zweihäufigsten lassen sich aktivierende Mutationen von *N-Ras* (*neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog*) finden. Ras verbindet den MAPK-Signalweg mit einem weiteren, im Melanom häufig fehlreguliertem Signalweg: dem anti-apoptotischen PI3K/AKT-Signalweg. Mutiertes N-Ras führt über PI3K (Phosphoinositid 3-Kinase) zu einer gesteigerten Aktivierung von AKT (Proteinkinase B) und schließlich zur Synthese von anti-apoptotischen Genen. Dieser Prozess wird durch die Phosphatase PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) gehemmt. Ein Verlust von PTEN, welcher zu einer Fehlregulation der AKT-Aktivität führt, kann in rund 20 % aller Melanome gefunden werden (Sekulic et al., 2008; Tsao et al., 2004).

Interessanterweise schließen sich *N-Ras*- und *B-Raf*-Mutation fast vollständig aus. Nur in sehr seltenen Fällen (ca. 0,5 %) treten Ko-Mutationen auf (Fedorenko et al., 2013; Jakob et al.,

2012). Während B-Raf normalerweise von der GTPase K-Ras aktiviert wird, führt die V600E-Mutation zu unregulierter Kinase-Aktivität und letztendlich zu einer konstitutiven Aktivierung der Proteinkinase MEK, was wiederum den wachstumsfördernden ERK-Signalweg aktiviert. Durch die Mutation kommt es zu einer Veränderung der katalytischen Domäne von B-Raf, wodurch die Kinase-Aktivität im Vergleich zu Wildtyp-B-Raf 500fach erhöht ist (Wan et al., 2004). Zusätzlich können aktivierende *B-Raf*-Mutation auch häufig in benignen und dysplastischen Nävi gefunden werden (Abildgaard and Gulberg, 2015). Die Mutation dieses Gens allein ist allerdings nicht ausreichend, um ein Melanom zu verursachen. Eine zusätzliche genetische Veränderung ist in diesen Zellen nötig, um einen kanzerogenen Phänotyp hervorzurufen (Shtivelman et al., 2014). Das kann beispielsweise eine Mutation des *CDKN2A* Locus sein. Dieser Locus liegt auf Chromosom 9p21 und kodiert für zwei Tumorsuppressoren: p16^{Ink4a} (p16) und p14^{ARF} (p14) (**Abbildung 4**).

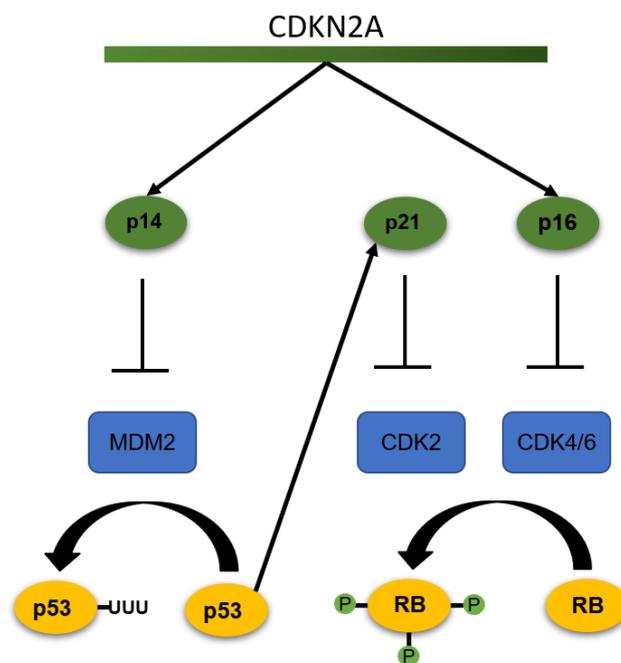


Abbildung 4: Zusammenhang zwischen *CDKN2A* und dem Zellzyklus.

Der Locus *CDKN2A* kodiert für die zwei Tumorsuppressoren p14 und p16. P16 inhibiert CDK4/6 und verhindert somit die Phosphorylierung von RB. Dadurch wird der Zellzyklus gehemmt. P14 hemmt MDM2 und somit die Ubiquitinierung von p53. P53 reguliert über p21 ebenfalls den Zellzyklus, da p21 sowohl CDK2 als auch CDK4/6 inhibiert.

P14 beziehungsweise p19^{ARF} (p19, murines Homolog) stellen dabei Spleißvarianten von p16 dar, was durch die Bezeichnung ARF (*alternative reading frame*) gekennzeichnet ist. Sowohl p14 als auch p16 fungieren als Inhibitor des Zellzyklus (Sharpless and Chin, 2003). Eine Inaktivierung von *CDKN2A* durch Deletion oder Mutation führt zu unkontrollierten Zellproliferationen (Liu et al., 2014; Paluncic et al., 2016). Dies tritt in 16 - 41 % aller

sporadischen Melanome und sehr häufig im familiären Melanom auf (siehe „2.1.3. Inzidenz und Risikofaktoren des malignen Melanoms“) (Liu et al., 2014; Shtivelman et al., 2014). P16 ist ein negativer Regulator des Zellzyklus, indem es CDK4/6 bindet und inhibiert, wodurch die Phosphorylierung des Retinoblastom (Rb)-Protein verhindert wird. Dadurch wird der Zellzyklus am G₁ - S Übergang unterbrochen (Bartkova et al., 1996). P14 hingegen ist ein positiver Regulator von p53 (*tumor protein p53*), in dem es die Ubiquitin-Ligase MDM2 (*murine double minute*) inhibiert, die die den Ubiquitin-vermittelten Abbau von p53 reguliert. Ein Zielgen von p53 ist unter anderem p21, das auch bekannt ist unter CIP1 (*CDK-interacting protein 1*) oder WAF1 (*wild-type p53-activated factor*) und von dem Genlokus *CDKN1A* kodiert wird. P21 fungiert ebenfalls als CDK-Inhibitor und bindet wie p16 an CDK4/6 sowie CDK2 und hemmt somit die Progression des Zellzyklus (Harper et al., 1993). Insgesamt steuert p53 die Expression von Genen, die an der Induktion von Apoptose oder Seneszenz, an der Kontrolle des Zellzyklus, und an der DNA-Reparatur beteiligt sind. Im Gegensatz zu anderen Krebsarten findet man im Melanom allerdings eine relativ geringe Mutationsfrequenz von etwa 9 % (Petitjean et al., 2007). Während bei anderen Tumorarten dieser gesamte Signalweg häufig auf Level des p53-Proteins gehemmt wird, scheint im Melanom der Verlust von p16 und p14 entscheidender zu sein (Sekulic et al., 2008).

Des Weiteren konnten Mutationen der Promotor-Region der Telomerase RT (*TERT, telomerase reverse transcriptase*) bei vielen Krebsarten, unter anderem auch im Melanom, gefunden werden. TERT ist eine katalytische Untereinheit der Telomerase, die für die Aufrechterhaltung der Telomere zuständig ist, die sich bei jeder Teilung verkürzen und somit das Zellwachstum beschränken. Eine Mutation dieses Gens in der Promotor-Region führt zu einer erhöhten Transkription dieses Gens und kann sowohl im familiären als auch im sporadischen Melanom gefunden werden. In primären Melanomen konnten in 33 %, in Melanom-Metastasen sogar in 85 % aller Fälle *TERT*-Mutationen gefunden werden, jedoch keine in RGP-Melanomen oder in Nävi (Griewank et al., 2014; Horn et al., 2013).

Ebenso ist in Nävi der metabotrope Glutamatrezeptor 1 (*Grm1*) nicht detektierbar, jedoch lässt sich in 65 % aller humanen Melanom-Biopsien sowie in 80 % aller humanen Melanomzelllinien eine Überexpression von *Grm1* sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene belegen (Isola et al., 2018; Pollock et al., 2003a). *Grm1* ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der die nachgestellten MAPK- und PI3K/AKT-Signalwege aktiviert und somit Zellproliferation und Inhibition der Apoptose reguliert (Marin and Chen, 2004; Yu et al., 2017).

2.1.5. Therapiemöglichkeiten des malignen Melanoms

Bei vielen Patienten befindet sich das diagnostizierte Melanom in einer frühen Phase der Erkrankung und das Mittel der Wahl ist die chirurgische Entfernung des Melanoms. Bei

manchen Patienten kann allerdings ein Rezidiv entstehen und bei etwa 10 % aller Patienten wird das Melanom erst in einem fortgeschrittenen Stadium entdeckt, das inoperabel ist oder bereits metastasiert ist (Luke et al., 2017). Für diese Patienten gibt es seit 2011 verschiedene therapeutische Wirkstoffe.

Wie im Abschnitt „2.1.4. Melanom-assoziierte Mutationen und Signalwege“ beschrieben, lassen sich in etwa 50 % aller Melanome Mutationen des *B-Raf*-Gens finden, darunter am häufigsten die *B-Raf*^{V600E}-Mutation. Diese Punktmutation führt zu einem konstitutiv aktiven MAPK-Signalweg und unkontrolliertem Tumorwachstum. Die zielgerichtete Therapie (*targeted therapy*) setzt mit B-Raf- (Vemurafenib und Dabrafenib) und MEK-Inhibitoren (Cobimetinib und Trametinib) genau an diesem Signalweg an. Diese Therapiemöglichkeit besteht exklusiv für Patienten mit einer *B-Raf*^{V600E}-Mutation. Für andere Mutationen von beispielsweise *N-Ras* oder *CDKN2A* gibt es in der Klinik noch keine gezielte Therapieform. Allerdings zeigte die Behandlung der Patienten mit dem MEK-Inhibitor Binimetinib einen größeren Erfolg als ein chemotherapeutischer Ansatz mit Dacarbazin (Christiansen et al., 2017). Für die Behandlung von Melanomen mit *B-Raf*^{V600E}-Mutation hat sich die Kombination aus B-Raf- und MEK-Inhibitor als sinnvoller Ansatz hervorgetan. Mit einer Ansprechrate von etwa 70 % und einer progressionsfreien Überlebensrate von etwa 12 Monaten hat sich die Kombination der beiden Medikamente etabliert (Grimaldi et al., 2015; Long et al., 2015; Robert et al., 2015).

Immuntherapien im Melanom haben sich nach den ersten Erfolgen von Interleukin-2-Behandlungen weiterentwickelt und werden heutzutage für spezifische Blockaden von Immuncheckpoints eingesetzt. Als Strategie zur Tumorbekämpfung steht hier die Steigerung der Antitumoraktivität des Immunsystems im Mittelpunkt. Die Entdeckung des CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4*)-Rezeptors als negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung führte zur Entwicklung des ersten genehmigten Immuncheckpoint-Wirkstoffs, dem anti-CTLA4-Antikörper Ipilimumab (Baksh and Weber, 2015; Hodi et al., 2010). Durch die Behandlung mit Ipilimumab konnte bei Melanompatienten eine um 4 Monate längere mediane Überlebensrate im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Hodi et al., 2010; Schadendorf et al., 2015). PD-1 (*programmed cell death protein 1*)-Rezeptor und PD-L 1 (*programmed cell death ligand 1*), die T-Zellen negativ regulieren und somit supprimieren, stellen weitere Ziele für eine Behandlung dar. Anti-PD-1-Antikörper wie Pembrolizumab und Nivolumab zeigten in Studien eine effektivere Wirksamkeit mit einer Langzeitüberlebensrate von 35 % bis 45 % (Christiansen et al., 2017; Larkin et al., 2015; Long et al., 2017; Ribas et al., 2016). Noch höhere Überlebensraten als mit einer Monotherapie können mit einer Kombination aus anti-PD-1 und anti-CTLA-4 erzielt werden. Allerdings sprechen nicht alle Patienten auf diese Behandlung an, die zudem noch bei vielen starke Nebenwirkungen auslösen kann (Larkin et al., 2015).

2.2. **Melanoma Inhibitory Activity (MIA)**

Die erste Isolation des Proteins MIA (*melanoma inhibitory activity*) gelang bei der Suche nach autokrinen Wachstumsfaktoren aus den Zellkulturüberständen der Zelllinie HTZ-19, welche aus einer Hirnmetastase eines malignen Melanoms isoliert worden war. Erste Versuche zeigten, dass das aufgereinigte Protein zu einer Hemmung des Wachstums von Melanomzellen *in vitro* und mit dem Abrunden der behandelten Zellen zu erheblichen Veränderungen der Zellmorphologie führte (Apfel et al., 1992; Blesch et al., 1994). Zusätzlich konnte MIA etwas später bei einem Vergleich zwischen differenzierten und dedifferenzierten Chondrozyten *in vitro* identifiziert werden. Da die Dedifferenzierung mithilfe von Retinolsäure forciert wurde, verwendete man in diesem Zusammenhang die Bezeichnung CD-RAP (*cartilage-derived retinoic acid sensitive protein*) (Dietz and Sandell, 1996). Die ursprüngliche Annahme, dass MIA tumorsuppressiv wirkt, konnte in weiteren Studien widerlegt und zudem gezeigt werden, dass MIA an der Entwicklung und Progression des malignen Melanoms beteiligt ist. In diesem Zusammenhang wurde auch festgestellt, dass MIA in Melanozyten nicht nachweisbar ist, aber in Melanomzellen und somit auch im malignen Melanom eine starke MIA-Expression detektiert werden kann. Zudem konnte in einigen Fällen eine gesteigerte MIA-Expression in weiteren Tumorarten wie Magenkrebs, Kolonkarzinom, Brustkrebs, Prostatakrebs, Blasenkrebs belegt werden (Sasahira et al., 2018).

2.2.1. **MIA-Proteinfamilie**

MIA gehört zu einer Proteinfamilie, die aus vier Mitgliedern besteht. Diese Proteine teilen sich Homologien in der Aminosäure und cDNA-Sequenz sowie eine konservierte SH3 (*Src homology 3*) - ähnliche Domäne (Bosserhoff et al., 2003a), die bisher nicht bei anderen sekretierten Proteinen gefunden werden konnte. Diese Domäne erkennt prolinreiche Aminosäurebereiche und ist an Proteininteraktionen beteiligt (Stoll and Bosserhoff, 2008). Neben MIA gehört das leberspezifische Protein MIA2 zu der Familie. Die Expression von MIA2 ist im Falle einer Leberfibrose sowie chronischer Hepatitis C erhöht. MIA2 wirkt inhibierend auf das Tumorwachstum und die Invasion des hepatozellulären Karzinoms (Bosserhoff et al., 2003a; Hellerbrand et al., 2008; Xu et al., 2011). TANGO (*transport and Golgi organization protein 1*) (MIA3) wird in höheren Konzentrationen während der Embryogenese und ubiquitär in den meisten adulten Geweben exprimiert. Für dieses Protein konnte eine tumorsuppressive Wirkung im hepatozellulären Karzinom und malignen Melanom nachgewiesen werden (Arndt and Bosserhoff, 2006; Arndt et al., 2007; Bosserhoff et al., 2004). Über die Funktion des homologen Proteins OTOR (*otoraplin, fibrocyte-derived protein*), das ausschließlich in der Cochlea des Innenohrs exprimiert wird, ist in der Literatur wenig bekannt (Cohen-Salmon et al., 2000; Robertson et al., 2000).

2.2.2. Funktionen von MIA

Die Expression des Proteins MIA kann durch UV-Strahlung induziert werden, was einen direkten Zusammenhang zwischen Melanom und MIA herstellt (Marr et al., 2004). Zudem konnte in Studien nachgewiesen werden, dass erhöhte MIA Proteinlevel im Plasma sich negativ auf die Überlebensrate von Patienten mit malignem Melanom auswirken (Garnier et al., 2007; Juergensen et al., 2001). Die Höhe des MIA-Serumspiegel bei Melanompatienten korreliert dabei mit der Melanomprogression. In diesem Zusammenhang konnte MIA als diagnostischer Marker etabliert werden (Riechers and Bosserhoff, 2014).

Das MIA-Vorläuferprotein besteht aus 131 Aminosäuren. Nach Abspaltung der N-terminalen Signalsequenz von 24 Aminosäuren, die die Sekretion des Proteins in den Extrazellulärraum vermittelt, entsteht das mature MIA-Protein, bestehend aus 107 Aminosäuren und einer Größe von 11kDa (Blesch et al., 1994). Nach der Sekretion von MIA am hinteren Zellpol inhibiert MIA die Haftung der Zellen an Komponenten der extrazellulären Matrix, darunter Fibronectin, Laminin und Tenascin (Bauer et al., 2006; Stoll et al., 2001). MIA bindet zudem direkt an die Integrine $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_5\beta_1$ was lokal zu einer reduzierten Zelladhäsion am hinteren Zellpol führt. Die gebildeten MIA-Integrin-Komplexe werden internalisiert, MIA in den Lysosomen degradiert und die Integrine recycelt und zum vorderen Zellpol transportiert, wo neue Adhäsionskontakte entstehen. Auf diese Weise findet eine gerichtete Zellbewegung statt, die insbesondere im Bezug auf das hohe Metastasierungspotenzial des malignen Melanoms eine Rolle spielt (Guba et al., 2000; Schmidt and Bosserhoff, 2009).

Über Kernresonanz-Spektroskopie und Western Blot-Analysen konnte aufgedeckt werden, dass MIA die Tendenz hat, Dimere zu bilden. Funktionelle Analysen an MIA Protein Mutanten legen nahe, dass die Dimerisierung nötig ist, damit MIA aktiv an die Integrin-Bindungsstelle binden kann. Monomere MIA-Formen waren in diesem Zusammenhang inaktiv. Versuche mit Melanom-Mäusen, die mit einem spezifischen Peptid behandelt wurden, das die Dimerisierung von MIA verhindert, führten zu einer Reduktion der Metastasierung (Schmidt et al., 2012).

Da die Induktion der MIA-Expression in der frühen Melanomentstehung stattfindet und die Expression, wie bereits beschrieben, mit der Tumorprogression korreliert, wurde in weiteren Studien die Rolle von MIA bei der Entwicklung des Melanoms untersucht. Dafür wurde die MIA-Expression in einer Melanomzelllinie stabil ausgeschaltet und mit der parentalen Zelllinie HMB2 verglichen. Untersuchungen an diesen MIA-defizienten Melanomzellen zeigten eine Veränderung der Zellmorphologie, eine Wiederherstellung von Zell-Zell-Kontakten und eine Reaktivierung der Melanin-Synthese (Poser et al., 2004; Tatzel et al., 2005).

2.3. Seneszenz

Zelluläre Seneszenz wird als Zellreaktion auf intrinsischen Stress betrachtet, welche die proliferative Lebensspanne von Zellen limitiert. Per Definition ist dieser Zustand gekennzeichnet von einem permanentem Wachstumsarrest der Zellen, der nicht durch mitogene Stimuli reaktiviert werden kann (Campisi, 2005a). Auslöser von Seneszenz können verschiedene Signale sein. Löst beispielsweise die kontinuierliche Verkürzung der Telomere bei Replikationsvorgängen Seneszenz aus, wird dieser Zustand allgemein als replikative Seneszenz definiert. Dieses limitierte Wachstumsverhalten von Zellen wurde erstmals von Hayflick und Moorehead bei primären humanen Fibroblasten beschrieben (Hayflick and Moorhead, 1961). Sie entdeckten, dass diese Zellen nach einer Reihe an Passagierungen ihr Wachstum einstellten, aber trotzdem noch wochenlang metabolisch aktiv waren. Diese Einschränkung der Zell-Teilungsfähigkeit nach einer gewissen Anzahl an Passagierungen *in vitro* wird heutzutage als Hayflick-Limit bezeichnet und beschreibt die maximale Verdopplungszahl einer Zelllinie. Neben der Telomerverkürzung gibt es noch weitere Signale, die zelluläre Seneszenz induzieren können. Zu den bekanntesten zählen aktivierende Onkogene (Onkogen-induzierte Seneszenz), DNA-Schäden durch beispielsweise UV-Strahlung (DNA-Schäden-induzierte Seneszenz), Antitumorsubstanzen, die in der Krebstherapie eingesetzt werden (Chemotherapie-induzierte Seneszenz) und oxidativer Stress. Letzterer wird von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS, *reactive oxygen species*) wie H₂O₂ ausgelöst und löst Stress-induzierte Seneszenz aus (Munoz-Espin and Serrano, 2014; Petrova et al., 2016; Sharpless and Sherr, 2015). Zusätzlich wurde erst kürzlich ein seneszenten Phänotyp definiert, der durch eine mitochondriale Dysfunktion ausgelöst wird (MiDAS, *mitochondrial dysfunction-associated senescence*) (Hernandez-Segura et al., 2018; Wiley et al., 2016).

2.3.1. Merkmale von Seneszenz

Der seneszenten Phänotyp ist sehr heterogen und kann nicht durch einen einzelnen molekularen Marker bestimmt werden. Ein Hauptmerkmal von seneszenten Zellen impliziert das Fehlen von Proliferationsmarkern wie Ki-67. Zudem treten morphologische Veränderungen wie Zellvergrößerung, Mehrkernigkeit, Vakuolisierung und Abflachen der Zelloberfläche auf. Des Weiteren kann eine erhöhte Expression der Zellzyklusinhibitoren p14^{ARF}, p15^{Ink4b}, p16^{Ink4a}, p21^{Cip1, Waf1}, p27^{Kip1} detektiert werden (Campisi and d'Adda di Fagagna, 2007; Collado and Serrano, 2006; Hernandez-Segura et al., 2018). Zudem lassen sich Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci (SAHF) durch eine DAPI-Färbung nachweisen (Narita et al., 2003). Als Goldstandard gilt der Nachweis von Seneszenz-assoziiierter β -Galactosidase (SA- β -Gal). Die lysosomale β -Galactosidase Aktivität erhöht sich

im seneszenten Zustand soweit, dass diese auch bei einem suboptimalen pH 6 messbar ist (optimaler pH = 4,5). Dabei gilt ein blauer Farbumschlag als Indikator für die Enzymaktivität der β -Galactosidase (Itahana et al., 2007; Lee et al., 2006).

2.3.2. Wichtige Signalwege der zellulären Seneszenz

Normales Zellwachstum wird über ein Zusammenspiel komplexer Signale reguliert, die Zellmetabolismus, Proliferation, Differenzierung und Zelltod kontrollieren. Zentrales Element ist dabei der Zellzyklus, der aus Interphase und Mitose (M-Phase) besteht. Die Interphase wird unterteilt in G₁-, S- und G₂-Phase. G₁- und G₂-Phasen sind sogenannte Lücken- und Wachstumsphasen (*gap- / growth-phase*) in denen Zellwachstum und Vorbereitung auf die S-Phase bzw. Mitose vorangetrieben werden. In der Synthese (S)-Phase wird die DNA repliziert, während in der M-Phase die Teilung des Zellkerns (Mitose) stattfindet, auf die in der Regel die Teilung der Zelle (Cytokinese) folgt (Alberts, 2002). Die Übergänge der G₁-, G₂- und M-Phasen und damit der Zellzyklus werden von drei Proteinfamilien kontrolliert: Cycline (A, B, D und E), Cyclin-abhängige Kinasen (CDKs, davon drei Interphase-CDKs (CDK2, CDK4 und CDK6) sowie einer mitotischen CDK (CDK1)) und CDK-Inhibitoren (Miller and Flaherty, 2014).

Die unter Abschnitt „2.3. Seneszenz“ genannten Stimuli können Seneszenz induzieren und über bestimmte molekulare Signalwege zum Austritt der Zellen aus dem Zellzyklus führen (**Abbildung 5**). Der Seneszenz-induzierte Wachstumsstopp wird hauptsächlich über zwei Hauptsignalwege übermittelt: der p53/p21- und der p16/Rb-Signalweg. Welcher Signalweg in den Zellen Seneszenz induziert, ist abhängig von der Art des Signals und dem Zellgewebe (Rizos et al., 2017).

Die Aktivität des p53-Proteins wird hauptsächlich durch posttranslationale Modifikationen kontrolliert. In normalen Zellen stellt p53 ein kurzlebiges Protein dar, das kontinuierlich nach Ubiquitinierung über den proteasomalen Weg abgebaut wird. MDM2 vermittelt die Ubiquitinierung und stellt somit einen negativen Regulator von p53 dar. Hier überschneiden sich hier die beiden Signalwege, da p14, ein Produkt des Genlokus *CDKN2A*, inhibierend auf MDM2 wirkt. Nach Aktivierung reguliert p53 wiederum eine Vielzahl an Zielgenen, die ihrerseits an der Steuerung von zellulären Prozessen wie Seneszenz und Apoptose beteiligt sind (Qian and Chen, 2013). P53 kann Seneszenz über eine Vielzahl an Wegen vermitteln, aber ein Hauptziel ist der CDK-Inhibitor p21 (Salama et al., 2014). P21 kann sowohl CDK1, CDK2, CDK4 und CDK6 hemmen und somit sowohl die S- als auch die M-Phase inhibieren (Chandler and Peters, 2013).

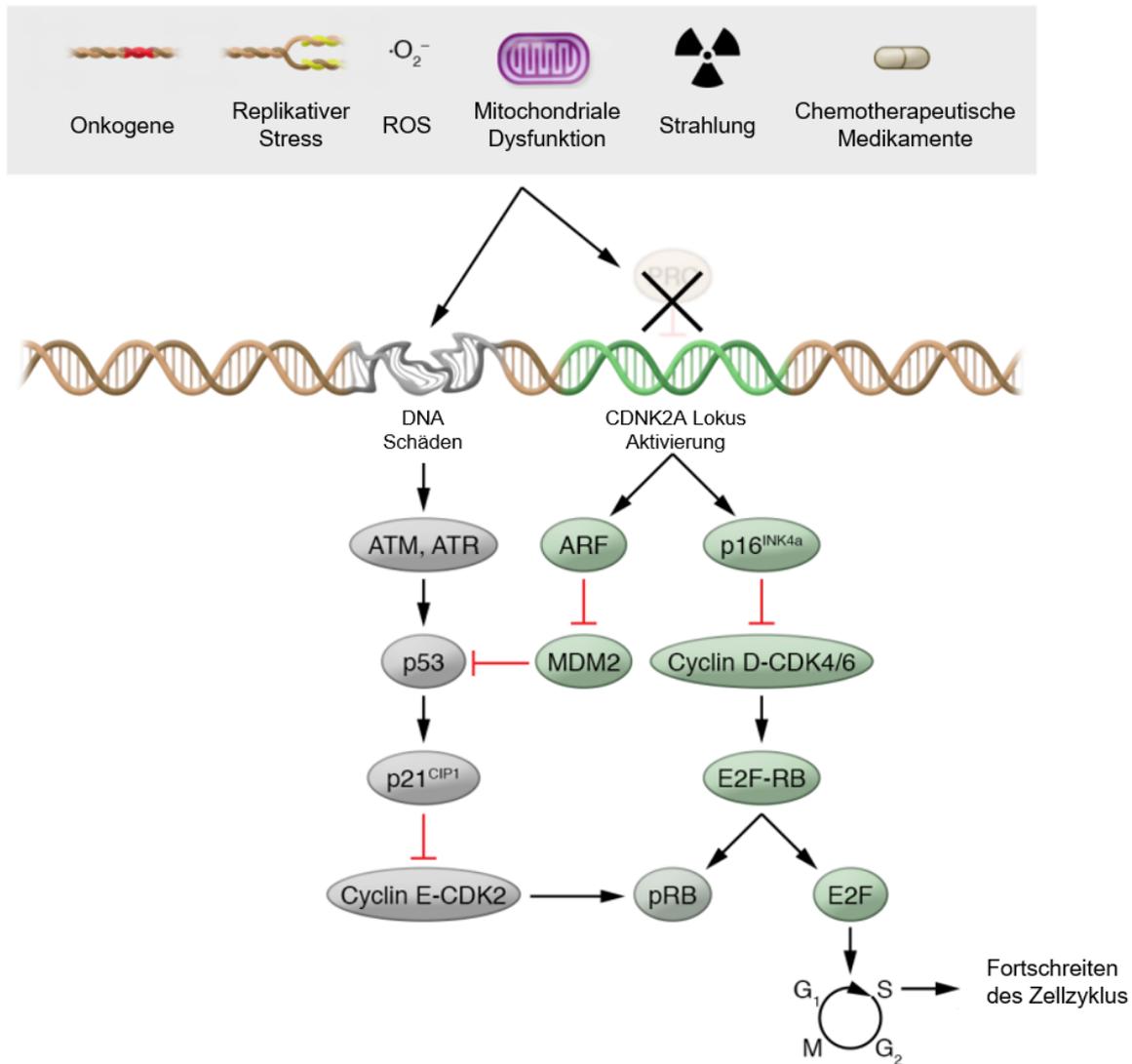


Abbildung 5: Molekulare Signalwege der Seneszenz.

Verschiedene Stimuli können einen Seneszenz-assoziierten Zellzyklus-Arrest auslösen. Dieser wird entweder durch den p16/Rb- oder durch den p53/p21-Signalweg induziert und reguliert (Herranz and Gil, 2018) (modifiziert).

Wie unter dem Abschnitt „2.1.4. Melanom-assoziierte Mutationen und Signalwege“ beschrieben, inhibiert p16 CDK4/6 und verhindert somit die Phosphorylierung des Rb-Proteins. Hypophosphoryliertes Rb interagiert mit dem E2F-Transkriptionsfaktor und inhibiert dadurch dessen Fähigkeit, die Expression von Genen zu aktivieren, die für das Fortschreiten des Zellzyklus notwendig sind. Zusätzlich werden durch die entstandenen Rb-E2F-Komplexe verschiedene Faktoren wie Histon-Deacetylasen oder Histon-Methyltransferasen in der Umgebung der E2F-Ziel promotoren rekrutiert, die die Chromosomenstruktur beeinflussen (Giacinti and Giordano, 2006; Narita et al., 2003). Diese Umstrukturierung des Chromatins führt zur Bildung von SAHFs, zu einer stabilen Unterdrückung von wachstumsfördernden Genen und letztendlich zu einem Wachstumsarrest der Zelle. Als Marker für SAHF werden

dementsprechend Antikörper spezifisch für die Trimethylierung des Lysins an Position 9 des Histons H3 (H3K9me3) verwendet.

P16 ist somit ein positiver Regulator von Rb und ein entscheidender Faktor bei der Bildung von SAHFs (Narita et al., 2003). Dementsprechend konnten verschiedene Studien zeigen, dass replikative und Onkogen-induzierte Seneszenz (OIS) in primären humanen Zellen durch eine Akkumulation von p16 charakterisiert ist (Alcorta et al., 1996; Hara et al., 1996; Serrano et al., 1996). Darüber hinaus kann eine ektopische Expression von p16 Seneszenz auslösen, die durch Zellzyklusarrest, Veränderungen der Zellmorphologie, vermehrter SA- β -Gal-Aktivität und dem Auftreten von SAHFs charakterisiert ist (Dai and Enders, 2000; Haferkamp et al., 2008; Rizos et al., 2017).

2.3.3. DNA Damage Response (DDR)

Der seneszente Wachstumsarrest wird häufig durch eine Reaktion auf DNA-Schäden (*DNA Damage Response*, DDR) induziert, die entweder durch intrinsische (ROS, Telomerverkürzung, Hyperproliferation) oder durch äußerliche Faktoren (UV-Strahlung, Chemotherapie) ausgelöst werden (d'Adda di Fagagna, 2008). So führt die Verkürzung der Telomere in Fibroblasten wie sie Hayflick und Moorehead beschrieben haben zu freien, doppelsträngigen Chromosomenenden, die von der DDR-Maschinerie als Doppelstrangbrüche erkannt werden (d'Adda di Fagagna et al., 2003). Aber auch in Zellen, die OIS durchlaufen, induziert die anfängliche Hyperproliferation nach Onkogen-Aktivierung eine DDR. Als Reaktion auf die mitotischen Signale erhöht sich die DNA-Replikation, wodurch es zu einer Akkumulation von genomischen Fehlern und Schäden kommt (Di Micco et al., 2006). Unabhängig davon, welcher Mechanismus den DNA-Schaden auslöst, ist die DDR durch einen Anstieg von γ -H2Ax (an Ser139 phosphoryliertes Histon H2Ax) und sowie durch die Aktivierung einer Kinase-Kaskade charakterisiert, die mit den Kinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) und ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*) beginnt und letztendlich in der Aktivierung des p53/p21-Signalwegs mündet (siehe **Abbildung 5**) (d'Adda di Fagagna, 2008; d'Adda di Fagagna et al., 2003). Dementsprechend werden γ -H2Ax-Foci oder phosphoryliertes p53 als Marker für Seneszenz verwendet, wobei zu beachten ist, dass nicht alle Seneszenzinduktionen auf DDR zurückzuführen sind.

2.3.4. Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp (SASP)

In den letzten Jahren zeichnet sich immer mehr ab, dass seneszente Zellen die Fähigkeit besitzen, Signale weiterzugeben und damit ihre Umgebung zu beeinflussen. In diesem Zusammenhang konnte unter anderem gezeigt werden, dass seneszente Zellen eine sekretorische Kapazität aufweisen, die als Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp

(SASP) bezeichnet wird. Der SASP beinhaltet Metalloproteasen (MMPs), pro-inflammatorische Chemokine und Wachstumsfaktoren mit auto- und parakrinen Effekten (Coppe et al., 2010; Freund et al., 2010). Ein Teil dieser sekretierten Moleküle kann über autokrine Effekte den seneszenten Zustand verstärken (Acosta et al., 2008; Kuilman et al., 2008). Auf der anderen Seite kann der SASP durch die Sekretion bestimmter Faktoren auch die Tumorgenese in umgebenden, nicht seneszenten Zellen fördern (Giuliano et al., 2011; Olumi et al., 1999). Der SASP wird hauptsächlich durch den proinflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) vermittelt. Ein wesentlicher Auslöser für die NF- κ B-Aktivierung ist die im Abschnitt „2.3.3. DNA Damage Response (DDR)“ besprochene DDR.

Es ist offensichtlich, dass der SASP eine wichtige Rolle in der pathophysiologischen Aktivität von seneszenten Zellen spielt. Zugleich ist der SASP aber zu unspezifisch und heterogen, um als eindeutiger Marker für Seneszenz verwendet zu werden (Coppe et al., 2010; Hernandez-Segura et al., 2017). Die Quantifikation von SASP-Komponenten könnte aber für die Definition von verschiedenen Seneszenz-Programmen eingesetzt werden. Beispielsweise exprimieren seneszente Zellen, die im Zusammenhang mit Gewebeerneuerung stehen, verschiedene Metalloproteasen und Wachstumsfaktoren, während altersassoziierte oder durch Chemotherapie induzierte seneszente Zellen eher mit inflammatorischen Faktoren in Verbindung gebracht werden (Demaria et al., 2017; Demaria et al., 2014; Hernandez-Segura et al., 2018; Jun and Lau, 2011)

2.3.5. Onkogen-induzierte Seneszenz in Melanozyten

Frühe Studien mit mutiertem H-Ras führten zu der Erkenntnis, dass die ausschließliche Induktion dieses Onkogens in primären Zellen zu einem Zellzyklusarrest führt. Serrano et al. erkannten die auffällige, phänotypische Ähnlichkeit dieses Phänomens zu replikativer Seneszenz, welches letztendlich als Onkogen-induzierte Seneszenz bekannt wurde (Serrano et al., 1997).

2002 stellte sich heraus, dass aktivierende *B-Raf*-Mutationen häufig in humanen Tumoren, darunter auch das Melanom, auftreten (Davies et al., 2002). Ein Jahr später wurde entdeckt, dass diese aktivierenden *B-Raf*-Mutationen ebenfalls in vielen Nävi gefunden werden können (Pollock et al., 2003b). Viele Studien zeigten, dass *B-Raf* in bis 80 % aller untersuchten Nävi mutiert ist. *N-Ras*-Mutationen konnten in 5,9-18,2 % aller untersuchten Nävi gefunden werden (Damsky and Bosenberg, 2017; Piris et al., 2015; Poynter et al., 2006; Roh et al., 2015). Zelluläre Seneszenz wird dabei als ein Schutzmechanismus vor Tumorgenese gesehen, wobei die anfängliche, mitogene Mutation einen kleinen benignen Tumor wie einen Nävus, eine Zyste oder einen Polyp hervorruft. Erworbene Nävi werden als klassisches Beispiel für

OIS gesehen. Sie zeigen eine Vielzahl von Seneszenzmarkern wie die verstärkte Expression von p16, erhöhte SA- β -Gal-Aktivität, DDR-Marker wie γ -H2Ax, sowie das Fehlen des Proliferationsmarkers Ki-67 (Alonso et al., 2004; Bennett, 2016; Gray-Schopfer et al., 2006; Johmura et al., 2014; Mackenzie Ross et al., 2013; Michaloglou et al., 2005; Suram et al., 2012; Tran et al., 2012). Dabei scheint nur ein kleiner Anteil der Melanozyten eines Nävus zu proliferieren (Soo et al., 2011). Folglich besteht ein benigner Nävus hauptsächlich aus seneszenten Melanozyten. Da Seneszenzmarker häufig sehr heterogen in primären Melanomen exprimiert werden, kann ein einzelner Marker auch nicht zuverlässig für die Unterscheidung zwischen Nävi und Melanom eingesetzt werden (Tran et al., 2012).

Sowohl in Nävi als auch in kultivierten Melanozyten lassen sich im Zusammenhang mit einer *B-Raf*^{V600E}-Expression die oben beschriebenen, gemeinsamen Marker für Seneszenz finden. Interessanterweise scheinen sich abgesehen davon die Effekte einer *B-Raf*^{V600E}-Mutation *in vivo* und *in vitro* zu unterscheiden. Michaloglou et al. konnten zeigen, dass die Expression von *B-Raf*^{V600E} in kultivierten Melanozyten zu einem raschen Proliferationsarrest führten. Dabei konnte keine anfängliche Hyperproliferation beobachtet werden, wie sie vermutlich *in vivo* auftritt (Michaloglou et al., 2005). Zudem konnten die zytologischen Veränderungen, die während der OIS *in vitro* auftreten (große, flache, dendritische Zellen, Mehrkernigkeit) in dieser Form nicht in Nävus-Melanozyten gefunden werden. Diese tendieren sogar eher dazu, kleiner und weniger dendritisch zu sein als normale Melanozyten (Gray-Schopfer et al., 2006). Allgemein wird mittlerweile davon ausgegangen, dass eine Aktivierung von B-Raf *in vitro* zu OIS führt und *in vivo* in der Nävusformation mit anschließendem Proliferationsstopp resultiert. Die Beobachtung, dass Nävi als Vorläuferläsionen fungieren können, zeigt jedoch, dass für Nävi dieser Wachstumsarrest nicht unüberwindbar ist (Bevona et al., 2003; Damsky and Bosenberg, 2017; Lin et al., 2015). Die zugrundeliegenden Mechanismen sind jedoch noch nicht vollständig verstanden und daher sind Untersuchungen bezüglich der Stabilität und Aufrechterhaltung von Seneszenz Bestandteil aktueller Forschung und werden unter anderem auch in der vorliegenden Arbeit untersucht.

3. Vordaten

Die sich in diesem Kapitel befindenden Daten wurden von Susanne Lamm (geborene Schiffner) erhoben und in ihrer Doktorarbeit bereits gezeigt. Es ist notwendig diese Ergebnisse als Vordaten kurz zu präsentieren, da sie wesentlich zum Konzept dieser Doktorarbeit beigetragen haben. Für die **Abbildung 10** wurden die Daten aber zum Teil nochmals validiert, da dies bei der experimentellen Nutzung von Zellen der Primärzellkultur sinnvoll ist, wenn die Experimente in einem großen zeitlichen Abstand durchgeführt werden.

Anhand einer MIA-defizienten *Grm1*-transgenen Melanom-Maus sollte die Funktion von MIA bei der Entstehung des malignen Melanoms *in vivo* näher untersucht werden. Dabei wurde neben Analysen zur Metastasierung (Daten nicht gezeigt) das Tumor-Onset an den unbehaarten Hautregionen dokumentiert (**Abbildung 6**). Da MIA in bisherigen Untersuchungen als Onkogen-assoziiertes Protein beschrieben wurde, das an der Progression des malignen Melanoms beteiligt ist (Bossert, 2005), überraschte das Ergebnis, dass *Tg(Grm1)/MIA^{-/-}* Mäuse durchschnittlich ein signifikant früheres Melanom-Onset als die *Tg(Grm1)*-Kontrolltiere zeigten.

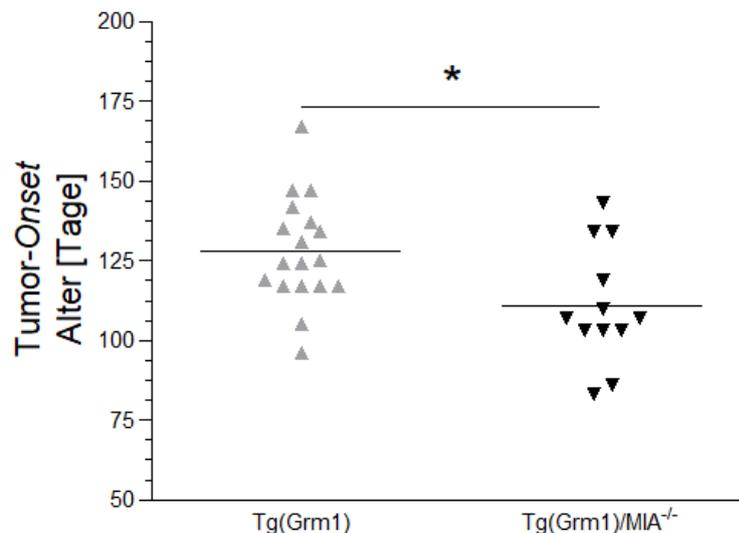


Abbildung 6: Bestimmung des Tumor-Onsets bei *Tg(Grm1)* und *Tg(Grm1)/MIA^{-/-}* Mäusen.

An den unbehaarten Hautregionen (Ohren, Schwanz und Perianalregion) wurde das erstmalige Auftreten eines Melanoms bei *Tg(Grm1)* und *Tg(Grm1)/MIA^{-/-}* Mäusen bestimmt. Dabei zeigten die MIA-defizienten Tiere mit durchschnittlich 111 Tagen ein signifikant früheres Tumor-Onset als die Kontrolltiere (128 Tage). (*: $p < 0,05$).

Normale humane epidermale Melanozyten (NHEM) in Zellkultur gehen nach einer bestimmten Anzahl an Passagierungen und somit Teilungen in einen Zustand der replikativen Seneszenz über (Bandyopadhyay et al., 2001). Dieser Mechanismus wird durch die Verkürzung der

Telomere induziert. Mit Anstieg der Passagenzahl steigt auch die prozentuale Anzahl der seneszenten Zellen, die sich durch eine SA- β -Gal-Färbung darstellen lassen und korrelierend dazu steigt die Expression von MIA an (**Abbildung 7**).

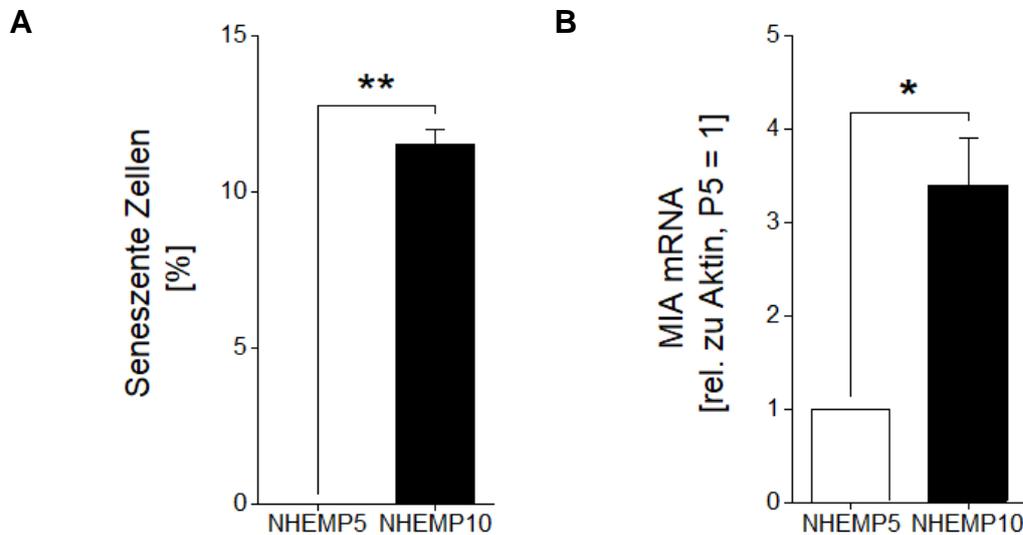


Abbildung 7: Korrelation zwischen Seneszenz und MIA-Expression in NHEMs.

(A) Der Anteil seneszenten Zellen, die durch β -Galactosidase-Färbungen darstellbar sind, war in späten Passagen von NHEMs (P10) signifikant erhöht im Vergleich zu einer früheren Passage (P5). (B) Gleichzeitig stieg mit Erhöhung der Passagenzahl die Expression von MIA an. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

Um die Rolle von MIA bei der Entstehung von Seneszenz genauer zu charakterisieren, wurden MIA-spezifische siRNAs in NHEMs in späten Passagen eingesetzt. Der erfolgreiche *Knockdown* von MIA (**Abbildung 8A**) führte zu einer reduzierten Anzahl von positiv β -Gal-färbten Zellen (**Abbildung 8B**).

Detailliertere Analysen anhand von Zellzyklusinhibitoren p14, p15, p16, p21 und p27 wurden in NHEMs in höheren Passagen nach siMIA Behandlung durchgeführt (**Abbildung 9**). Die Behandlung der Zellen mit siMIA führte zu einer signifikanten Reduktion der p21-Expression im Vergleich zur Kontrolle und legt somit eine Beteiligung von MIA an der Seneszenzregulation nahe.

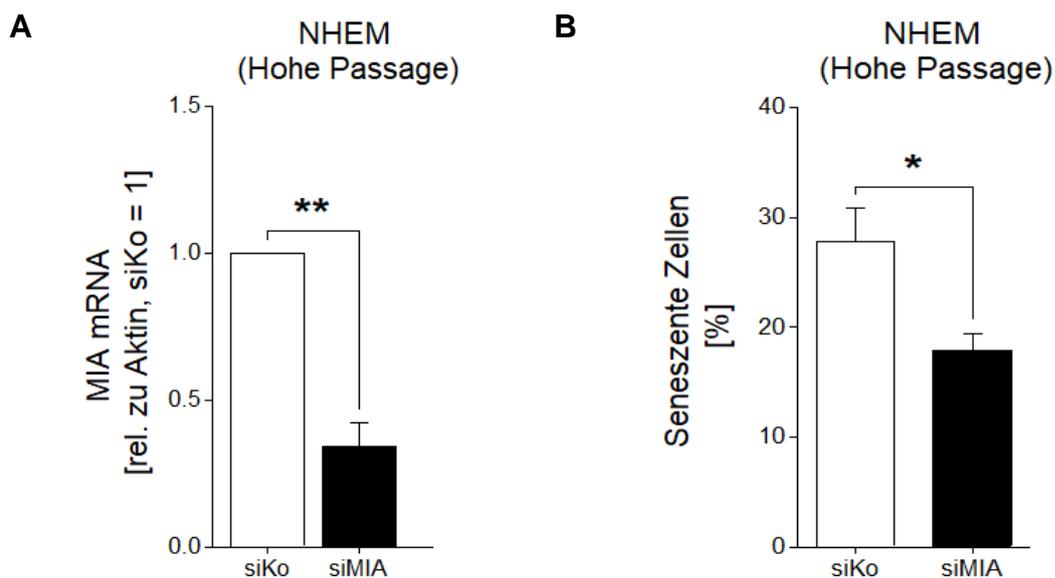


Abbildung 8: Auswirkungen des MIA *Knockdowns* in NHEMs auf Seneszenz.

(A) NHEM in höherer Passage wurden mit einer MIA-spezifischen siRNA behandelt und die Reduktion der MIA-Expression durch qRT-PCR nachgewiesen. (B) Der Anteil seneszenten Zellen verringerte sich in siMIA behandelten NHEM signifikant zu Kontroll-siRNA behandelten NHEM. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

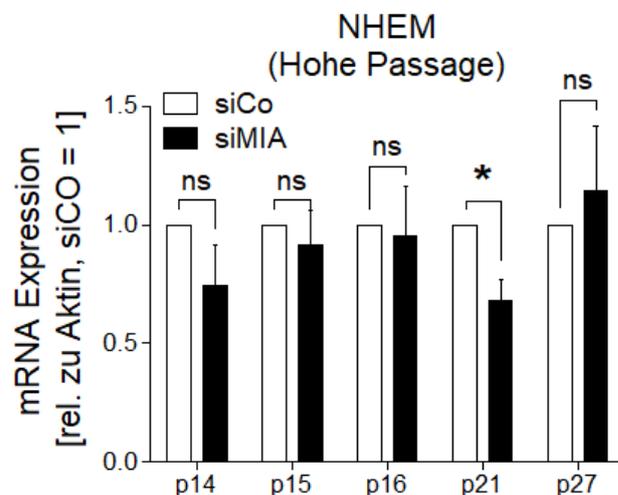


Abbildung 9: Auswirkungen des MIA *Knockdowns* in NHEMs auf Zellzyklusinhibitoren.

qRT-PCR-Analysen von klassischen Seneszenz-assoziierten Markermolekülen (p14, p15, p16, p21 und p27) zeigten eine signifikante Reduktion der p21 mRNA Expression in Melanozyten mit verringerter MIA-Expression. (*: $p < 0,05$, ns: nicht signifikant).

4. Zielsetzung

Die Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Bosserhoff untersuchte in den letzten Jahren unter anderem die Funktion des Proteins MIA (*melanoma inhibitory activity*) im malignen Melanom. Dabei wurde festgestellt, dass MIA nicht nur an der Entstehung und Metastasierung des malignen Melanoms beteiligt ist, sondern auch als diagnostischer Serummarker für die Melanomprogression verwendet werden kann, da hohe MIA-Serumlevel mit einer schlechten klinischen Prognose korrelieren.

Interessanterweise konnte eine MIA-Expression nicht nur in Gewebeproben des malignen Melanoms, sondern auch in benignen melanozytären Nävi detektiert werden. Die genaue Ursache für die MIA-Expression in Nävi ist nicht abschließend geklärt. Neben MIA wird unter anderem auch mutiertes B-Raf in 40 – 50 % der Nävi exprimiert. Aktivierte Onkogene wiederum können in Nävi Onkogen-induzierte Seneszenz auslösen und regulieren, wodurch die Entartung der Melanozyten gehemmt wird.

Ziel dieser Arbeit war es, die detaillierte Rolle von MIA in der melanozytären Seneszenz zu analysieren und mögliche beteiligte Signalwege aufzuzeigen. Dabei wurde die Funktion des MIA-Proteins sowohl in der replikativen Seneszenz als auch in der Onkogen-induzierten Seneszenz untersucht. Durch lentivirale Überexpression beziehungsweise *Knockdown* von MIA in Melanozyten wurde überprüft, inwiefern MIA an der Induktion respektive Aufrechterhaltung der zellulären Seneszenz beteiligt ist.

5. Ergebnisse

5.1. Rolle von MIA in der replikativen Seneszenz in Melanozyten

Die erhobenen Vordaten zeigten, dass MIA bei der Regulation von replikativer Seneszenz eine wichtige Rolle spielt. Ziel der folgenden Untersuchungen war es, die Funktion von MIA bei der Regulation der replikativen Seneszenz genauer zu definieren. Seneszenz kann durch eine erhöhte Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galactosidase nachgewiesen werden. Entsprechend konnten die Vordaten von Susanne Lamm (Dissertation Susanne Schiffner, 2012) bestätigt werden, dass in höheren Passagen (beispielhaft P10 dargestellt) von NHEM eine höhere prozentuale Anzahl an gefärbten, also seneszenten Zellen als in niedrigeren Passagen (beispielhaft P5 dargestellt) (**Abbildung 10**) gefunden werden konnte.

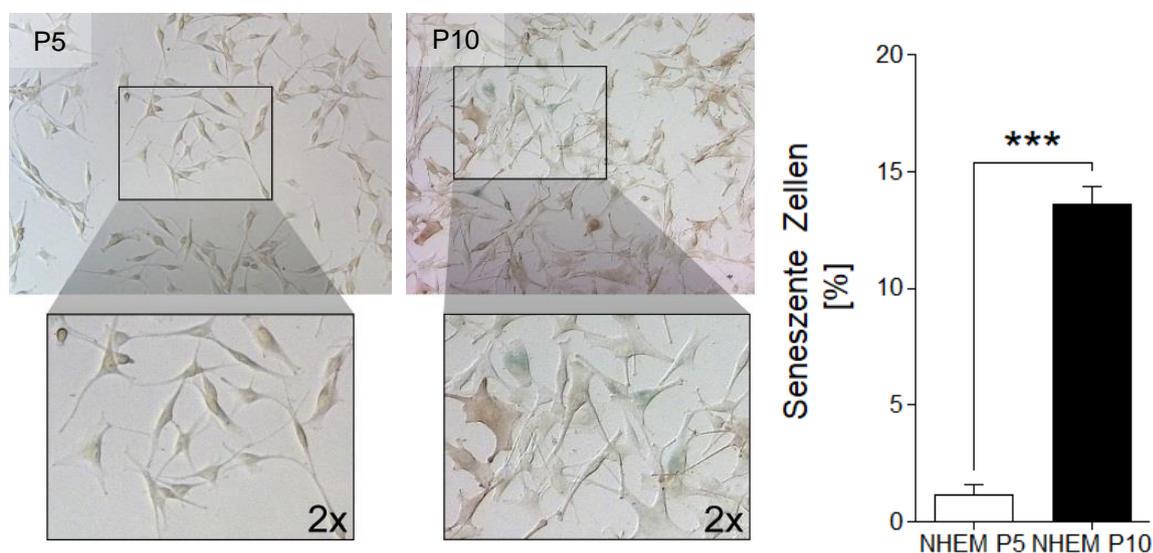


Abbildung 10: Erhöhte Anzahl seneszenten Zellen mit Anstieg der Passagenzahl in NHEMs.

β -Galactosidase Färbung von NHEM in Passage 5 und Passage 10. Der ermittelte prozentuale Anteil an seneszenten Zellen ist in den höheren Passagen deutlich erhöht. (***: $p < 0,001$).

Übereinstimmend mit den mRNA Vordaten lässt sich in höheren NHEM Passagen auch ein erhöhtes MIA Proteinlevel feststellen. Im gezeigten Western Blot ist MIA ab Passage 9 auf Proteinebene detektierbar (**Abbildung 11**).

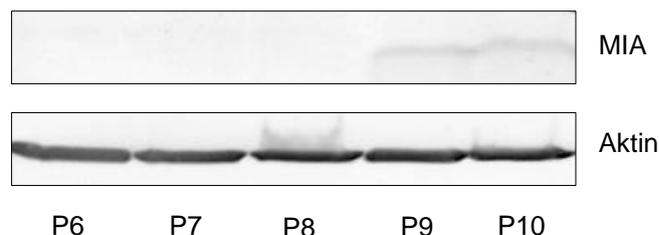


Abbildung 11: Anstieg von MIA mit Anstieg der Passagenzahl in NHEM.

Per Western Blot wurden Proteinlysaten von NHEM in verschiedener Passagenzahl auf deren MIA-Expression analysiert. Ab Passage 9 kann MIA in NHEM nachgewiesen werden. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Um die Rolle von MIA bei der Entstehung von Seneszenz genauer zu charakterisieren, wurden auch für diese Arbeit nochmals MIA-spezifische siRNAs in NHEMs in später Passage verwendet. Im Zuge der vorliegenden Dissertationsschrift konnte die Reduktion der p21-Expression nach MIA *Knockdown* auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (**Abbildung 12**).

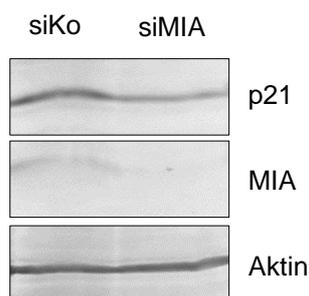


Abbildung 12: p21-Expression nach *Knockdown* von MIA in NHEM (hohe Passage).

Western Blot-Analysen zeigen, dass der siRNA vermittelte *Knockdown* von MIA in NHEM (hohe Passage) zu einer Reduktion des p21 Proteinlevels im Vergleich zu mit siKo behandelten NHEM führt. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin nachgewiesen.

5.2. Induktion der MIA-Expression in der Onkogen-induzierten Seneszenz

Durch die zuvor erhobenen Daten war bereits bekannt, dass es eine Korrelation zwischen replikativer Seneszenz und der MIA-Expression in NHEM gibt. Da es sich bei MIA um ein tumor-assoziiertes Protein handelt, sollte nun die Überprüfung eines Zusammenhangs zwischen Onkogen-induzierter Seneszenz (OIS) und der MIA-Expression erfolgen. OIS kann

in NHEM unter anderem durch lentivirale Transduktion von mutiertem *B-Raf*^{V600E} induziert werden (NHEM B-RAF^{V600E}). Die Durchführung der lentiviralen Transduktion erfolgte nach einem abgeänderten Protokoll der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stephan Hahn (Abteilung für molekulare Gastroenterologie, Ruhr-Universität Bochum) (siehe „8.4.5. Transduktion von humanen Melanozyten“).

Für die Etablierung dieser Methode wurde anhand der GFP-Expression zunächst überprüft, wann die höchste Effizienz der Transduktion erreicht ist. NHEM wurden mit den Vektoren pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP (copGFP) und pCDH-CMV-BRAF-EF1-copGFP (B-RAF^{V600E}) transduziert und anschließend der Transduktionsverlauf an den Tagen 4, 5, 6 und 7 am Fluoreszenzmikroskop kontrolliert und dokumentiert (siehe Abschnitt „8.3.6 Immunfluoreszenz“).

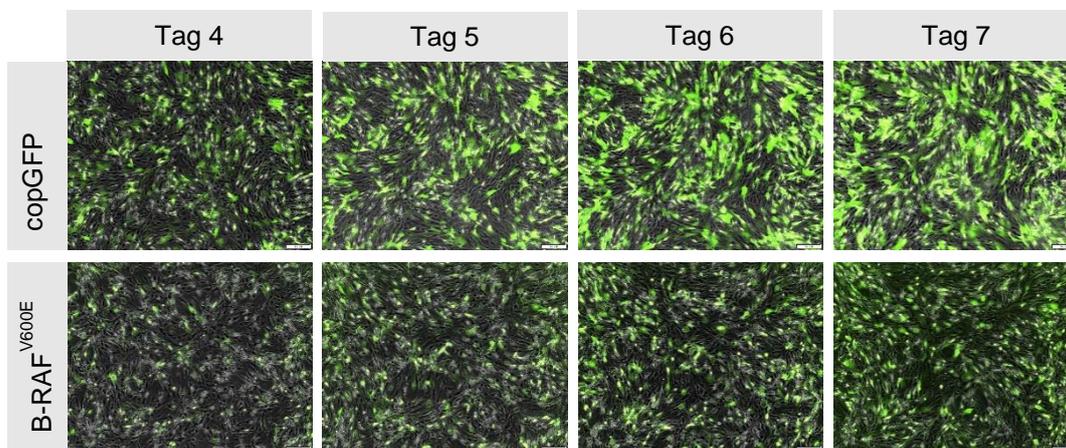


Abbildung 13: Kontrolle der Transduktionseffizienz anhand der Stärke des copGFP-Signals.

4, 5, 6 und 7 Tage nach Transduktion von NHEM mit copGFP und B-RAF^{V600E} Lentiviren wurde anhand von Immunfluoreszenzaufnahmen der Transduktionsverlauf überprüft. Das GFP-Signal steigt im Verlauf dieser 4 Tage stark an.

Die Immunfluoreszenzaufnahmen in **Abbildung 13** zeigen sowohl in copGFP- als auch in B-Raf^{V600E}-transduzierten NHEM ein ansteigendes GFP-Signal innerhalb dieser 4 Tage. Aufgrund des starken GFP-Signals an Tag 7 wurde entschieden, die auf die Transduktion folgenden Versuche β -Galactosidase-Färbungen, RNA-Isolierungen, Western Blot, RTCA und Immunfluoreszenzaufnahmen an diesem Tag durchzuführen. Die lentivirale Transduktion von NHEM mit B-RAF^{V600E} wurde auf mRNA- und Proteinebene überprüft. Auf Proteinebene verwendeten wir einen Antikörper, der spezifisch die V600E-Mutation von B-RAF detektierte. CopGFP diente als Kontrolle (**Abbildung 14**).

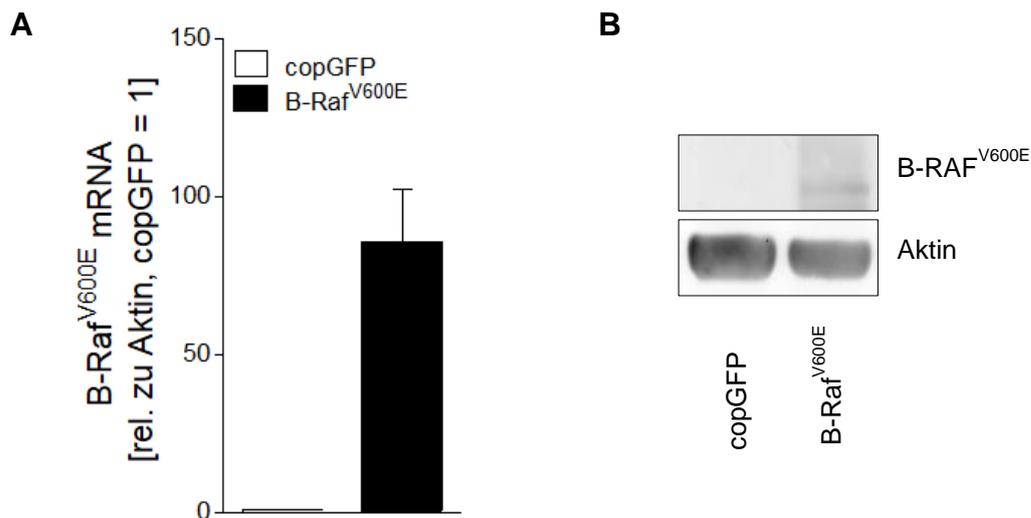


Abbildung 14: Überprüfung der Transgen-Expression in NHEM nach lentiviraler Transduktion auf mRNA- und Protein-Ebene.

(A) Durch die Transduktion mit dem lentiviralen MIA-Vektor wurde die Expression der *B-Raf^{V600E}* erhöht. Der Nachweis erfolgte mittels qRT-PCR. Auch auf Proteinebene ist *B-Raf^{V600E}* nach der Transduktion nachweisbar (B). Als Ladekontrolle wurde β -Aktin nachgewiesen.

Durch die stabile Überexpression von *B-Raf^{V600E}* konnte in den NHEM OIS ausgelöst werden, die durch eine positive β -Galactosidase Färbung nachgewiesen wurde (**Abbildung 15**).

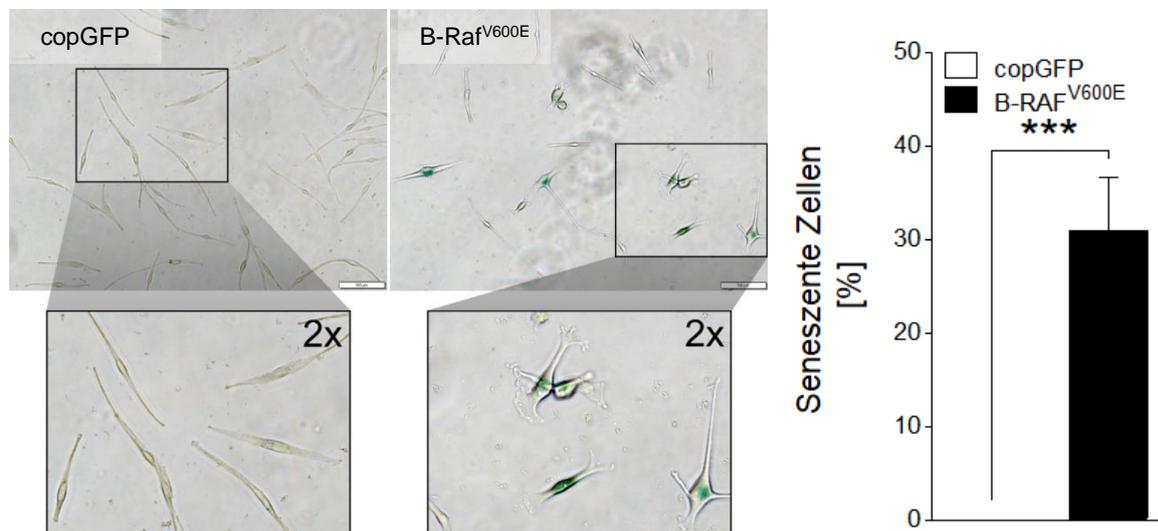


Abbildung 15: β -Gal-Färbung von B-Raf^{V600E}-transduzierten Zellen.

Durch die Transduktion von onkogenem *B-Raf^{V600E}* erhöht sich die Anzahl der seneszenten NHEM (30,9 %) signifikant im Vergleich zur Kontrolle (keine positiv gefärbten Zellen detektierbar). Der Seneszenz-Nachweis erfolgte durch eine positive β -Galactosidase-Färbung. (***: $p < 0,001$).

Im Anschluss an die erfolgreiche Etablierung dieses OIS-Modells wurde die MIA-Expression in den transduzierten NHEM überprüft. Dabei konnte durch qRT-PCR-Analysen eine erhöhte

MIA-Expression in NHEM B-RAF^{V600E} im Vergleich zur copGFP-transduzierten NHEM festgestellt werden (**Abbildung 16A**).

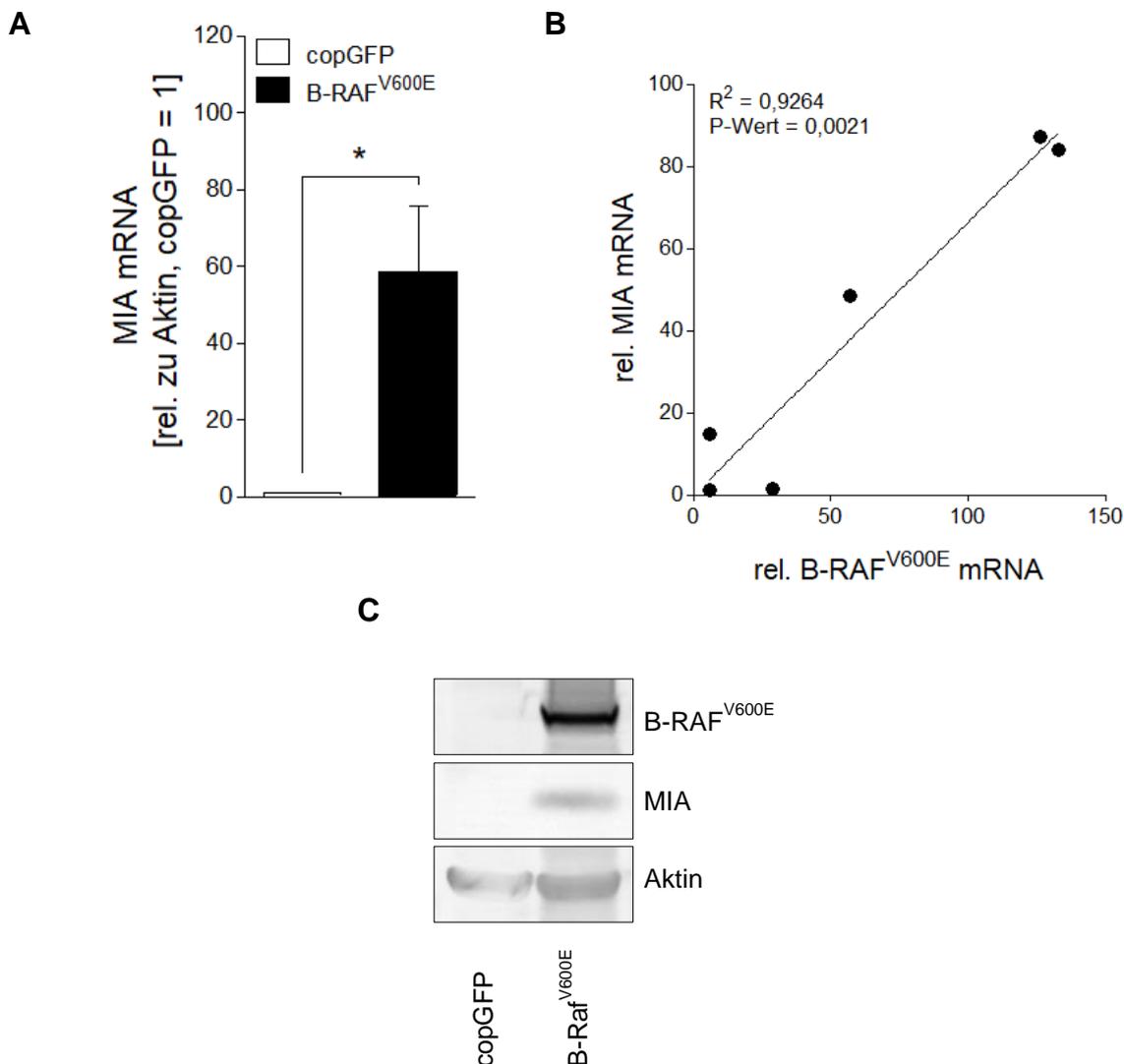


Abbildung 16: OIS induziert MIA-Expression auf mRNA und Protein Level.

(A) Die lentivirale Transduktion von B-Raf^{V600E} in NHEM erhöhte signifikant die MIA mRNA Expression, die mittels qRT-PCR nachgewiesen wurde. (B) Dabei korrelierte die Höhe der MIA-Expression signifikant mit der Stärke der B-Raf^{V600E}-Überexpression ($r = 0,92$). (C) Mittels Western Blot ließ sich MIA auch auf Proteinebene nach Überexpression von B-Raf^{V600E} nachweisen. β -Aktin diente dabei als Ladekontrolle. (*: $p < 0,05$).

Dieses Ergebnis wird durch eine signifikante Korrelation ($r=0,92$) der B-Raf^{V600E} und MIA mRNA Expression in NHEM B-Raf^{V600E} bestätigt (**Abbildung 16B**). Je stärker dabei die Expression von B-Raf^{V600E} ausfiel, umso höher war auch die gemessene MIA mRNA Expression. Die erhöhte MIA-Expression in OIS konnte auch auf Proteinlevel bestätigt werden (**Abbildung 16C**).

In silico Analysen von *gene set enrichments* (GSE46818) (Pawlikowski et al., 2013) bestätigten diese Ergebnisse, da auch hier die Überexpression von *B-Raf^{V600E}* in NHEM zu erhöhten MIA-Expressionswerten im Vergleich zur Kontrolle (Leervektor) führten (**Abbildung 17**).

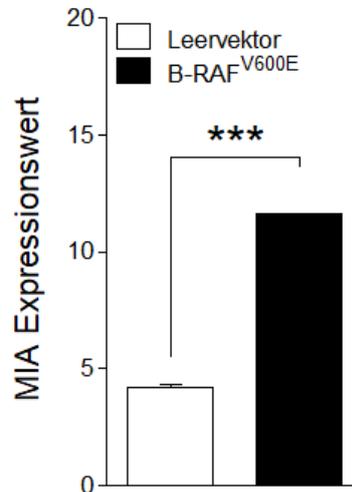


Abbildung 17: *In silico* Analysen des GSE 46818.

Die RNA-seq- und Expression-Daten der unifizierten und B-Raf^{V600E}-infizierten NHEM wurden von der Plattform *Gene Expression Omnibus* (GEO) heruntergeladen. Die Ergebnisse bestätigen eine signifikant erhöhte MIA-Expression in B-Raf^{V600E}-transduzierten NHEM. (***: $p < 0,001$).

Um die erhöhte MIA-Expression in einem weiteren Modell der OIS zu bestätigen, wurden Zellklone der Zelllinie Melan A verwendet, die verschiedene Level des onkogenen EGFR Orthologs *Xiphophorus melanoma receptor kinase* (Xmrk) ('HERmrk' oder 'Hm') exprimieren (**Abbildung 18**).

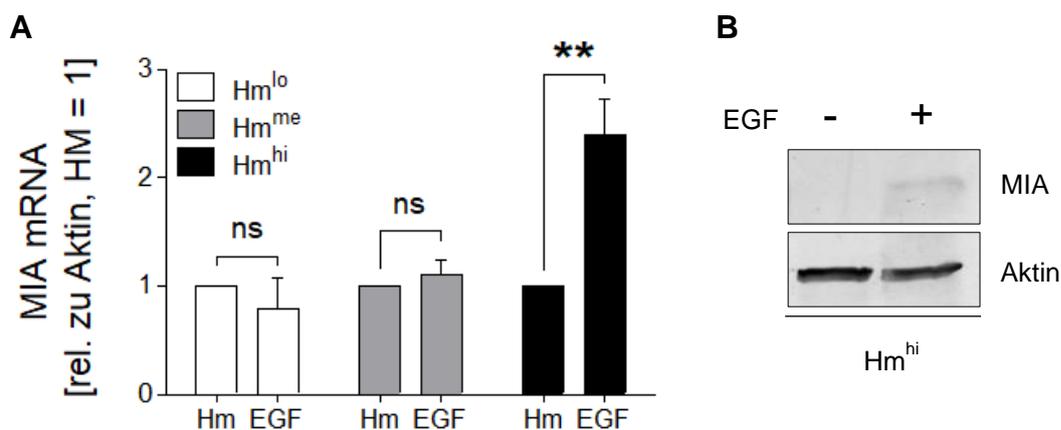


Abbildung 18: Quantifizierung der MIA-Expression im OIS-Modell Hm^{hi}.

Vergleich der MIA-Expression nach Zugabe von EGF in den verschiedenen Zellklonen. In den Varianten Hm^{lo} und Hm^{me} induzierte die EGF-Gabe keine MIA-Expression, wohingegen in Hm^{hi} Zellklone nach EGF-Zugabe eine erhöhte MIA-Expression auf mRNA (**A**) und Proteinebene (**B**) nachgewiesen werden konnte. β -Aktin wurde als Ladekontrolle mitgeführt. (**: $p < 0,01$, ns: nicht signifikant).

Durch Zugabe des Liganden EGF lässt sich in den Klonen, die hohe Level von Xmrk (Hm^{hi}) exprimieren, ein seneszenten Phänotyp auslösen. Dieser seneszenten Phänotyp lässt sich in Zellklonen, die eine geringe oder mittlere Expressionstärke (Hm^{lo} und Hm^{me}) von Xmrk aufweisen, nicht induzieren. (Leikam et al., 2008). Auch in diesem OIS-Model konnte eine erhöhte MIA-Expression auf mRNA- und Proteinebene im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Die verwendeten RNAs und Proteinlysate wurden uns großzügiger Weise von Dr. Svenja Meierjohann (Lehrstuhl für physiologische Chemie, Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

5.3. Rolle von MIA bei der Induktion von Seneszenz in Melanozyten

Die bisherigen Ergebnisse zeigten klar einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Seneszenz und einer erhöhten MIA-Expression, was die Frage aufwarf, ob durch eine Überexpression von MIA in NHEM ein seneszenten Phänotyp induziert werden kann.

Mittels lentiviraler Transduktion wurde der MIA-Vektor pCLV-CMV-MIA-IRES-YFP-EF1a-Neo in NHEM eingebracht und im Anschluss die Überexpression durch qRT-PCR und Western Blot ermittelt (**Abbildung 19**).

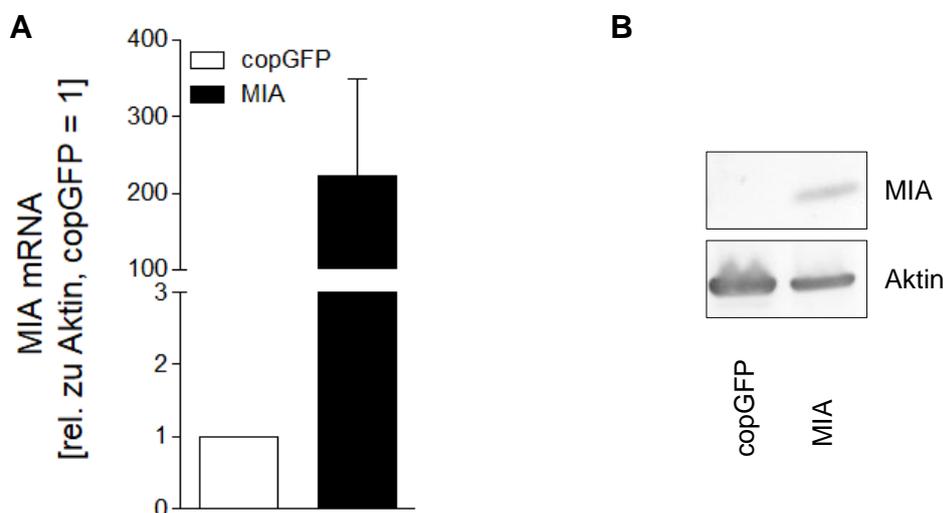


Abbildung 19: Nachweis der MIA-Überexpression in NHEM nach lentiviraler Transduktion.

Die Überexpression von MIA nach lentiviraler Transduktion des Vektors pCLV-CMV-MIA-IRES-YFP-EF1a-Neo konnte sowohl auf mRNA-Ebene per qRT-PCR (**A**) als auch auf Proteinebene mittels Western Blot (**B**) nachgewiesen werden. β -Aktin wurde als Ladekontrolle.

Die MIA-transduzierten NHEM wurden anschließend mit Hilfe der β -Galactosidase-Färbung auf das Auftreten von seneszenten Zellen untersucht. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied zu copGFP-transduzierten Zellen festgestellt werden (**Abbildung 20**).

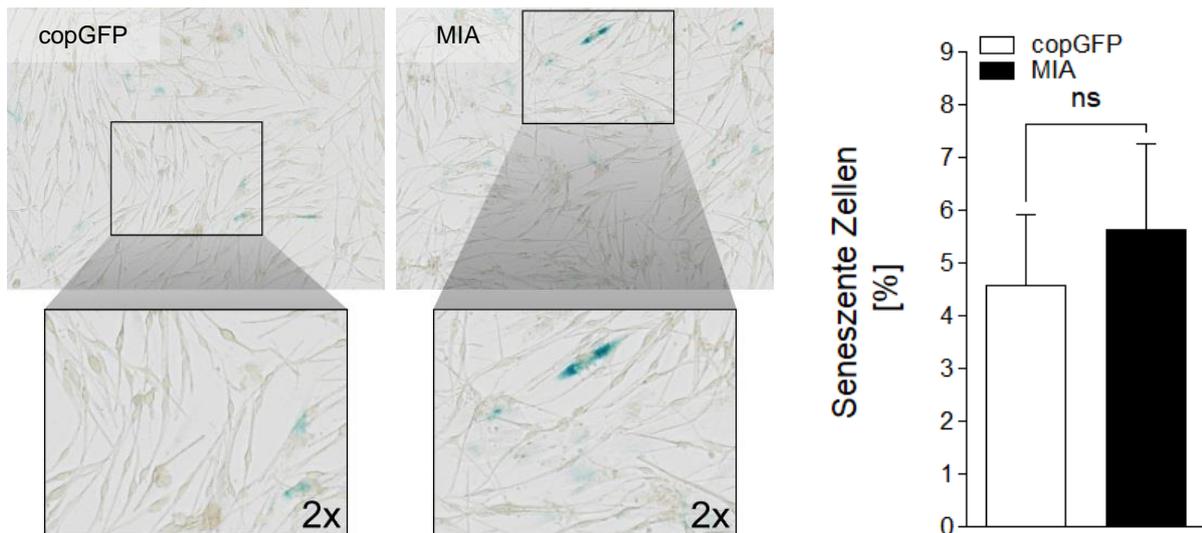


Abbildung 20: β -Gal-Färbung von MIA-transduzierten NHEM.

Nach der Transduktion von NHEM mit dem lentiviralen MIA-Vektor und dem Kontroll-Vektor copGFP ließ sich bei der β -Galactosidase-Färbung kein signifikanter Unterschied in der Anzahl seneszenter Zellen detektieren. (ns: nicht signifikant).

Neben einer positiven β -Galactosidase-Färbung ist ein vermindertes Proliferationsverhalten ein weiterer Hinweis auf einen seneszenten Phänotyp. Daher wurde mittels eines *Real Time Cell Analyzers* (RTCA) die Zellproliferation von copGFP- und MIA-transduzierten Zellen bestimmt (**Abbildung 21**).

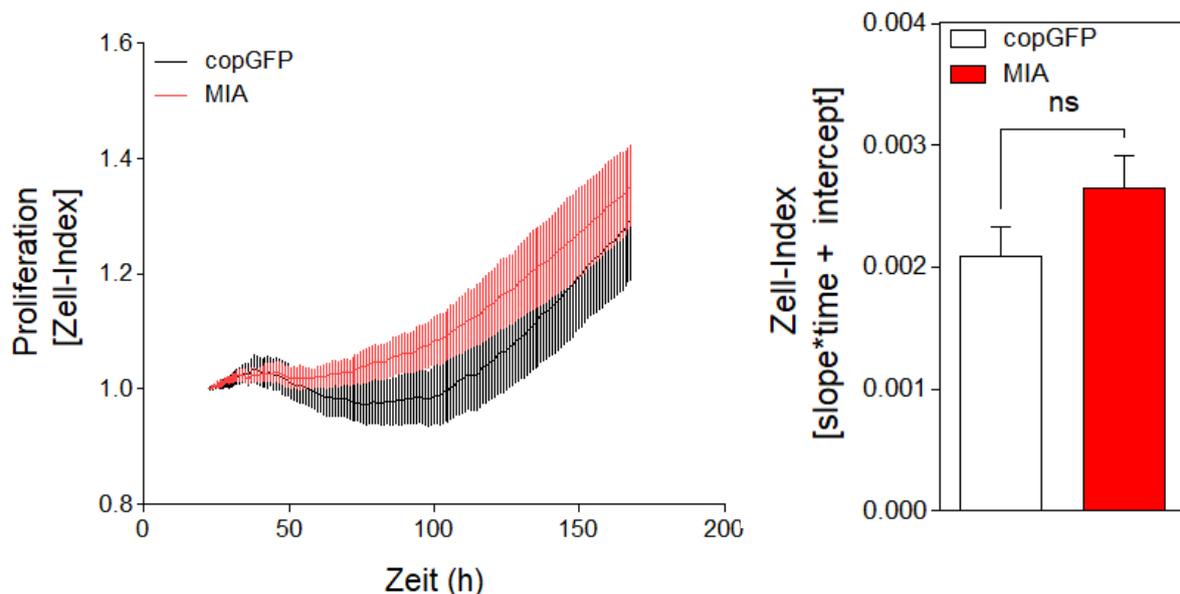


Abbildung 21: Einfluss der MIA-Überexpression auf das Proliferationsverhalten von NHEM.

Die Zellproliferation von copGFP- und MIA-transduzierten Zellen wurde mittels xCELLigence/RTCA erfasst und erfolgte nach dem Zell-Attachment ab 20 Stunden für einen Zeitraum von 160 Stunden. (ns: nicht signifikant).

Die Messung der Proliferation erfolgte in allen Versuchen (n=3) nach dem *Zell-Attachment* ab 20 Stunden und wurde für einen Zeitraum von 160 Stunden ermittelt. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied im Proliferationsverhalten zwischen Kontrolle und MIA überexprimierenden NHEM festgestellt werden. Weitere Biomarker für Seneszenz stellen die Expressionslevel der sogenannten Zellzyklusinhibitoren p14, p15, p16, p21 und p27 dar. Die Expression der *cyclin dependent kinase* Inhibitoren (CDK-Inhibitoren) wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Die lentivirale Überexpression von MIA führte dabei zu keiner signifikant verstärkten Expression der untersuchten CDK-Inhibitoren (**Abbildung 22**).

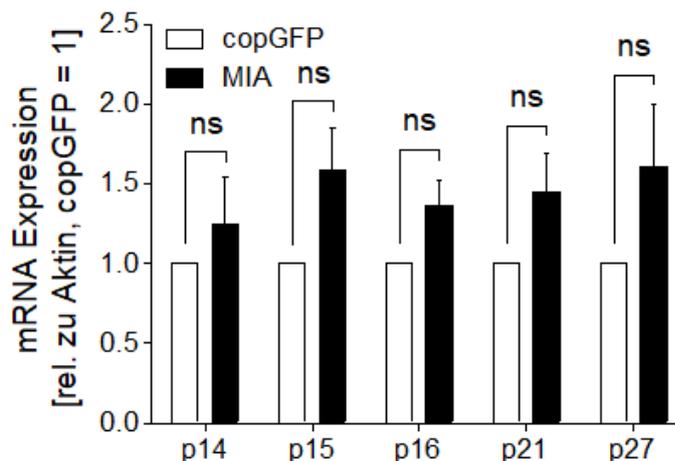


Abbildung 22: Auswirkung der MIA-Überexpression auf die Zellzyklusinhibitoren.

Nach lentiviraler Überexpression von MIA in NHEM wurde die mRNA Expression der Zellzyklusinhibitoren p14, p15, p16, p21 und p27 mittels qRT-PCR untersucht. (ns: nicht signifikant).

Da es sich bei MIA um ein sekretiertes Molekül handelt, das mit Komponenten der extrazellulären Matrix interagiert, wurde des Weiteren untersucht, wie sich die Zugabe von rekombinanten MIA auf die Induktion von Seneszenz auswirkt. Dabei wurden verschiedene Konzentrationen (50, 100, 200 ng/ml) an rekombinantes MIA auf die Melanozyten gegeben. Die Zugabe von rekombinantes MIA wurde bei Mediumwechsel wiederholt. Nach 7 Tagen wurde durch eine β -Galactosidase-Färbung die Anzahl der seneszenten Zellen bestimmt. Dabei konnte bei einer Zugabe von 100 ng/ml rMIA kein Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen festgestellt werden (**Abbildung 23**). Auch die Behandlung von Melanozyten mit 50 oder 200 ng/ml rMIA führte zu keinem Unterschied in der prozentualen Anzahl der β -Gal-positiven Zellen (Daten nicht gezeigt).

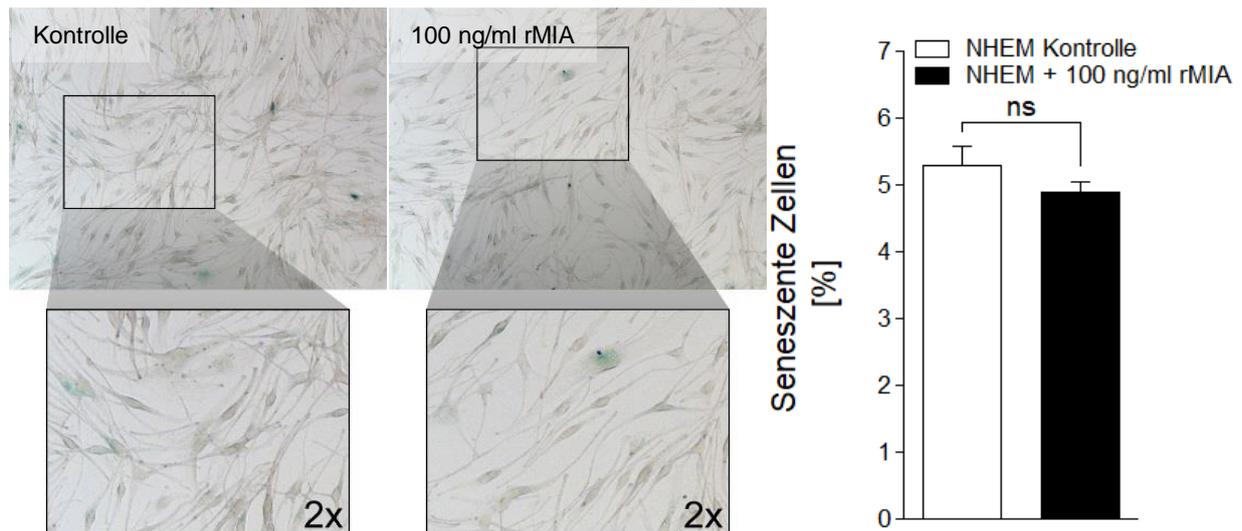


Abbildung 23: β -Gal Färbung von rMIA-behandelten NHEM.

Beispielhafte Abbildung einer β -Galactosidase-Färbung nach Behandlung von NHEM mit 100 ng/ml rMIA. Dabei konnte kein signifikanter Unterschied im prozentualen Anteil der positiv gefärbten Zellen zwischen Kontrolle und MIA-Behandlung festgestellt werden. (ns: nicht signifikant).

Wie bereits bei der Überexpression von MIA wurden auch bei der Behandlung von NHEM mit rMIA die CDK-Inhibitoren p14, p15, p16, p21 und p27 untersucht. Die Expression der Zellzyklusinhibitoren wurde 7 Tage nach Zugabe von 50, 100 und 200 ng/ml rMIA im Vergleich zur Kontrolle mittels qRT-PCR ermittelt. Wie **Abbildung 24** zeigt, konnte bei einer Behandlung mit 100 ng/ml rMIA keine signifikante Induktion der Expression festgestellt werden.

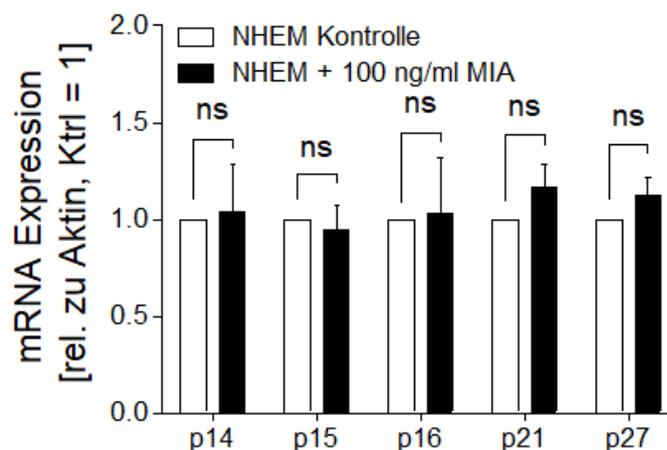


Abbildung 24: Auswirkungen der Behandlung von NHEM mit rekombinatem MIA auf Zellzyklusinhibitoren.

NHEM wurden mit 100 ng/ml rMIA behandelt und nach 7 Tagen die mRNA Expression der CDK-Inhibitoren p14, p15, p16, p21 und p27 mittels qRT-PCR analysiert. Dabei konnte kein Unterschied in der Expressionsstärke im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. (ns: nicht signifikant).

Die Zugabe von 50 oder 200 ng/ml rMIA erhöhte die Expression der Zellzyklusinhibitoren ebenfalls nicht signifikant (Daten nicht gezeigt).

5.4. Einfluss des MIA *Knockdowns* auf Onkogen-induzierte Seneszenz

Die bisherigen Daten zeigen, dass MIA offensichtlich nicht direkt Seneszenz induzieren kann. Da aber zuvor ein eindeutiger Zusammenhang zwischen MIA und Seneszenz festgestellt werden konnte und die erhobenen Vordaten belegen, dass ein MIA *Knockdown* einen Einfluss auf replikative Seneszenz hat, sollte nun die Rolle von MIA im Prozess der OIS genauer untersucht werden. Dafür wurden NHEM mit B-Raf^{V600E} transduziert, um die MIA-Expression zu induzieren und einen Tag später für 6 Stunden mit einem siPool gegen MIA (NHEM B-Raf^{V600E} siMIA) beziehungsweise mit einem Kontroll-siPool (siKo) behandelt. Die reduzierte MIA-Expression konnte sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene bestätigt werden (**Abbildung 25**).

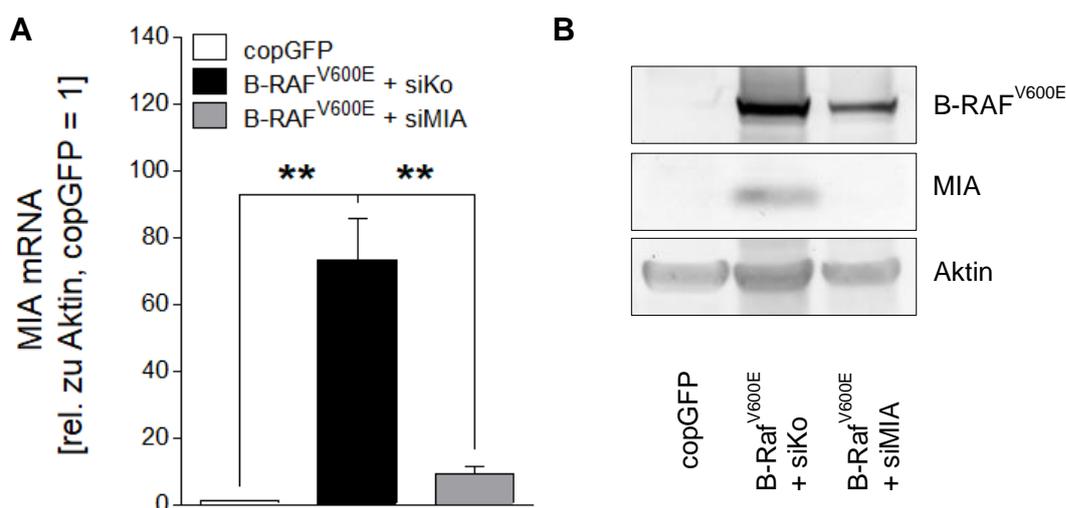


Abbildung 25: Knockdown von MIA mittels siPool in NHEM B-Raf^{V600E}.

Die Überexpression von *B-Raf^{V600E}* und die darauf folgende Induktion der MIA-Expression sowie der *Knockdown* von MIA in NHEM durch siMIA wurden mittels qRT-PCR auf mRNA-Ebene (**A**) und mittels Western Blot auf Proteinebene (**B**) detektiert. β -Aktin diente dabei als Ladegesteuer. (**: $p < 0,01$).

Anschließend wurde mit NHEM copGFP, NHEM B-Raf^{V600E} + siKo und NHEM B-Raf^{V600E} + siMIA eine β -Galactosidase-Färbung durchgeführt. Dabei führte die Überexpression von mutiertem *B-Raf* in Melanozyten zu einer signifikant erhöhten Anzahl seneszenten Zellen (27,9 %) (**Abbildung 26**) im Vergleich zur Kontrolle copGFP (2,1 %). Interessanterweise wurde die Anzahl der seneszenten NHEM nach B-Raf^{V600E}-Transduktion durch die Behandlung mit siMIA signifikant reduziert (12,1 %).

Da es sich bei Seneszenz per Definition um einen Zellarrest handelt, ist ein weiterer wichtiger Nachweis für Seneszenz das Fehlen von Proliferationsmarkern. In Zellzyklusanalysen konnte gezeigt werden, dass das Ki-67 Antigen im Nukleus von Zellen nachgewiesen werden kann, die sich in der G₁-, S-, G₂- und M-Phase des Zellzyklus aufhalten, jedoch nicht in Zellen, die sich in der G₀ Phase befinden (Gerdes et al., 1984; Scholzen and Gerdes, 2000). Das Wachstumsverhalten von NHEM copGFP, NHEM B-Raf^{V600E} + siKo und NHEM B-Raf^{V600E} + siMIA sollte durch die Immunfluoreszenz-Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki-67 untersucht werden.

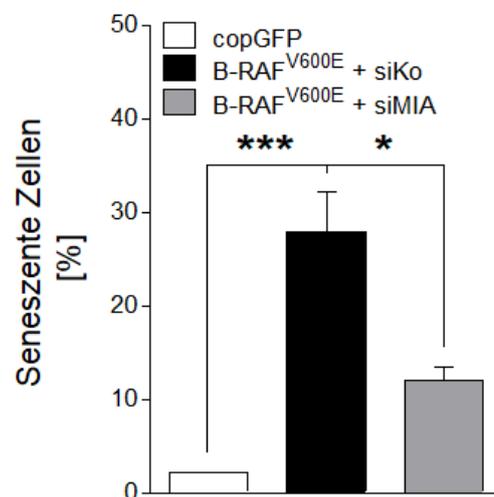
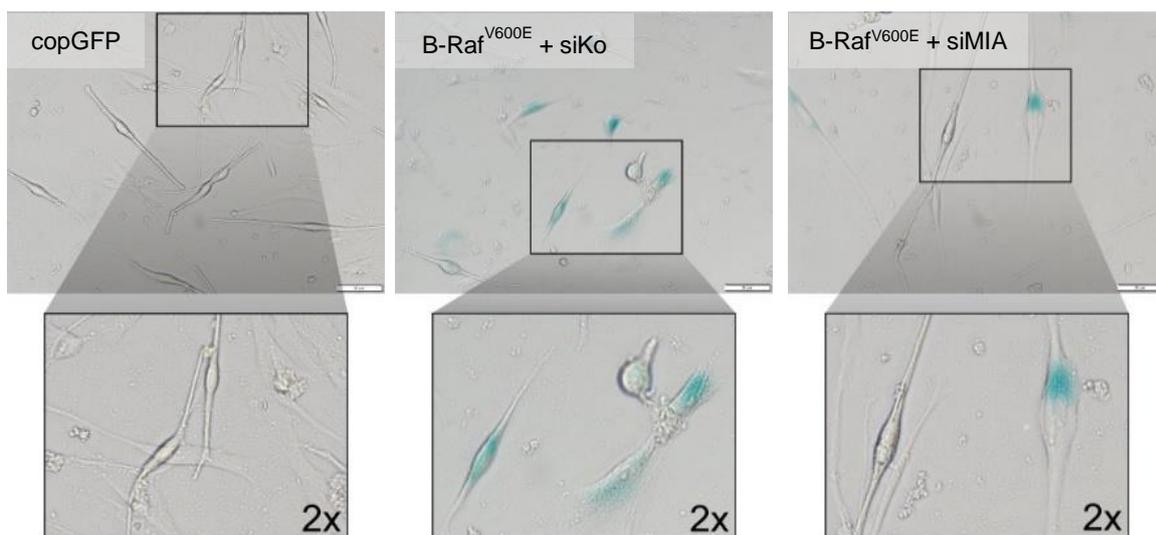


Abbildung 26: Bestimmung der Anzahl seneszenten Zellen in NHEM copGFP, NHEM B-Raf^{V600E} + siKo und NHEM B-Raf^{V600E} + siMIA.

In NHEM B-Raf^{V600E} + siKo ließ sich mittels positiver β -Gal-Färbung eine erhöhte Anzahl seneszenten Zellen im Vergleich zur Kontrolle NHEM copGFP nachweisen. Durch eine Behandlung von NHEM B-Raf^{V600E} mit siMIA ließen sich signifikant weniger β -Gal-positive Zellen nachweisen. (*: $p < 0,05$, ***: $p < 0,001$).

Durch die Ki-67 Färbung konnte nachgewiesen werden, dass 41 % der copGFP-transduzierten Melanozyten proliferieren (**Abbildung 27**). Durch die Überexpression von *B-Raf^{fV600E}* in den NHEM wurde der prozentuale Anteil der Ki-67 positiven Zellen stark reduziert (3,4 %). Durch einen MIA *Knockdown* in den *B-Raf^{fV600E}*-transduzierten Melanozyten konnte wieder eine erhöhte Anzahl an Zellen mit positiver Ki-67 Färbung detektiert werden (15,7 %).

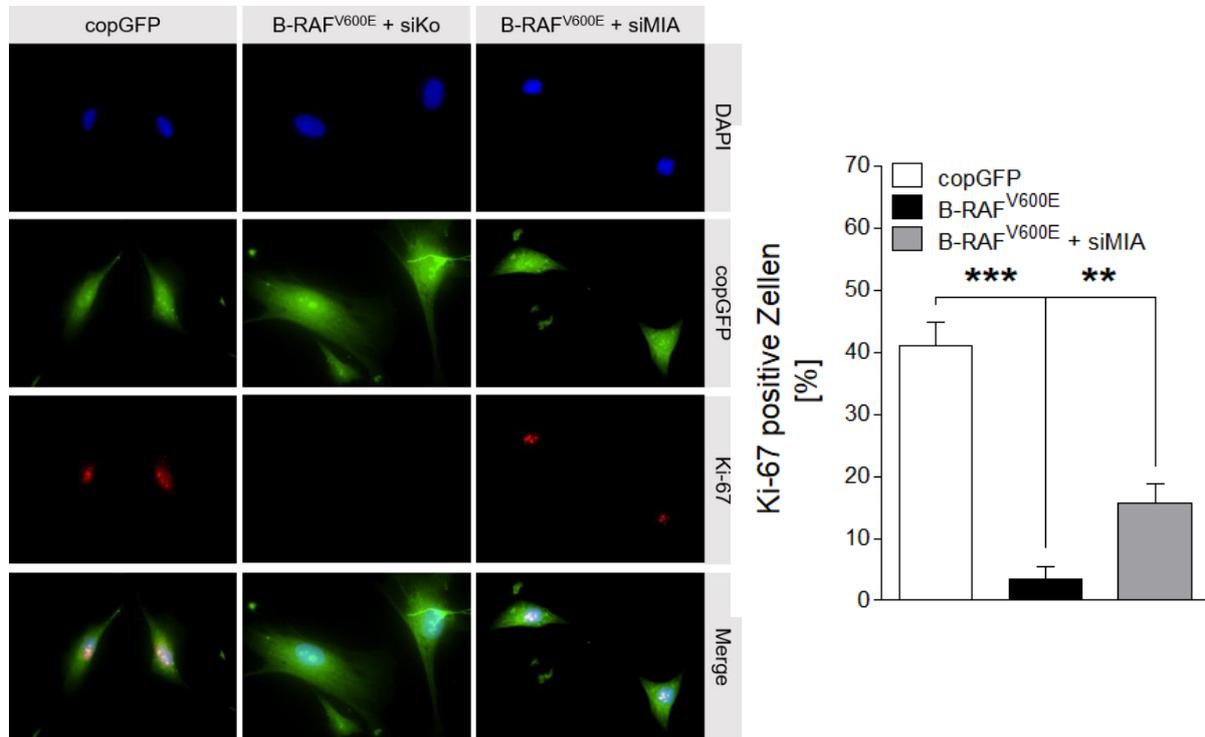


Abbildung 27: Immunfluoreszenz Färbungen von NHEM copGFP, NHEM B-Raf^{fV600E} + siKo und NHEM B-Raf^{fV600E} + siMIA mit dem Proliferationsmarker Ki-67.

Das GFP Signal (grün) zeigte eine positive Transduktion mit copGFP beziehungsweise B-Raf^{fV600E}. Die DAPI-Färbung (blau) diente zur Lokalisation des Kernes. Eine positive Ki-67 Färbung (rot) konnte in einem großen Anteil (41 %) der copGFP-transduzierten NHEM festgestellt werden, wohingegen kaum Ki-67positive NHEM B-Raf^{fV600E} + siKo (3,4 %) detektierbar waren. Durch die Behandlung von NHEM B-Raf^{fV600E} mit einem siPool gegen MIA erhöhte sich dagegen die Anzahl der Ki-67 positiven Zellen (15,7 %) im Vergleich zu NHEM B-Raf^{fV600E} + siKo. (**: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$).

Mittels qRT-PCR wurden die Auswirkungen des MIA *Knockdowns* in B-Raf^{fV600E}-transduzierten NHEM auf die Zellzyklusinhibitoren p14, p15, p16, p21 und p27 ermittelt. Dabei konnte in NHEM B-Raf^{fV600E} ein leichter Anstieg der Expression von p14, p16, p21 und p27 festgestellt werden. Die Expression von p15 stieg, im Vergleich zur copGFP-Kontrolle, stark an (**Abbildung 28A**). Der *Knockdown* von MIA hatte keinen Einfluss auf die Expressionstärke der Zellzyklusinhibitoren. Da bei Untersuchungen der replikativen Seneszenz in Melanozyten gezeigt werden konnte, dass MIA einen Einfluss speziell auf die Regulation von p21 hat, wurde mittels Western Blot das Proteinlevel von p21 bestimmt. Dabei konnte überraschenderweise

kein Unterschied zwischen den Proben B-Raf^{V600E} + siKo und B-Raf^{V600E} + siMIA festgestellt werden (**Abbildung 28B**).

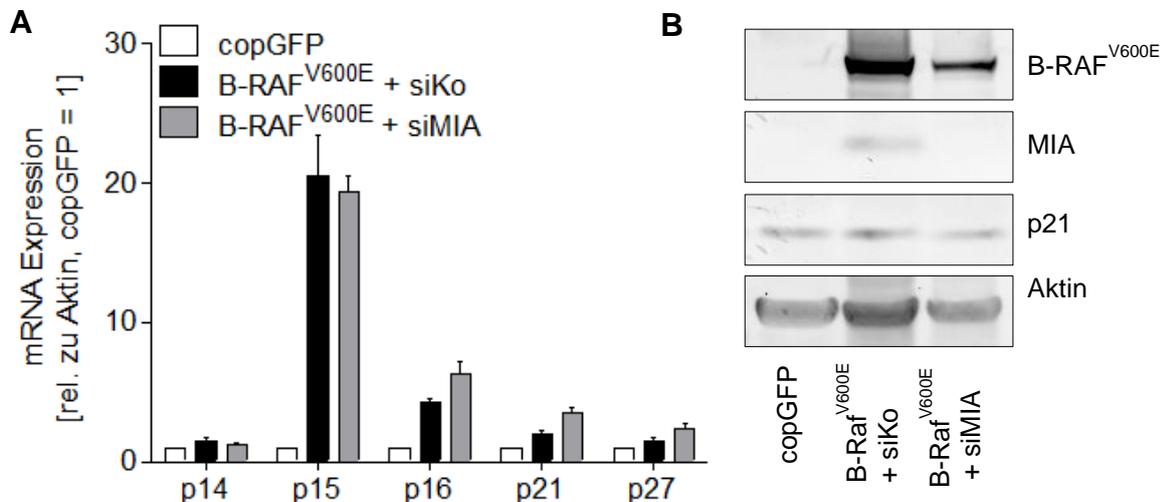


Abbildung 28: Expression von Zellzyklusinhibitoren nach B-Raf^{V600E}-Überexpression und folgendem MIA Knockdown.

(A) Die mRNA Expression der Zellzyklusinhibitoren p14, p15, p16, p21 und p27 in NHEM wurde mittels qRT-PCR gemessen. Die Analyse erfolgte dabei nach lentiviraler Überexpression von B-Raf^{V600E} sowie zusätzlichem Knockdown von MIA mittels siPool. (B) Auch auf Proteinebene ließ sich für p21 kein Unterschied zwischen der copGFP-Kontrolle, B-Raf^{V600E} + siKo und B-Raf^{V600E} + siMIA feststellen. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin mitgeführt.

5.5. Untersuchungen der Seneszenz-assoziierten Funktion von MIA *in vivo*

Die bis dahin erhobenen *in vitro* Daten zeigten auf, dass MIA eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung von Onkogen-induzierter Seneszenz spielt. Für die genauere Charakterisierung der *in vivo* Funktion von MIA wurden MIA-Knockout-Mäuse mit dem Melanommausmodell Tg(*Grm1*) verpaart. Wie bereits in den Vordaten beschrieben, kommt es bei den Tg(*Grm1*)/MIA^{-/-} Tieren zu einem deutlich früheren Tumor-Onset im Vergleich zu den Kontrolltieren Tg(*Grm1*). Der Knockout von MIA könnte dabei einen Einfluss auf den Schutzmechanismus Seneszenz haben, daher wurden Mausmelanozyten wie unter Abschnitt „8.4.2. Isolierung und Kultivierung von Melanozyten aus neugeborenen Mäusen“ beschrieben aus 3 Tage alten Tg(*Grm1*) und Tg(*Grm1*)/MIA^{-/-} Tieren isoliert, kultiviert und auf Seneszenzmarker untersucht. Leider war durch die starke Pigmentierung der Mausmelanozyten (**Abbildung 29**) eine β -Galactosidase-Färbung sowie

Seneszenzmarkernachweise mittels Immunfluoreszenz oder immunhistochemischer Färbung nicht möglich (Daten nicht gezeigt).

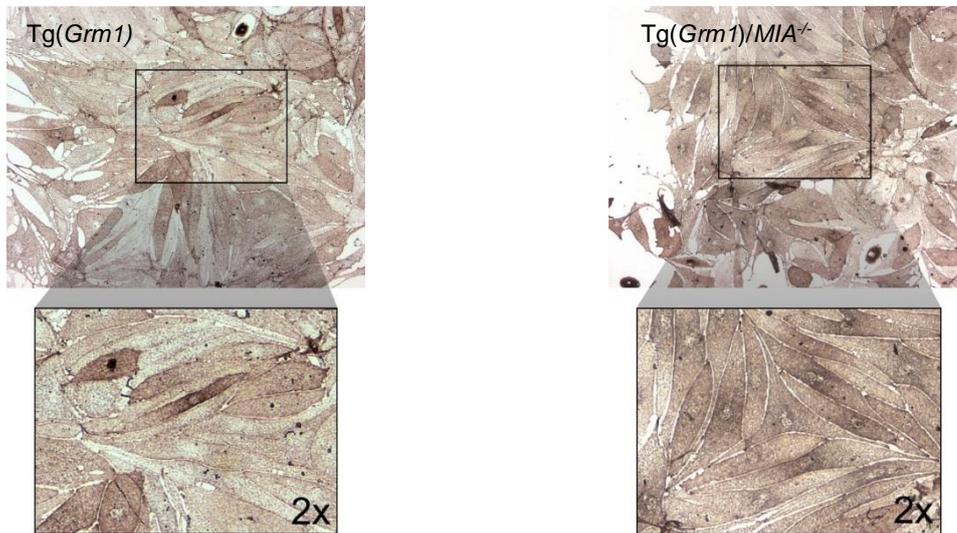


Abbildung 29: Isolierte Mausmelanozyten aus *Tg(Grm1)* und *Tg(Grm1)/MIA^{-/-}* Mäusen.

Die aus den Mauslinien *Tg(Grm1)* und *Tg(Grm1)/MIA^{-/-}* isolierten Melanozyten zeichnen sich durch eine starke Pigmentierung aus. Aus beiden Mauslinien wurde eine reine Melanozytenpopulation gezüchtet und für weitere Experimente verwendet.

Daher wurde das Proliferationsverhalten der Mausmelanozyten mittels RTCA über einen Zeitraum von 110 Stunden ermittelt.

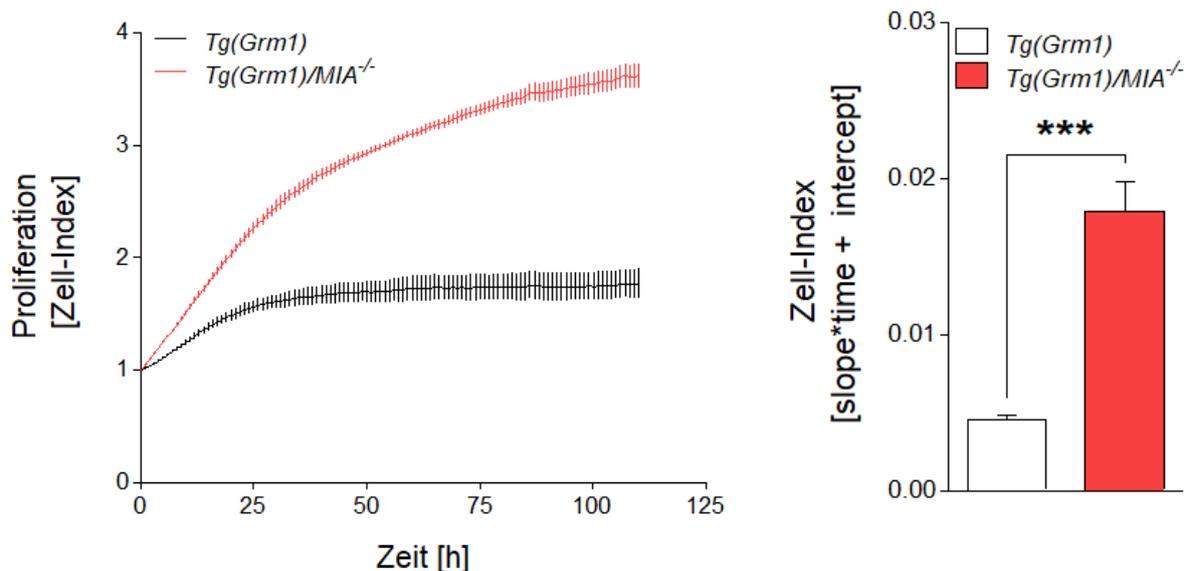


Abbildung 30: Proliferationsverhalten von isolierten Mausmelanozyten.

Das Proliferationsverhalten von Mausmelanozyten, die aus *Tg(Grm1)* und *Tg(Grm1)/MIA^{-/-}* Tieren isoliert wurden, wurde mittels xCELLigence/RTCA erfasst und erfolgte über einen Zeitraum von 110 Stunden. (***: $p < 0,001$).

Abbildung 30 zeigt, dass Melanozyten, die aus den Kontrollmäusen isoliert wurden, nach einer anfänglichen Wachstumsphase von etwa 30 Stunden in ihrer Proliferation stagnierten. Bei den Melanozyten aus *Tg(Grm1)/MIA^{-/-}* Mäusen konnte eine solche Stagnation nicht festgestellt werden. Die *MIA*-defizienten Melanozyten wiesen signifikant höhere Proliferationsraten auf, was die These unterstützt, dass *MIA* ein wichtiges Element in der Regulation von Seneszenz darstellt.

Weitere detaillierte Analysen wurden an Hautproben vorgenommen. Dabei wurden mRNA aus 2 mm² großen, pigmentierten Gewebeschnitten isoliert. Bei den verwendeten Mäusen (*Tg(Grm1)* und *Tg(Grm1) MIA^{-/-}*) handelte es sich um Tiere im Alter von maximal 63 Tagen, also deutlich vor ermitteltem Tumor-Onset (**Abbildung 31A**). Diese Mäuse wiesen keinerlei detektierbares Tumorstadium auf.

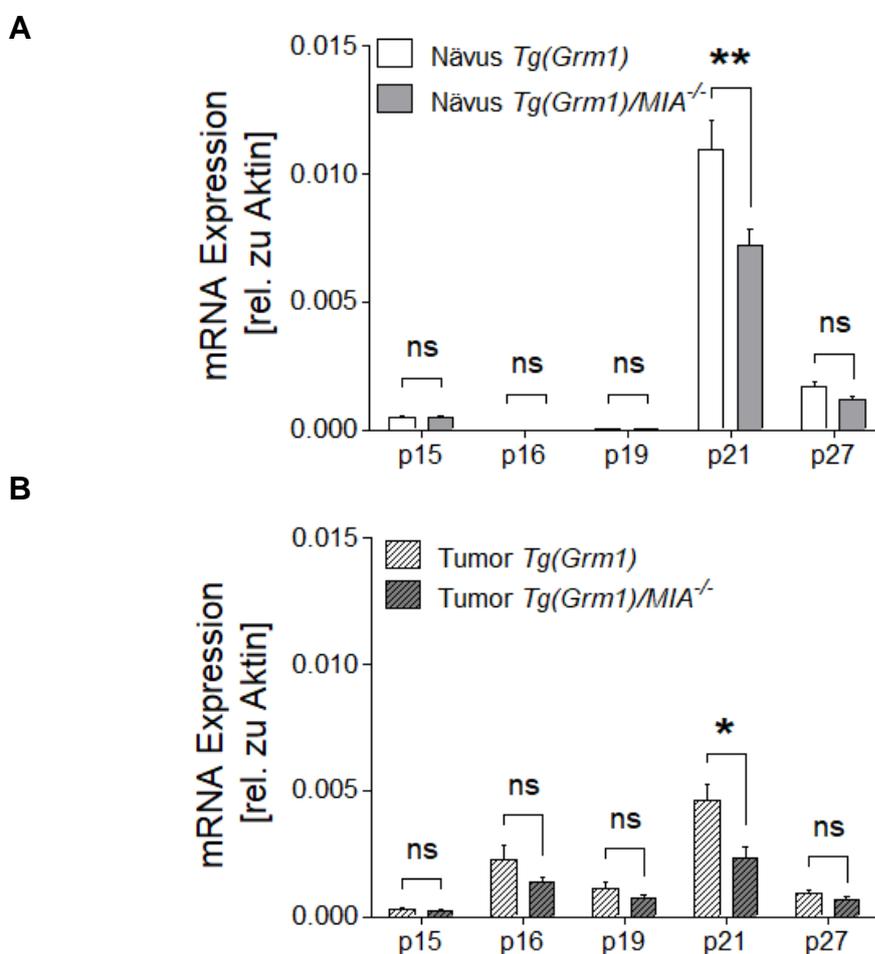


Abbildung 31: Expressionslevel verschiedener Zellzyklusinhibitoren aus Hautschnitten von *Tg(Grm1)* und *Tg(Grm1)/MIA^{-/-}* Mäusen.

Die mRNA Expression von p15, p16, p19, p21 und p27 in Hautschnitten von *Tg(Grm1)* und *Tg(Grm1)/MIA^{-/-}* Mäusen wurde mittels qRT-PCR vor Tumor-Onset (n=13) (**A**) und nach Tumor-Onset (n=10) (**B**) bestimmt. Dabei führt der *MIA* *Knockout* zu beiden Zeitpunkten zu einer signifikant reduzierten p21 mRNA Expression. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ns: nicht signifikant).

In einer zweiten Gruppe wurde mRNA aus Tumor-Gewebe von älteren Tieren (Alter: mindestens 183 Tage) nach Beginn des Melanomwachstums gewonnen (**Abbildung 31B**). Mittels qRT-PCR wurde die Expression der Zellzyklusinhibitoren p15, p16, p19 (das murine Homolog zum humanen p14), p21 und p27 bestimmt. Dabei zeigte sich in beiden Gruppen ein ähnliches Bild: der *Knockout* von MIA hatte keinen signifikanten Effekt auf die CDK-Inhibitoren p15, p16, p19 und p27, aber die mRNA Expression von p21 war in den Gewebeschnitten der MIA-defizienten Tiere sowohl vor als auch nach Tumor-*Onset* signifikant reduziert.

5.6. Auswirkungen des MIA *Knockdowns* im Melanom

MIA wurde zuvor bereits mehrfach als protumorigenes Protein beschrieben, dass an der Entstehung und Metastasierung von Melanomen beteiligt ist (Bosserhoff et al., 2003b; Schmidt et al., 2013; Stahlecker et al., 2000). Die in dieser Dissertation gezeigten Ergebnisse verdeutlichen aber auch eine Funktion von MIA im Seneszenzprozess in Melanozyten.

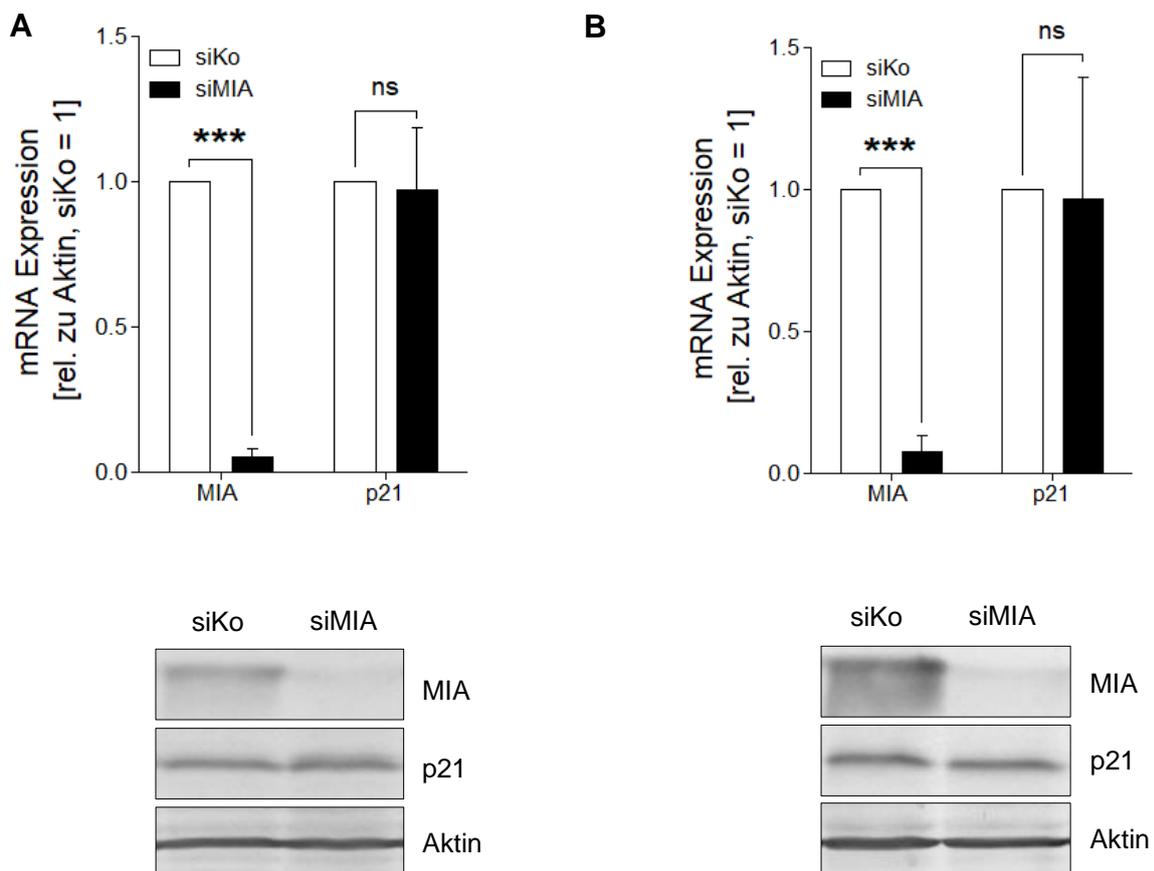


Abbildung 32: Überprüfung der p21-Expression nach MIA *Knockdown* in Melanomzelllinien.

In den Melanomzelllinien Mel Im (**A**) und WM35 (**B**) wurde die p21-Expression 4 Tage nach Zugabe des siPools gegen MIA auf mRNA- und Proteinebene ermittelt. Der signifikante *Knockdown* von MIA mittels siPool hatte keinen Einfluss auf die p21-Expression. (***: $p < 0,001$, ns: nicht signifikant).

Entsprechend wurde der *Knockdown* von MIA in Melanomzellen und dessen Einfluss auf die Expression des Zellzyklusinhibitors p21 untersucht. Der *Knockdown* in den Zelllinien Mel Im (Metastase) (**Abbildung 32A**) und WM35 (Primärtumor) (**Abbildung 32B**) erfolgte über Zugabe eines siPools gegen MIA. 4 Tage später wurde über qRT-PCR und Western Blot die p21-Expression überprüft. Dabei konnte in beiden Experimenten kein Unterschied in der p21-Expression zwischen siKontrolle und siMIA behandelten Zellen festgestellt werden. Dieses Ergebnis zeigte deutlich, dass die Funktion und Rolle von MIA in Melanozyten und im Melanom sehr unterschiedlich ist. Um die Mechanismen zu verstehen, die MIA im Melanom reguliert, wurde eine immortalisierte Melanozytenzelllinie (Mel-STV) verwendet, die nach lentiviraler Transduktion die Telomerase-Reverse-Transkriptase (TERT) stabil exprimiert, was auch die Situation in vielen Melanomzellen widerspiegelt. Die Mel-STV-Zellen wurden, wie die Melanozyten in den Experimenten zuvor, mit B-Raf^{V600E}-Lentiviren und der entsprechenden Kontrolle (copGFP) transduziert und nach 7 Tagen auf mRNA- und Proteinebene analysiert (**Abbildung 33**).

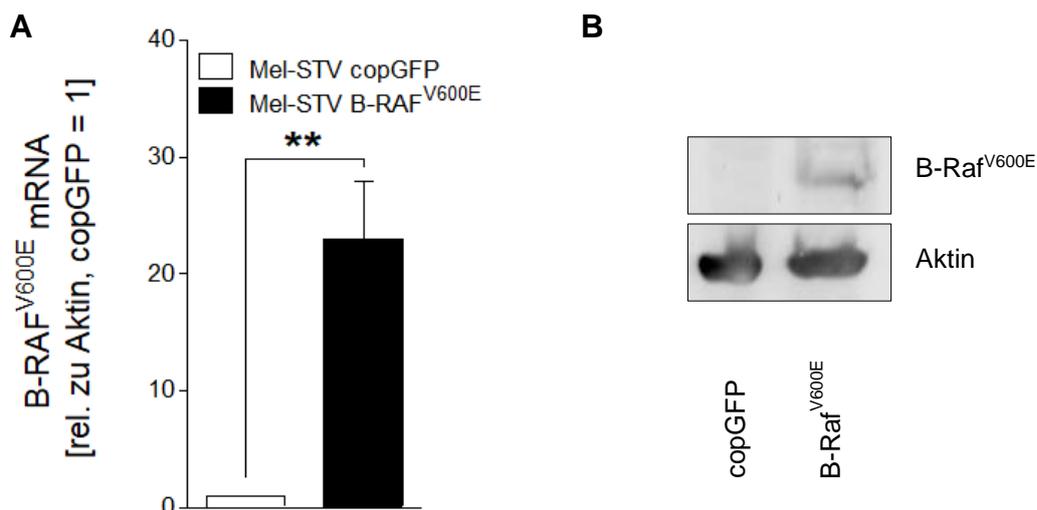


Abbildung 33: Nachweis der B-Raf^{V600E}-Überexpression in Mel-STV nach lentiviraler Transduktion.

Mel-STV wurden mit B-Raf^{V600E} und copGFP transduziert. Die B-Raf^{V600E}-Expression konnte auf sowohl auf mRNA-Ebene (**A**) als auch auf Proteinebene (**B**) nachgewiesen werden. Bei den Western Blot Analysen diente β -Aktin als Ladekontrolle. (**: $p < 0,01$).

Wir konnten zuvor bereits zeigen, dass sich in B-Raf^{V600E}-transduzierten NHEM die MIA-Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene signifikant erhöhte (vergleiche **Abbildung 16**). Interessanterweise konnte bei der Überprüfung der MIA-Expression in Mel-STV nach B-Raf^{V600E}-Transduktion weder ein Anstieg der Expressionsstärke auf mRNA- noch auf Proteinebene festgestellt werden (**Abbildung 34**). Als Ladekontrolle wurden 2ng rekombinantes MIA aufgetragen.

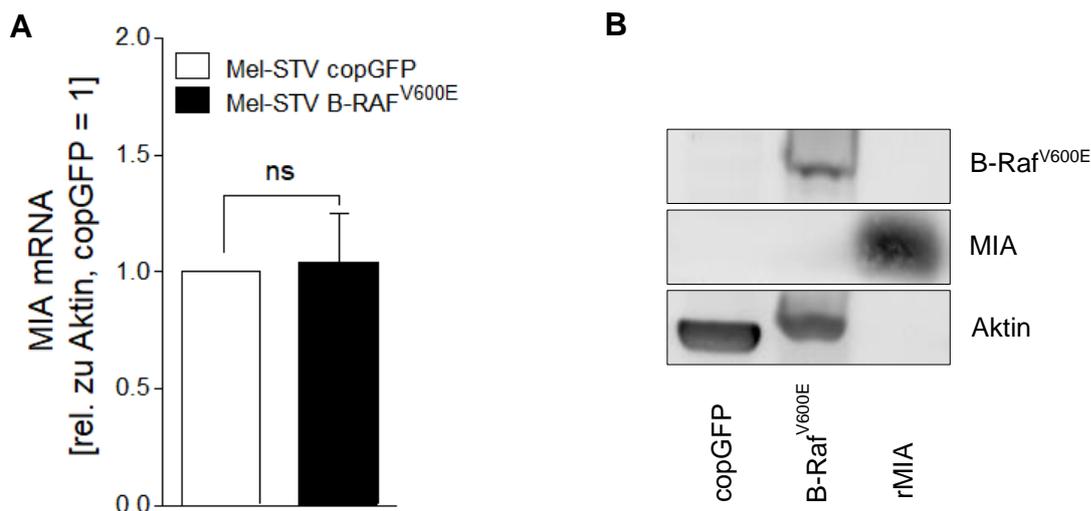


Abbildung 34: Überprüfung der MIA-Expression in Mel-STV nach B-Raf^{V600E}-Transduktion.

7 Tage nach der lentiviralen Transduktion mit copGFP und B-Raf^{V600E} wurde mittels qRT-PCR (**A**) und Western Blot (**B**) die MIA-Expression in Mel-STV ermittelt. Als Ladekontrolle wurden 2 ng rekombinantes MIA sowie β -Aktin aufgetragen. (***: $p < 0,001$, ns: nicht signifikant).

Diese Arbeit beschreibt zum ersten Mal, dass die MIA-Expression in Melanozyten und im Melanom unterschiedliche Auswirkungen hat. Es konnte gezeigt werden, dass MIA in Melanozyten die replikative Seneszenz über die Regulation von p21 beeinflussen kann und darüber hinaus an der Aufrechterhaltung der Onkogen-induzierten Seneszenz beteiligt ist. Die Regulation von p21 durch MIA lässt sich im Melanom nicht mehr nachweisen.

6. Diskussion

6.1. Die Seneszenz-assoziierte Rolle von MIA in Melanozyten

In bisherigen Studien wird MIA als ein protumorigenes Protein beschrieben, das in hohen Mengen von Melanomzellen gebildet wird, jedoch nicht von Keratinozyten, Fibroblasten oder Melanozyten (Bosserhoff et al., 1996). In der vorliegenden Dissertation konnte jedoch gezeigt werden, dass die Expression von MIA in hohen Passagen von NHEM durchaus nachweisbar ist. Das wiederum korreliert mit der Tatsache, dass MIA sowohl in Melanomgewebe, als auch in benignen Nävi detektierbar ist (Bosserhoff et al., 1999). Die vorhandenen Vordaten lieferten zudem erste Hinweise, dass MIA eventuell auch eine tumorprotektive Funktion ausüben könnte. In diesem Zusammenhang kam im Rahmen dieser Arbeit die Frage auf, wie sich die Funktion von MIA in Melanozyten und Melanom unterscheidet und wie dadurch die Tumorentstehung beeinflusst wird. Die Tumorentstehung kann prinzipiell durch zwei Hauptmechanismen verhindert werden: Apoptose und Seneszenz. In cDNA-Array-Analysen mit einer MIA-defizienten Melanomzelllinie konnte gezeigt werden, dass sich die Expression von Genen wie *Bcl2* und *Bax* (*Bcl2-associated X protein*), die mit Apoptose in Verbindung gebracht werden, in den MIA-defizienten Zellklonen nicht von der ursprünglichen Zelllinie unterschied (Poser et al., 2004). Zusammen mit den oben beschriebenen Erkenntnissen deutet dies an, dass MIA keinen Einfluss auf die Regulation von Apoptose hat, sondern vielmehr eine Rolle in der Modulation von Seneszenz spielt.

Diese kontroverse Rolle wurde bereits für einige Onkogene beschrieben, deren Expression in primären Zellen Seneszenz induzierte (Campisi, 2005b; Mooi and Peeper, 2006). So kann die *B-Raf^{V600E}*-Mutation in über 50 % aller Melanome und in bis zu 80 % der untersuchten Nävi gefunden werden (Damsky and Bosenberg, 2017; Sekulic et al., 2008; Tsao et al., 2004). *In vitro* führt die Expression von *B-Raf^{V600E}* in kultivierten Melanozyten zu einem sofortigen Proliferationsarrest (Michaloglou et al., 2005). Der Nachweis, dass eine Überexpression von *B-Raf^{V600E}* in NHEM zu Seneszenz führt, wurde auch in dieser Arbeit erbracht. Sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene stieg parallel zur *B-Raf^{V600E}*-Expression die Expression von MIA an (siehe „5.2. Induktion der MIA-Expression in der Onkogen-induzierten Seneszenz“). Der Zusammenhang zwischen MIA und OIS konnte zusätzlich einem weiteren OIS-Modell (*Hm^{hi}*-Zellklone) gezeigt werden. Zusammen mit den erhobenen Vordaten von Dr. Susanne Lamm, die ein früheres Tumor-Onset in MIA-defizienten Melanommäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren feststellen konnte, ergibt sich daraus die Hypothese, dass MIA eine Rolle in der Regulation der OIS spielt (Dissertation Susanne Schiffner 2012). Weiterhin konnte in NHEM in hoher Passage ein Anstieg der Zahl der seneszenten Zellen (replikative Seneszenz) sowie der MIA-Expression detektiert werden (siehe „5.1. Rolle von MIA in der replikativen Seneszenz“).

in Melanozyten“). Der *Knockdown* von MIA in diesen NHEM reduzierte die Anzahl seneszenten Zellen signifikant (siehe „3. Vordaten“). Diese Ergebnisse veranschaulichen, dass MIA neben der OIS auch die replikative Seneszenz beeinflusst.

Wie im vorherigen Absatz beschrieben, löst die Aktivierung von spezifischen Onkogenen in primären Zellen Seneszenz aus. Die Überexpression von MIA in NHEM wurde im Zuge dieser Arbeit erfolgreich etabliert und sollte die Frage klären, ob MIA ebenfalls als Induktor von Seneszenz fungieren kann. Da es sich bei MIA um einen beschriebenen autokrinen Faktor handelt, wurde außerdem die Behandlung von Melanozyten mit verschiedenen Konzentrationen an rekombinantem MIA durchgeführt. Sowohl nach Überexpression als auch nach Behandlung mit rekombinantem MIA konnte keine Veränderung in der Anzahl der seneszenten Zellen oder in der Genexpression der untersuchten CDK-Inhibitoren p14, p15, p16, p21 und p27 detektiert werden, woraus zu schließen ist, dass MIA allein nicht ausreichend ist, um Seneszenz zu induzieren. In weiterführenden Experimenten konnte aber auch festgestellt werden, dass der *Knockdown* von MIA in NHEM, in denen Seneszenz durch Überexpression von *B-Raf^{V600E}* ausgelöst wurden (OIS), sowie in NHEM in hohen Passagen (replikative Seneszenz) zu einer Reduktion von seneszenten Zellen führte. Zusätzlich konnte im OIS-Modell anhand des Proliferationsmarkers Ki-67 eine erhöhte Proliferationsrate in den MIA-defizienten NHEM detektiert werden. In dieser Arbeit konnte somit mit MIA zum ersten Mal ein Faktor beschrieben werden, der an der Aufrechterhaltung, aber nicht an der Induktion von replikativer Seneszenz sowie OIS beteiligt ist.

Um die molekularen Signalwege zu ermitteln, über die MIA die Aufrechterhaltung von Seneszenz moduliert, wurden die Expression der CDK-Inhibitoren p14, p15, p16, p21 und p27 nach MIA *Knockdown* in NHEM in hoher Passage überprüft. Die erhobenen Daten weisen darauf hin, dass MIA die Regulation der replikativen Seneszenz über den CDK-Inhibitor p21 vermittelt, da der *Knockdown* von MIA in NHEM in hohen Passagen die Expression von p21 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene reduziert. Daher sollen im Abschnitt „6.3. Die Rolle von p21 in der MIA-vermittelten Seneszenz“ mögliche molekularen Signalwege diskutiert werden, über die MIA die Regulation von p21 bei der Aufrechterhaltung von Seneszenz bewirkt.

Interessanterweise hat der *Knockdown* von MIA in NHEM, in denen OIS induziert wurde, keinen Einfluss auf die Expressionslevel von p21 und beeinflusst offensichtlich über andere Signalwege die Aufrechterhaltung von OIS. Dies weist darauf hin, dass in replikativer Seneszenz und OIS unterschiedliche Signalwege wichtig sein könnten. Diese Vermutung liegt nahe, da Seneszenz durch verschiedene Stimuli ausgelöst werden kann und der daraus resultierende Phänotyp durchaus heterogen ausfällt. In diesem Zusammenhang verglichen Nelson et al. die Genexpression zwischen replikativer Seneszenz und OIS in Fibroblasten. Sie

konnten feststellen, dass sowohl in OIS als auch in replikativer Seneszenz viele Gene, die im Zusammenhang mit dem SASP stehen, hochreguliert wurden. Allerdings ließen sich in dieser Gruppe durchaus Unterschiede finden. So wurden die Gene, die am IL-6- oder NF- κ B-Signalweg beteiligt sind, verstärkt in replikativer Seneszenz, jedoch kaum in OIS exprimiert (Nelson et al., 2014). Dies zeigt, dass die Genexpression in OIS und replikativer Seneszenz unterschiedlich sein kann und die Regulation der MIA-vermittelten Seneszenz in OIS und replikativer Seneszenz über unterschiedliche Signalwege stattfinden kann.

6.2. Die Funktion von MIA im malignen Melanom

Bisherige Studien belegen, dass das Protein MIA mit der Entwicklung und Progression des malignen Melanoms in Verbindung gebracht wird und dabei mit Komponenten der extrazellulären Matrix interagiert, wodurch es die Invasivität und das migratorische Potential von Melanomzellen fördert (Bosserhoff, 2005; Bosserhoff et al., 2003b; Schmidt and Bosserhoff, 2009; Schmidt et al., 2012). Zudem eignet sich MIA als diagnostischer Serummarker, da die gemessene MIA-Sekretion mit der Tumorprogression korreliert, was die bisherige Erkenntnis unterstreicht, dass MIA als protumorigener Faktor im malignen Melanom fungiert (Bosserhoff et al., 2001; Riechers and Bosserhoff, 2014).

In der Literatur lassen sich aber auch Daten finden, die eine Rolle von MIA in der Seneszenzinduktion/-erhaltung unterstützen. Durch die Etablierung einer MIA-defizienten Melanomzelllinie mittels stabiler Transfektion eines *antisense*-MIA-cDNA-Konstrukts wurde die Rolle von MIA bei der Melanomentstehung untersucht. Auffällig dabei war, dass die MIA-defizienten Zellklone sich morphologisch von der maternalen Zelllinie unterschieden und deutlich kleiner waren. Die ursprüngliche Zelllinie zeichnete sich zudem durch das Vorkommen weniger mehrkerniger Zellen aus, die so in den MIA-defizienten Zellen nicht auftraten (Poser et al., 2004; Tatzel et al., 2005). Morphologische Veränderungen wie Zellvergrößerung und Mehrkernigkeit zählen zu den Kennzeichen von Seneszenz, die in den MIA-defizienten Melanomzellen nicht vorzufinden waren. In derselben Studie konnte in Power Blot Analysen des Weiteren gezeigt werden, dass in den MIA-defizienten Zellen die Expression von E2F-1 hochreguliert ist (Poser et al., 2004). Die E2F-Familie ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt und vermittelt den G₁/S-Übergang. E2F-1 wird als Onkogen eingestuft, das unter bestimmten Voraussetzungen aber auch Apoptose auslösen kann (Catalgol, 2012; Quelle et al., 1995). Im Abschnitt „6.1. Die Seneszenz-assoziierte Rolle von MIA in Melanozyten“ wurde bereits beschrieben, dass MIA vermutlich keinen Einfluss auf die Regulation von Apoptose hat. Daher geben diese Daten einen Hinweis darauf, dass durch das Ausschalten von MIA die Regulation des Zellzyklus und im weiteren Sinne die Proliferation beeinflusst werden kann. In den im vorherigen Kapitel diskutierten Daten reduziert der *Knockdown* von MIA in Melanozyten

in hoher Passage die Expression von p21 und greift somit auch in die Regulation des Zellzyklus und damit auch auf den seneszenten Zustand von Melanozyten ein. In diesem Zusammenhang kam im Rahmen der Arbeit die Frage auf, welchen Einfluss MIA auf die Regulation von Seneszenz im Melanom hat. Um diese Fragestellung zu bearbeiten, wurde die MIA-Expression in zwei Melanomzelllinien mittels spezifischem siPool gegen MIA inhibiert und der zuvor in Melanozyten gezeigte Einfluss dieser MIA-Reduktion auf den CDK-Inhibitor p21 untersucht. In beiden Zelllinien konnte die Expression von p21 sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene detektiert werden, allerdings kein Unterschied in den Expressionsleveln zwischen siKontrolle und siMIA behandelten Melanomzellen. Daraus ergab sich die Hypothese, dass die Funktion von MIA in Melanozyten in hoher Passage und im Melanom sehr unterschiedlich ist und die Regulation von p21 im Melanom MIA-unabhängig abläuft.

In Tumorzellen findet man häufig eine erhöhte Expression der Telomerase. Daraus resultiert, dass Telomere in den Tumorzellen auf einer Länge gehalten werden, die kontinuierliches Wachstum zulassen (Shay and Bacchetti, 1997; Shay and Wright, 2005). Im Gegensatz dazu ist die *TERT*-Expression in somatischen Zellen stark reguliert und somit kaum oder nur in sehr geringen Leveln vorhanden. In Studien wurde bereits eine positive Korrelation zwischen *TERT* mRNA Expression und Telomeraseaktivität bestätigt, weshalb vermutet wird, dass die Telomerase hauptsächlich durch die *TERT*-Genexpression gesteuert wird (Cong et al., 1999; Yi et al., 1999). Young et al. konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die Expression von p21 in seneszenten Fibroblasten auf mRNA- und Proteinebene ansteigt, was durch die ektopische Expression von *TERT* verhindert wird. *TERT* regulierte dabei die p21-Promotoraktivität, wodurch die p21-Expression auf einem konstantem Level gehalten wurde, vergleichbar mit jungen, proliferierenden Zellen (Young et al., 2003). Zusammen mit den in dieser Arbeit gezeigten Daten führt dies zu der Hypothese, dass es sich bei der Regulation von p21 im Melanom durch die Expression von *TERT* um einen vorgeschalteten Signalweg handelt und somit der *Knockdown* von MIA im Melanom keinen Einfluss auf das Expressionslevel von p21 hat.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Aufrechterhaltung der replikativen Seneszenz von der Verkürzung der Telomere abhängig ist. Beweise dafür lieferte unter anderem die ektopische Expression der katalytischen Untereinheit der Telomerase *TERT*, die die Telomere verlängert und den Proliferationsstopp in Fibroblasten aufhebt (Bodnar et al., 1998). Entsprechend ist die ektopische Expression von *TERT* eine übliche Vorgehensweise, um die Immortalisierung von primären, humanen Zellen zu ermöglichen (Kuilman et al., 2010). Um die Rolle von MIA im Zusammenhang mit *TERT* genauer zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die immortalisierte Melanozytenzelllinie Mel-STV, die *TERT* stabil exprimiert, verwendet. Interessanterweise führte die lentivirale Überexpression von *B-Raf*^{V600E} in Mel-STV weder auf

mRNA- noch auf Proteinebene zu einer verstärkten Expression von MIA wie es zuvor in NHEM zu beobachten war. Dies legt die Vermutung nahe, dass durch die Expression von *TERT* die B-Raf^{V600E}-vermittelte Induktion von MIA verhindert wird und bestätigt die zuvor aufgestellte Hypothese, dass TERT in der Signalkaskade vor MIA liegt.

Verschiedene Studien zeigten bereits, dass die Telomeraseaktivität mit der Melanomprogression ansteigt (Carvalho et al., 2006; Glaessl et al., 1999). Entsprechend konnten in primären Melanomen in 33 %, in Melanom-Metastasen sogar in 85 % aller Fälle Mutationen in der Promotor-Region von *TERT* gefunden werden, jedoch keine in RGP-Melanomen oder in Nävi (Griewank et al., 2014; Horn et al., 2013). Wie oben beschrieben, exprimieren somatische Zellen generell keine Telomerase. Diese Erkenntnisse liefern die Erklärung, warum TERT keinen Einfluss auf die MIA-vermittelte Regulation der OIS in Melanozyten oder der replikativen Seneszenz in NHEM in hohen Passagen hat, wie sie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurden. Insgesamt scheint jedoch die Repression der MIA-Expression durch TERT ein komplexer Vorgang zu sein, da diverse Studien belegen, dass es einen Zusammenhang zwischen *TERT*-Promotormutationen und anderen genetischen Veränderungen wie *B-Raf*- oder *Ras*-Mutationen gibt. Speziell im Melanom ist die Mutation des *TERT*-Promotors die häufigste somatische Veränderung, die konsistent mit *B-Raf*-/*Ras*-Mutationen korreliert (Griewank et al., 2014; Heidenreich et al., 2014; Horn et al., 2013; Landa et al., 2016; Macerola et al., 2015; Pestana et al., 2017; Populo et al., 2014). Gleichzeitig wird aber auch MIA stark von Melanomzellen exprimiert und sekretiert (Blesch et al., 1994). Insofern bedarf es für das Verständnis, über welche exakten Mechanismen TERT regulierend auf MIA einwirkt weitere Untersuchungen, die nicht Bestandteil dieser Doktorarbeit waren.

6.3. Die Rolle von p21 in der MIA-vermittelten Seneszenz

Die gezeigten Ergebnisse weisen darauf hin, dass MIA über die Regulation des CDK-Inhibitors p21 einen Einfluss auf den seneszenten Zustand in Melanozyten hat. P21 wird durch p53 aktiviert und kann die Cyclin-abhängigen Kinasen 1, 2, 4 und 6 hemmen, wodurch p21 das Fortschreiten des Zellzyklus in der G₁- und S-Phase reguliert. Durch die Inhibierung des Zellzyklus kann p21 einen Wachstumsarrest und Seneszenz auslösen (Chandler and Peters, 2013). P21 kann auch unabhängig von p53 über andere Transkriptionsfaktoren reguliert werden. So lassen sich im p21-Promotorbereich diverse Bindestellen für andere Faktoren finden, die die p21-Transkription stimulieren oder hemmen. Zudem findet beispielsweise über miRNAs eine posttranskriptionelle und über Phosphorylierung und Ubiquitinierung eine posttranslationale Regulation von p21 statt (Gartel and Tyner, 1999; Jung et al., 2010). P21 stellt somit ein stark reguliertes Gen dar, das auf unterschiedlichen Ebenen von diversen Faktoren kontrolliert wird. So wurde unter anderem auch beschrieben, dass eine Aktivierung

von ERK an der Induktion von p21 beteiligt ist (Auer et al., 1998; Liu et al., 1996; Pumiglia and Decker, 1997). Über den ERK-Signalweg werden je nach Zelltyp unterschiedliche Prozesse wie beispielsweise Proliferation, Differenzierung, Zellüberleben, Migration und Angiogenese vermittelt (Dunn et al., 2005; Yoon and Seger, 2006). Die Antwort auf die Frage, wie ERK diese verschiedenen Funktionen ausüben kann, scheinen die Dauer und die Stärke des ERK-Signals zu sein (Dhillon et al., 2007; Murphy and Blenis, 2006). So führt ein anhaltendes ERK-Signal zur Phosphorylierung und Stabilisierung von Genen, die den Zellzykluseintritt fördern und zeitgleich zur Hemmung von Genen, die die Proliferation hemmen (Yamamoto et al., 2006). Hohe ERK-Level hingegen führen zum Zellzyklusarrest, indem sie die Expression von CDK-Inhibitoren wie p21 und p27 induzieren (Dhillon et al., 2007; Mirza et al., 2004; Sewing et al., 1997; Woods et al., 1997). In diesem Zusammenhang belegte eine Studie, dass MIA-defiziente Melanomzellen kein konstitutiv aktives ERK-Signal aufweisen (Tatzel et al., 2005). Dies legt die Vermutung nahe, dass MIA ein anhaltendes ERK-Signal fördert, was zur Induktion von p21 führen kann. Zusammen mit den Daten aus der vorliegenden Arbeit sowie den Vordaten von Susanne Lamm, führt dies zur Hypothese, dass der *Knockdown* von MIA in Melanozyten in hoher Passage das konstitutive ERK-Signal reduziert, was letztendlich in der Reduktion der p21-Expression mündet. Die Abhängigkeit von der Stärke des ERK-Signals könnte auch eine Erklärung dafür liefern, warum der *Knockdown* von MIA in B-Raf^{V600E}-transduzierten Melanozyten nicht zu einer Reduktion der p21-Expression führt. Die V600E-Mutation erhöht die B-Raf-Kinase-Aktivität drastisch und damit ihre Fähigkeit, den ERK-Signalweg zu aktivieren (Garnett and Marais, 2004). Dies könnte den Effekt, den das Ausschalten von MIA auf die p21-Expression hat, beeinflussen und mindern.

Insgesamt ist bis heute nur wenig über die exakten, molekularen Signalwege bekannt, die MIA beeinflusst. Unsere Arbeitsgruppe konnte jedoch bereits zeigen, dass p54 (p54^{nr**b**} oder NONO: *non-POU domain containing octamer binding*) an der Entstehung und Progression des malignen Melanoms beteiligt ist und MIA dabei die Initiation der p54-Expression reguliert (Schiffner et al., 2011). Dabei aktiviert MIA den Transkriptionsfaktor YBX1 (*Y-box binding protein 1*), der wiederum die Promotoraktivität und somit Expression von p54 steigert (Schmid et al., 2013). YBX1 ist an einer Vielzahl von zellulären Funktionen wie DNA-Transkription und -Reparatur sowie translationaler Kontrolle der Proteinsynthese beteiligt. YBX1 gilt als hoch konservierter, onkogener Transkriptionsfaktor, der an der Entstehung von verschiedenen Tumorarten, darunter auch das maligne Melanom, beteiligt ist (Matsumoto and Wolffe, 1998; Schitteck et al., 2007; Sinnberg et al., 2012; Wu et al., 2007). Die Regulation von p21 über YBX1 wird jedoch durchaus kontrovers diskutiert und ist eventuell vom Zelltyp abhängig. In Untersuchungen führte die Herabregulierung von YBX1 in Prostata- und Magenkrebs zu einer reduzierten p21-Expression, was zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit passt, die zeigen, dass der *Knockdown* von MIA zu einer geringeren p21-Expression führt (Liu et al.,

2015; Okamoto et al., 2000). Dies konnte jedoch in anderen Studien nicht bestätigt werden, die in Tumorzellen sogar eine verstärkte p21-Expression nach YBX1-*Knockdown* feststellten (Chatterjee et al., 2008; Jurchott et al., 2003; Lasham et al., 2003). Hierbei muss beachtet werden, dass der Einfluss von YBX1 auf p21 in diesen Studien in Tumorzellen untersucht wurde. Die Verringerung der p21-Expression durch einen MIA *Knockdown* wurde in der vorliegenden Arbeit in primären Melanozyten detektiert. Trotzdem ist die Regulation von p21 durch MIA über die YBX1 fraglich und benötigt weitere Untersuchungen.

6.4. Die Rolle von MIA in einem *in vivo* Melanommausmodell

Es gibt ausreichend experimentelle Nachweise, dass humane Tumorzellen, die in der Zellkultur verwendet werden, durchaus die Situation in der ursprünglichen Tumorkläsion repräsentieren (Masters, 2000; Meier et al., 2000; Smalley et al., 2006). Dennoch ist es einleuchtend, dass Tumorzellen, die in einer Umgebung mit Komponenten der extrazellulären Matrix, Stromazellen, inflammatorischen Zellen sowie Endothelzellen wachsen, sich anders verhalten können (Bissell and Radisky, 2001; Schittek et al., 2017). Bereits 1889 wurde von Paget festgestellt, dass die Tumorumgebung einen Einfluss auf die Tumorprogression hat und die daraus resultierende Theorie als „*seed and soil*“ benannt (Paget, 1889). Diese Theorie besagt, dass nicht nur genetische Veränderungen den Phänotyp von Tumorzellen gestalten, sondern auch Faktoren aus der Umgebung Einfluss auf das Verhalten der Tumorzellen haben. Entsprechend ist die Verwendung geeigneter Tiermodelle eine Möglichkeit, die *in vivo*-Situation von humanen Tumorerkrankungen nachzustellen. Ein großer Vorteil von Mausmodellen ist, dass diese Tiere in Bezug auf die verschiedenen genetischen Abwandlungen einer Tumorerkrankung eine hohe Homologie zum menschlichen Genom aufweisen und zudem noch relativ einfach genetisch manipuliert werden können (Schittek et al., 2017). Auch in der vorliegenden Arbeit wurden die *in vitro* produzierten Ergebnisse anhand von Mausmodellen untersucht.

Als Melanommausmodell wurden Grm1-transgene Mäuse verwendet, in denen der metabotrope Glutamat-Rezeptor 1 unter Kontrolle der Melanozyten-spezifischen Dopachrom-Tautomerase-Promotors überexprimiert wird. Dadurch entstehen melanozytäre Hyperproliferationen, was zur Entstehung von Melanomen vorrangig an den unbehaarten Hautregionen wie Schwanz, Ohren und Perianalregion führt. Dieses Melanommausmodell zeichnet sich besonders dadurch aus, dass die malignen Melanome bei den Grm1-transgenen Tieren ohne einen zusätzlichen exogenen Stimulus und innerhalb einer kurzen Latenzzeit mit hundertprozentiger Penetranz auftreten (de Jel et al., 2014; Pollock et al., 2003a; Schiffner et al., 2014; Schiffner et al., 2012). Grm1 spielt auch bei der Entstehung des humanen Melanoms eine wichtige Rolle, was die detektierbare Überexpression von Grm1 in 65 % aller humanen

Melanom-Biopsien sowie in 80 % aller humanen Melanomzelllinien sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene belegt (Isola et al., 2018; Pollock et al., 2003a). Die Aktivierung des Grm1-Rezeptors löst eine Signalkaskade aus, die letztendlich zur Aktivierung des MAPK- und PI3K/AKT-Signalweges führt (Marin and Chen, 2004; Marin et al., 2006; Namkoong et al., 2007; Yu et al., 2017). Diese Signalwege liegen im malignen Melanom häufig entartet vor. Daher eignet sich die Grm1-Maus hervorragend, um die molekularpathologischen Prozesse der Melanomentwicklung *in vivo* zu untersuchen. Die Grm1-transgenen Tiere wurden mit MIA-defizienten Mäusen gekreuzt, bei denen keine spontane Melanomentwicklung zu beobachten ist und die phänotypisch nur geringe ultrastrukturelle Veränderungen im Knorpel aufweisen (Moser et al., 2002; Schmid and Bosserhoff, 2014; Schmid et al., 2010). Durch die Kreuzung eines Melanommaus-Modells mit MIA-defizienten Mäusen sollte die Rolle von MIA bei der frühen Entwicklung des Melanoms untersucht werden. Die Tg(*Grm1*)/MIA^{-/-} Mäuse wiesen wie erwartet eine reduzierte Metastasierungsrate in Lunge und Leber auf (Dissertation Susanne Lamm geb. Schiffner 2012). Aus den gezeigten Vordaten dieser Arbeit wird aber auch ersichtlich, dass diese Tiere ein signifikant früheres Tumor-Onset zeigen, wodurch ein entscheidender Hinweis gegeben wurde, dass MIA in der frühen Melanomentstehung eine andere Funktion ausübt als in einem fortgeschrittenen Stadium. Das frühere Tumor-Onset bei den MIA-defizienten Mäusen legt somit einen Einfluss von MIA auf den Schutzmechanismus Seneszenz nahe, der im Zuge dieser Arbeit anhand der beschriebenen Mausmodelle weiter untersucht wurde.

Aus Hautproben isolierte mRNA-Proben von Tg(*Grm1*) und Tg(*Grm1*)/MIA^{-/-} Mäusen wiesen einen signifikanten Unterschied in der p21-Expression auf. In den Proben von MIA-defizienten Tieren konnte eine reduzierte p21-Expression detektiert werden, sowohl vor als auch nach Tumor-Onset. Dies bestätigt die Ergebnisse aus den *in vitro* Experimenten, in denen der *Knockdown* von MIA in Melanozyten in hoher Passage zu einer Reduktion von p21 auf mRNA- und Proteinebene führte. Passend dazu konnte bei Melanozyten, die aus Tg(*Grm1*)/MIA^{-/-} Tieren isoliert wurden, im Vergleich zu den aus Kontrolltieren isolierten Melanozyten eine erhöhte Proliferationsrate festgestellt werden. Melanozyten aus Tg(*Grm1*) Mäusen wiesen zudem nach einer anfänglichen Wachstumsphase ein stagnierendes Proliferationsverhalten auf, das bei Melanozyten aus MIA-defizienten Tieren nicht detektierbar war. Ein verringertes Proliferationspotential wiederum ist ein phänotypisches Hauptmerkmal von Seneszenz. Dies bestätigt die *in vitro* Ergebnisse mit B-Raf^{V600E}-transduzierten NHEM, in denen die MIA-defizienten NHEM B-Raf^{V600E} eine erhöhte Proliferationsrate aufwiesen, die anhand des Proliferationsmarker Ki-67 detektierbar waren. Die *in vivo* Ergebnisse unterstreichen somit insgesamt die erhobenen *in vitro* Daten. MIA scheint in der frühen Entwicklung des Melanoms wichtig für die Aufrechterhaltung des seneszenten Zustands zu sein und wirkt sich erst in einem späteren Stadium der Erkrankung tumorprogressiv aus.

6.5. MIA als Teil des SASP?

Senescente Zellen sekretieren eine große Menge an Chemokinen, Interleukinen, Proteasen und Wachstumsfaktoren, die mit Inflammation und Malignität assoziiert sind. Zusammengenommen werden diese löslichen, Seneszenz-assoziierten Faktoren als Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp (SASP) bezeichnet (Coppe et al., 2008). SASP wird nicht direkt von Seneszenz induziert, sondern stellt vielmehr eine Antwort auf anhaltende Signale dar, die durch DNA-Schäden ausgelöst werden. Dadurch kommt es zur Aktivierung der Kinase p38MAPK, wodurch wiederum der Transkriptionsfaktor NF- κ B phosphoryliert und aktiviert wird. Freund et al. konnten nachweisen, dass NF- κ B einen Großteil der SASP-Faktoren in seneszenten, humanen Fibroblasten induziert (Freund et al., 2011). Die NF- κ B-Familie besteht aus fünf Transkriptionsfaktoren: NF- κ B1 (p50), NF- κ B2 (p52), RelA (p65), RelB und c-Rel. P50 und p65 bilden dabei die häufigsten Heterodimere und sind in den meisten Zelltypen zu finden (Napetschnig and Wu, 2013). Als Komponente des NF- κ B-Signalwegs ist p65 typischerweise an der körpereigenen, inflammatorischen Immunantwort beteiligt (Gilmore, 2006). P65 scheint aber auch eine Rolle bei der Regulation von MIA zu spielen. Es konnte gezeigt werden, dass p65 zusammen mit HMGB1 (*high-mobility-group-protein B1*) an der Promotorregion von MIA bindet und damit dessen Promotoraktivität steigert. Durch das Ausschalten von HMGB1 mittel *antisense*-Technologie in Melanomzelllinien wurde die Expression von MIA auf mRNA- und Proteinebene reduziert. Die Re-Expression von HMGB1 in diesen Zellen wiederum induzierte die MIA-Expression (Poser et al., 2003). HMGB1 wird im Melanom verstärkt exprimiert und gehört zur Familie der *High-Mobility-Group*-Proteine, die Chromatin-assoziiert sind und beispielsweise die Transkription, Replikation und DNA-Reparatur steuern. Darüber hinaus ist HMGB1 ein sekretiertes Zytokin, welches an der Immunantwort auf zellulären Stress beteiligt ist (Bossert, 2005; Castiglioni et al., 2011; Stros, 2010). Sekretierte HMGB1-Proteine induzieren inflammatorische Signalwege, aktivieren die unspezifische Immunantwort mittels Bindung an Rezeptoren wie beispielsweise TLR2 und TLR4 (*toll like receptor 2 /4*) und sind damit direkt mit dem NF- κ B-Signalweg und der Bildung des SASP verbunden (Salminen et al., 2012; Tang et al., 2011).

Interessanterweise lösen nicht alle im Abschnitt „2.3.1. Merkmale von Seneszenz“ beschriebenen Signale eine vermehrte Expression von SASP-Faktoren aus. Der SASP scheint vielmehr von den vorangeschalteten Elementen der DDR-Kaskade abhängig zu sein. So induziert die lentivirale Überexpression von p16 in Fibroblasten zwar einen seneszenten Phänotyp, aber in Abwesenheit von DNA-Schäden wird kein SASP initiiert. Ähnliche Ergebnisse können mit onkogenem Ras erzielt werden, das in ATM-defizienten Mäusen nur einen geringen SASP hervorruft (Rodier et al., 2009). Andere Studien konnten belegen, wie wichtig die SASP-Faktoren für die Aufrechterhaltung des seneszenten Zustands von Zellen

sind. Kuilman et al. zeigten, dass B-Raf^{V600E}-induzierte Seneszenz durch den *Knockdown* von Interleukin-6 (IL-6) überwunden werden kann und dabei andere inflammatorische Regulatoren wie Interleukin-8 (IL-8) und Interleukin 1 α und β (IL-1 α und IL-1 β) supprimiert wurden (Kuilman et al., 2008). Ähnliche Ergebnisse erzielte das Ausschalten von NF- κ B in Fibroblasten, die die H-Ras-induzierte Seneszenz umgehen konnten (Chien et al., 2011; Rizos et al., 2017). Da es sich bei MIA unter anderem um einen autokrinen Faktor handelt, ist es denkbar, dass MIA über ähnliche Mechanismen an der Aufrechterhaltung von Seneszenz beteiligt ist. Der *Knockdown* von MIA in B-Raf^{V600E}-transduzierten, seneszenten NHEM führte zu einer Reduktion der Anzahl seneszenter Zellen im Vergleich zur NHEM B-Raf^{V600E} und zu einer Erhöhung der proliferierenden Zellen, die durch eine positive Ki-67-Färbung dargestellt werden konnten. Diese Daten zeigen, dass die löslichen Faktoren des SASP eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung von Seneszenz spielen und MIA als sekretierter Faktor Teil des SASP sein könnte.

Neben den im vorherigen Abschnitt beschriebenen, tumorsuppressiven Eigenschaften des SASP können durch die Sekretion dieser löslichen Faktoren in die extrazelluläre Umgebung auch protumorigene Effekte ausgelöst werden. SASP-Faktoren wie IL-6 und IL-8 können die Krebsprogression fördern, indem sie die Proliferation, Angiogenese, und Invasivität stimulieren (Ancrile et al., 2007; Coppe et al., 2008; Kuilman et al., 2008; Rodier et al., 2009). Für andere Faktoren wie Matrix-Metalloproteinasen konnte gezeigt werden, dass sie die Tumorgenese von Brustkrebs begünstigen, indem sie die Differenzierung von epithelialen Tumorzellen modifizieren und zudem die Gewebsintegrität verändern, was Migration von Tumorzellen erleichtert (Acosta and Gil, 2009; Liu and Hornsby, 2007). Auch MIA ist als onkogener Faktor bekannt, der selbst von Melanomzellen sezerniert wird und durch Interaktion mit verschiedenen Bestandteilen der extrazellulären Matrix Progression, Invasion und Metastasierung des malignen Melanoms fördert (Blesch et al., 1994; Bosserhoff et al., 2003a; Schmidt et al., 2013; Stahlecker et al., 2000). In Studien konnte gezeigt werden, dass α 5 β 1-Integrine die Aktivität der Matrixmetalloproteinasen 2 und 7 verändern können (Mitra et al., 2003). An Integrin α 5 β 1 wiederum kann MIA direkt binden, womit denkbar wäre, dass MIA durch Bindung und Inaktivierung der Integrine Einfluss auf die Regulierung von MMPs nimmt (Bauer et al., 2006).

Letztendlich kann aber auch das angeborene Immunsystem durch die inflammatorischen Zytokine des SASP aktiviert werden und die onkogene Wirkung von SASP einschränken, indem es beschädigte oder seneszente Zellen beseitigt (Xue et al., 2007). Die Akkumulierung von inflammatorischen Zytokinen wird mit einigen Alters-assoziierten Erkrankungen in Verbindung gebracht, was mit der Anreicherung von SASP-Faktoren wie IL-6, TGF β (*transforming growth factor β*) oder Fibronectin im Alter korreliert (Carrieri et al., 2004; Ershler and Keller, 2000; Goldstein et al., 1994; Herbig et al., 2006; Rasoamanantana et al., 1994;

Rossi et al., 2007). Obwohl der genaue Einfluss von SASP *in vivo* noch geklärt werden muss, weisen diese Daten darauf hin, dass seneszente Zellen eine komplexe Zusammensetzung an Zytokinen freisetzen können, die in der Lage sind, den seneszenten Zustand in umliegenden, nicht-malignen Zellen zu stabilisieren, eine Immunantwort hervorzurufen, die beschädigte Zellen beseitigt und oder auch die Tumorgenese von prämaligen oder malignen Zellen zu fördern (Acosta et al., 2013; Rizos et al., 2017). Dies spiegelt wider, dass die Bestandteile des SASP sowohl an der Regulation von Seneszenz beteiligt sind als auch protumorigen wirken können. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dies ebenso für MIA gilt, das als Onkogen-assoziiertes Faktor an der Regulation von replikativer Seneszenz sowie OIS *in vivo* und *in vitro* beteiligt ist.

6.6. Die Reversibilität von Seneszenz

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse weisen darauf hin, dass MIA an der Aufrechterhaltung, nicht aber an der Induktion der melanozytären Seneszenz beteiligt ist. Das Ausschalten von MIA fördert das Tumor-Onset *in vivo*, reduziert die Anzahl seneszenter Zellen und erhöht damit einhergehend den Anteil proliferierender Zellen. Das Ausschalten von MIA führt somit zur Reduktion des seneszenten Phänotyps. Mit der in dieser Arbeit belegten Überwindung der Seneszenz kommt eine Frage auf, die auch in der Literatur immer wieder diskutiert wird: Ist Seneszenz strikt irreversibel? Frühe *in vitro* Studien mit p16 oder Raf-1 legten die Vermutung nahe, dass dies grundsätzlich der Fall ist, jedoch konnten nachfolgende Untersuchungen zeigen, dass Seneszenz durchaus überwunden und dieser Vorgang auch *in vivo* beobachtet werden kann (Kato et al., 1998; Kuilman et al., 2010; Zhu et al., 1998). Verschiedene Studien belegten, dass eine Melanozyten-spezifische Expression von B-Raf^{V600E} in Mäusen ähnlich wie in humanen Nävi zur Entstehung von benignen melanozytären Läsionen führt (Dankort et al., 2009; Dhomen et al., 2009; Goel et al., 2009). Daran anschließende Untersuchungen zeigten allerdings auch, dass, obwohl ein Großteil der B-Raf^{V600E}-induzierten Mausnävi in einem stabilen Wachstumsarrest verharren, aus einem kleinem Anteil dieser Nävi später Melanome entstehen (Damsky et al., 2015). Dies spiegelt die Situation in humanen Nävi wider. Der größte Anteil der melanozytären Nävi bleibt lebenslang stabil und nur etwa 5 % der engmaschig überwachten Nävi weisen detektierbare Veränderungen auf (Haenssle et al., 2006; Kittler et al., 2000; Robinson and Nickoloff, 2004). Der prozentuale Anteil, wie viele Melanome tatsächlich aus Nävi als Vorläuferläsionen entstehen, ist umstritten und schwankt zwischen 25 - 50 % (Bevona et al., 2003; Huang et al., 2017; Sagebiel, 1993). Dabei ist noch nicht verstanden, wie es zur Überwindung der Seneszenz als Tumorbarriere kommt, die letztendlich zur Tumorentstehung führt. Es gibt dazu verschiedene Studien, die sich mit der Aufklärung dieser Fragestellung beschäftigen und die Reversibilität von Seneszenz untersuchen.

Obwohl verschiedene Stimuli Seneszenz auslösen können, sind meistens zwei Signalwege an der Initiierung und Aufrechterhaltung von Seneszenz beteiligt. Diese Signalwege werden durch die Tumorsuppressorproteine p53 und Rb reguliert. Diese beiden Proteine sind in humanen Krebszellen oft fehlreguliert, wodurch diese Zellen teilweise die Fähigkeit verloren haben, Seneszenz zu induzieren (Sherr, 1996). Interessanterweise konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass die seneszente Reaktion durch die Wiederherstellung des p53- und Rb-Signalwegs erneut hervorgerufen werden kann. So konnte beispielsweise durch die Re-Expression von p16 in humanen Tumorzellen der seneszente Phänotyp rekonstruiert und aufrecht gehalten werden (Haferkamp et al., 2008; Rizos et al., 2017; Sugrue et al., 1997). Zusätzlich konnte die Reversibilität von Seneszenz durch das Ausschalten bestimmter Proteine ebenfalls gezeigt werden. So führte der Funktionsverlust von p53 zu einer verzögerten oder sogar gar nicht eintretenden Seneszenz in bestimmten Zelllinien (Itahana et al., 2001). Damit einhergehend konnten Beauséjour et al. zeigen, dass eine p53 Depletion den Zustand der replikativen Seneszenz in Fibroblasten revidiert (Beausejour et al., 2003). In Zebrafischen konnte ähnliche Resultate beobachtet werden, wo die durch B-Raf^{V600E}-induzierte OIS durch Suppression von p53 aufgehoben wurde (Patton et al., 2005). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass MIA über p21 an der Aufrechterhaltung der zellulären Seneszenz beteiligt ist. Entsprechende Hinweise über die Funktion von p21 bei der Aufrechterhaltung lassen sich ebenfalls in der Literatur finden. So wird p21 beispielsweise verstärkt in normalen humanen Fibroblasten exprimiert, die sich in einem Wachstumsarrest befinden. Das Ausschalten der p21-Expression fördert den Wiedereintritt in den Zellzyklus und die DNA-Synthese (Brown et al., 1997; Nakanishi et al., 1995; Romanov et al., 2010; Stein et al., 1999; Yosef et al., 2017). Diese Ergebnisse korrelieren mit den gezeigten Resultaten, in denen der MIA *Knockdown* in NHEM in hoher Passage die Anzahl der seneszenten Zellen sowie die p21-Expression reduziert. Diese Studien belegen die in dieser Arbeit erhobenen Daten, dass durch das Ausschalten einzelner Faktoren die Stabilität des seneszenten Zustands beeinflusst werden kann.

Die Reversibilität und Aufrechterhaltung von Seneszenz stellen zudem wichtige Aspekte des Ansatzes dar, Seneszenz für Therapiezwecke zu nutzen. Daher soll im folgenden Abschnitt die therapeutische Funktion von Seneszenz genauer diskutiert werden.

6.7. Seneszenz als therapeutisches Ziel bei Krebserkrankungen

Trotz Fortschritten bei der Entwicklung von zielgerichteter Tumorthherapie sowie Immuntherapie wird auch heutzutage noch die zytotoxische Behandlung von Tumoren in Form von Chemo- und Strahlentherapie eingesetzt. Diese Behandlungsweise zielt auf den völligen Zelltod in soliden Tumoren ab und verursacht entsprechend schwere Nebenwirkungen.

Häufige Komplikationen der Chemotherapie sind die Induktionen von Neutropenie (Verminderung der neutrophilen Granulozyten im Blut) und Lymphopenie (Mangel an Lymphozyten im Blut) und daraus resultierend kumulative Schäden im blutbildenden System. Durch Chemotherapie herbeigeführte, fieberhafte Neutropenie kann besonders bei älteren Patienten zu infektiösen Erkrankungen sowie zu einer beachtlichen Erhöhung der Morbidität führen (Ma et al., 2016; Marti et al., 2010). Eine systemische Lymphopenie korreliert nachgewiesen in mehreren Krebsarten mit einer schlechten Prognose für das Gesamtüberleben und das progressionsfreie Überleben (Ray-Coquard et al., 2009). Eine alternative therapeutische Strategie zur Behandlung mit zytotoxischen Medikamenten ist die Induktion zytostatischer Effekte, wodurch die proliferative Kapazität der Zellen beeinträchtigt wird, ohne einen Zelltod zu bewirken. Die Therapie-induzierte Seneszenz (TIS) tritt aktuell als ein Resultat von akuten DNA-Schäden bei vielen therapeutischen Krebsbehandlungen auf, kann aber auch *in vitro* in Tumorzelllinien beobachtet werden (Bianchi-Smiraglia et al., 2017). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass das Vorkommen von seneszenten Zellen zu einer Verbesserung des Therapieausgangs beim Kolonkarzinom führt (Haugstetter et al., 2010). Zudem könnte das Auftreten von vereinzelt, seneszenten Zellen in Tumoren auf eine bestehende Sensibilität bezüglich Seneszenz-Induktion hinweisen, was wiederum ein möglicher Ansatz für eine Seneszenz-induzierende Therapie darstellen könnte (Rizos et al., 2017).

Aufgrund der zytostatischen Effekte von TIS wird auch diskutiert, ob TIS gezielt als neue Strategie in der Krebstherapie eingesetzt werden kann. (Bianchi-Smiraglia et al., 2017; Chang et al., 1999; Schmitt et al., 2002; Schmitt and Lowe, 2002; te Poele et al., 2002). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die pharmakologische Induktion von Seneszenz das Wachstum von Prostatakrebs-Zellen *in vivo* hemmt (Alimonti et al., 2010). TIS ist außerdem in Tumorbiopsien nach neoadjuvanter Chemotherapie nachweisbar (Roberson et al., 2005). Seneszenz kann durch die Reaktivierung von Tumorsuppressoren oder die Inhibition von Onkogenen ausgelöst werden. So führte beispielsweise die Reaktivierung von p53 zu einer wirksamen Seneszenz-Induktion in Sarkomen und Leberkarzinomen. Vermutlich aktivierten die dabei entstehenden SASP-Faktoren das angeborene Immunsystem, was letztendlich zu einer Reduktion der Tumore führte (Ventura et al., 2007; Xue et al., 2007). Die gezielte Inhibition von B-Raf und MEK löst Seneszenz in B-Raf^{V600E}-mutierten Melanomzellen aus und die Inhibition von MEK sensibilisierte zudem Melanomzellen für Strahlentherapie (Haferkamp et al., 2013; Schick et al., 2015).

Neben der Beteiligung von Seneszenz an der Tumorsuppression muss auch in Erwägung gezogen werden, dass Medikamenten-induzierte seneszente Krebszellen sich akkumulieren und zu Arzneimittelresistenzen und dem Auftreten von Rezidiven beitragen. Eine übermäßige

Ansammlung seneszenten Zellen in Geweben kann sich zudem negativ auf die regenerativen Fähigkeiten des Gewebes auswirken. Durch die seneszenten, aber metabolisch aktiven Zellen kann sich außerdem ein proinflammatorisches Milieu bilden, das das Auftreten und die Progression von verschiedenen altersbedingten Krankheiten, darunter auch Krebs, fördern kann (Hernandez-Segura et al., 2018; Lecot et al., 2016; Sharpless and Sherr, 2015). Wie unter Abschnitt „6.5. MIA als Teil des SASP?“ beschrieben, kann die Sekretion von inflammatorischen Faktoren die Proliferation von Tumorzellen und die Angiogenese stimulieren. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die Überwindung von TIS bei Brustkrebszellen in der Bildung von aggressiven Tumorklonen mit Stammzell-ähnlichen Eigenschaften resultierte (Achuthan et al., 2011; Rizos et al., 2017).

Generell wird der seneszente Zustand, egal ob durch Telomerverkürzung (replikative Seneszenz), Onkogenaktivierung (OIS) oder durch Chemotherapie und Strahlung (TIS) verursacht, als irreversibel definiert (Di Leonardo et al., 1994; Hayflick and Moorhead, 1961; Serrano et al., 1997). Wie unter Abschnitt „6.6. Die Reversibilität von Seneszenz“ beschrieben wird diese Irreversibilität jedoch durchaus diskutiert und die Möglichkeit erwogen, dass seneszente Tumorzellen nach einer Chemotherapiebehandlung in einer Art Ruhezustand verharren und später wieder zu proliferieren beginnen und somit das Auftreten von Rezidiven verursachen (Beausejour et al., 2003; Chakradeo et al., 2016; Jackson et al., 2012; Wang et al., 2013). Insofern gibt es durchaus interessante Aspekte, die für die gezielte Induktion von Seneszenz als therapeutischen Ansatz zur Krebsbehandlung sprechen, allerdings müssen auch hierbei die Begleiterscheinungen und die negativen Effekte auf umliegende Zellen bedacht und noch weiter erforscht werden.

Es gibt erste therapeutische Ansätze, die auf das Metastasierungspotential des malignen Melanoms abzielen, indem mit Hilfe spezifischer Peptide die Dimerisierung von MIA verhindert und somit dessen Funktionalität inhibiert wird. Unter Verwendung des Peptids AR71 konnte *in vitro* sowohl eine Dimerisierung von MIA verhindert als auch eine Dissoziation von bereits bestehenden Dimeren bewirkt werden. Dabei deuten die Ergebnisse dieser Studien darauf hin, dass die Bindestelle von MIA für Strukturen der extrazellulären Matrix sowie Integrine erst durch die Dimerisierung gebildet werden. Zusätzlich konnte *in vivo* in einem Mausmodell eine reduzierte Metastasierungsrate nach Gabe des Peptids detektiert werden (Schmidt et al., 2013; Schmidt et al., 2012). MIA wurde außerdem bereits in mehreren Studien als potenter Serummarker für die Melanomprogression bei Patienten beschrieben (Bossert et al., 2000; Bossert et al., 1997; Riechers and Bossert, 2014). Daher stellt die Inhibierung von MIA ein sinniges therapeutisches Ziel bei der Behandlung von Melanompatienten dar. Bei der weiteren Entwicklung dieses therapeutischen Konzepts müssen allerdings die Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit beachtet werden, die darauf hindeuten, dass MIA neben den

protumorigenen Effekten in Melanomen durchaus auch eine Rolle bei der Aufrechterhaltung von Seneszenz in Melanozyten spielt, die als Schutzbarriere gegen die Tumorgenese fungiert. Ähnliche Vermutungen bezüglich des Verlusts des seneszenten Zustand wurden bereits bei der Verwendung von gezielten B-Raf^{V600E}-Inhibitoren wie Vemurafenib formuliert, konnten jedoch nicht bestätigt werden. Die Behandlung von Melanompatienten mit B-Raf-Inhibitoren (*targeted therapy*, siehe Abschnitt „2.1.5 Therapiemöglichkeiten des malignen Melanoms“) führt zu diversen Nebeneffekten wie entzündliche Dermatosen, Exanthemen oder Fotosensitivität, aber auch Keratoakanthome oder kutane Plattenepithelkarzinome (Gencler and Gonul, 2016; Sanlorenzo et al., 2014; Sosman et al., 2012). Zudem wurden in vereinzelt Fällen melanozytäre Hyperproliferationen und neue primäre Melanome entdeckt (Chapman et al., 2011; Dalle et al., 2011; Rinderknecht et al., 2013; Zimmer et al., 2012). Jedoch wurde bei allen genotypisch untersuchten Läsionen ein B-Raf-Wildtyp-Status festgestellt. Diese sekundären Neoplasien scheinen also durch die Transaktivierung von Wildtyp-B-Raf und der damit einhergehenden paradoxen Aktivierung des MAPK/ERK-Signalwegs zu entstehen und nicht durch die Überwindung des seneszenten Schutzmechanismus, der durch die *B-Raf^{V600E}*-Mutation entstanden ist.

7. Material

7.1. Allgemeine Materialien

AppliChem, Darmstadt, Deutschland	Nocodazol, Taxol
B. Braun Melsungen AG, Melsungen Deutschland	Aqua injectable, isotone Natriumchloridlösung (0,9 %), Braunol [®] , 2,0 ml, 5,0 ml und 10,0 ml Spritzen
Behrens, Hamburg, Deutschland	Agar für Bakterienkulturen
Bioline GmbH, Luckenwalde, Deutschland	MyTag [™] Extract-PCR Kit
Bio-Rad, München, Deutschland	Immun-Blot [™] PVDF Membran, Precision Plus Protein [™] Standards Kaleidoscope [™]
Biozym Scientific GmbH, Oldendorf, Deutschland	Biozym LE Agarose, Midori Green Advance
Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland	Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml)
Carl Roth GmbH + Co. Kg, Karlsruhe, Deutschland	Entsorgungsbeutel, Objektträger, Parafilm [®] M, PM-996, Rotilabo [®] -Blottingpapier, Dicke 1,5 mm, 2-Propanol (Isopropanol) (C ₃ H ₈ O), Milchpulver, Roti [®] Load 4x denaturierend, β-Mercaptoethanol, Deckgläser (18 mm rund aus Borosilikatglas)
Corning Incorporated, Corning, NY, USA	6-well, 24-well und 96-well Platten, T25, T75, T175 Zellkulturflaschen, 15 ml und 50 ml Reaktionsröhrchen (verschließbar), 10 cm Kulturschalen
Cell Signaling Technology, Danvers, USA	Senescence β-Galactosidase Staining Kit

Eppendorf, Hamburg, Deutschland	Combitips advanced® 1,0 ml und 10 ml, Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml
Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland	Operationsbesteck
Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm, Deutschland	dNTP Mastermix
Gibco, Grand Island, NY, USA	GlutaMAX™, Dispasepulver
Gilson, Inc. Middleton, USA	Pipetman Classic™ Pipetten
Invitrogen, Carlsbad, USA	Lipofectamin LTX™ & Plus™ Reagent, Lipofectamin RNAiMAX™ Reagent, SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kit
Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland	Glas-Objekträger
Life Technologies, Carlsbad, USA	Dispase, BCIP/NBT Substrate Kit
Lonza, Basel, Schweiz	MGM-4 Bullet Kit medium
Macherey-Nagel GmbH, Düren, Deutschland	Nucleo Bond® Xtra Midi Plus
Omega Bio-Tek, Inc, Norcross, USA	E.Z.N.A.® Total RNA Kit I, Homogenizer Mini Columns
PAN™ Biotech GmbH, Aldenbach, Deutschland	Fetales Kälberserum (FKS), Penicillin/Streptomycin
Paul Hartman AG, Heidenheim, Deutschland	Puderfreie Einmal-Untersuchungshandschuhe aus Nitril

Polysciences Europe GmbH, Hirschberg Deutschland	Aqua-Poly/Mount Mounting Media
PromoCell, Heidelberg, Deutschland	Melanocyte Growth Medium M2, Melanocyte Growth Medium M2 SupplementMix, Melanozyten
Roche Diagnostics, Mannheim Deutschland	Taq [®] -DNA Polymerase RNaseA, dN6 Primer, Polynukleotid Kinase, LightCycler [®] 480 SYBR green I Master, LightCycler [®] 480 Multiwell Plate 96, Taq [®] DNA Polymerase, Protease-Inhibitoren
Roth, Karlsruhe	Roti [®] Load 4x denaturierend, Ethanol
Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, USA	Polybrene [®] (sc-134220)
Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland	Pipettenspitzen 20 µl, 200 µl, 1000 µl, 15 ml und 50 ml Reaktionsröhrchen (verschließbar)
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim Deutschland	alle nicht aufgeführten Chemikalien in Pulverform in p.a. Qualität, Acrylamid 40 % Lösung, BSA, Trypsin, TEMED, Ampicillin (Amp), Penicillin/Streptomycin, DMSO, SDS, DTT, Tween-20, DAPI dye, Oligonukleotide, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), Fetal Bovine Serum (FBS), Glutaraldehyd, Roswell Park Memorial Institute Medium (RPMI-1640), Phosphate Buffered Saline (PBS), 3-Isobutyl-1- methylxanthine, Bovine Pituitary extract (BPE), sterile Insulinlösung, Catalase, Tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA/ PMA)
Takara Bio Inc., Shiga, Japan	SYBR [®] Premix Ex Taq [™] (Perfect Real-time)

Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA	CryoTubes™ “Mr. Frosty” Freezing Container, Superfrost Plus Objektträger, O’GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder, GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, BCA Protein Assay Kit
TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz	96-Well Platten für BCA-Messung, Zellschaber
VWR, Radnor, PA, USA	Ethanol (C ₂ H ₆ O), Spritzenvorsatzfilter Minisart NML (Porengröße: 0,45 µm, steril)
Whatman International Ltd., Maidstone, England	Whatman 3 MM Filterpapier

7.2. Geräte

Autoklaven	VE-120, Systec GmbH, Linden, Deutschland
Blotapparaturen	Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell, Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Brutschränke	CO ₂ Inkubator innova CO48, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA CO ₂ Inkubator Hera Cell 240, Heraeus, Hanau, Deutschland
ELISA-Reader	CLARIOstar, BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland
Farbkamera DP 80	DP 80, Olympus, Tokio, Japan
Gefrierbehälter	Mr. Frosty Cryo 1°C Freezing container Nalgene®, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Geldokumentationsanlagen	BioDoc Analyze, Analytic Jena AG, Jena, Deutschland

	Gel Print 2000i, MWG, Biotech, Ebersberg, Deutschland Transilluminator IL-200-K, H. Saur Laborbedarf, Reutlingen, Deutschland
Gelelektrophoreseapparaturen	Wide Mini Sub [®] Cell GT, Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Heiz- und Kühlblöcke	Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland HB-202, MB-102, BIOER, Hangzhou, China
Homogenisator	Precellys [®] 24, PeqLab Biotechnologies, GmbH, Erlangen, Deutschland
Mikroskope	AE2000, Motic, Hong Kong, China IX83 Fluoreszenzmikroskop, Olympus, Tokio, Japan CX31, Olympus, Tokio, Japan
NanoDrop	NanoDrop [®] ND-1000-UV/Vis Spektralphotometer, PeqLab Biotechnologies GmbH, Erlangen, Deutschland
pH-Meter	pH1000 L (pHenomenal [™]), VWR, Radnor, PA, USA
Pipetten	Pipetman (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl), Gilson, Middleton, WI, USA Multipette [®] Plus, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipettierhilfe	accu-jet [®] pro, Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland
Spannungsgeräte	BluePower [™] 500, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland

	Elektrophoresis Power Supply 1001, GE Healthcare, Chicago, IL, USA
	Elektrophoresis Power Supply 301, GE Healthcare, Chicago, IL, USA
	PowerPac Basic, Bio-Rad, Hercules, CA, USA
	PowerPac HC, Bio-Rad, Hercules, CA, USA
	Power Supply 200/2.0, Bio-Rad, Hercules, USA
Sterilwerkbanken	HeraSafe KS18, Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermocycler	Light Cycler® 480 II Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
	Light Cycler® II Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
	T3 Thermoblock, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Vortexer	VortexGenie2, Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Waagen	PB3000, AT201, Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz
Wasserbad	Julabo TW20, Julabo, Seelbach, Deutschland
xCELLigence/ RTCA	X-CELLigence RTCA DP Instruments, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Zentrifugen	Megafuge 1.0, Heraeus, Hanau, Deutschland
	Centrifuge 5810R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Centrifuge 5702, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Micro Star 17, VWR, Radnor, PA, USA
	Micro Star 17R, VWR, Radnor, PA, USA
	Rotina 420R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Mini-Tischzentrifuge Labnet, Edison, NJ, USA
 Mini-Tischzentrifuge Sprout™ Biozym, Hessisch
 Oldendorf, Deutschland
 Laborfuge 400 Heraeus, Hanau, Deutschland

7.3. Software

Blast®	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
cellSens Dimensions (Version 1.12)	Olympus, Tokio, Japan
GraphPad Prism 5.04 Software	GraphPad Software Inc., San Diego, USA
ImageJ (Version 1,50i)	National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA
xCELLigence/RTCA-Software	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

7.4. Bakterien

Für Transformationen von Plasmid-DNA wurden Epicurian Coli® XL2-Blue MRF⁺ ultrakompetente *Escherichia coli* Zellen (Stratagene, Heidelberg, Deutschland) sowie NEB 10-beta kompetente *E. coli* (High efficiency) (New England Biolabs, Ipswich, USA) verwendet.

7.5. Virale Vektoren und Viren

Die replikationsinkompetenten Lentiviren sowie der lentivirale Vektor pCLV-CMV-MIA-IRES-YFP-EF1a-Neo (MIA) für die Überexpression von MIA wurden von der Firma Sirion Biotech GmbH (Martinsried, Deutschland) erworben. Die lentiviralen Vektoren pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP (copGFP) und pCDH-CMV-BRAF-EF1-copGFP (B-RAF^{V600E}) wurden von Dr. Sebastian Haferkamp der Universität Würzburg (mittlerweile Universität Regensburg) zur Verfügung gestellt und als lentivirale Kontrolle beziehungsweise zur gezielten Überexpression von *B-Raf*^{V600E} genutzt. Das Hüllplasmid (186) pHIT G und das Helferplasmid (431) pCMVΔR8.2 stammen von Prof. Dr. Stephan Hahn (Abteilung für molekulare Gastroenterologie, Ruhr-Universität Bochum).

7.6. Primäre Zellen und Tumorzelllinien Säugerzelllinien

Mel Im	Humane Melanomzelllinie aus Melanommetastase
WM35	Humane Melanomzelllinie aus dem Primärtumor (ATCC-Nr.: CRL-2807)
Melanozyten	Normale humane epidermale Melanozyten (NHEM) von PromoCell, (Heidelberg, Deutschland) und Lonza (Basel, Schweiz)
HEK-293T	Humane embryonale Nierenzelllinie (Prof. Dr. Stephan Hahn, Abteilung für molekulare Gastroenterologie, Ruhr-Universität Bochum). (ATCC-Nr.: CRL-3216)
Mel-STV	immortalisierte Melanozytenzelllinie (Prof. Robert Weinberg, MIT Cambridge, USA), (Gupta et al., 2005)

7.7. Murine Gewebeproben

Alle murinen Gewebeproben wurden aus den in der Arbeitsgruppe gezüchteten Mauslinien isoliert.

7.8. Säugetiere

Tg(*Grm1*) Maus

Durch Einbringen eines Transgens aus der Sequenz des *Grm1*-Genes (mGluR1, metabotroper Glutamat-Rezeptor 1) unter Kontrolle des Dopachromtautomerase (*Dct*)-Promotors wurde die transgene Linie Tg(*Grm1*) EPv (im Folgenden Tg(*Grm1*) genannt) generiert (Pollock et al., 2003a). Diese Mäuse wurden unserer Arbeitsgruppe von Prof. Suzie Chen (Department of Chemical Biology, Rutgers University, Piscataway, USA) und Prof. Jürgen Becker (Fakultät für Biologie, Universität Duisburg-Essen, Deutschland) zu Verfügung gestellt.

MIA-Knockout Maus

Die MIA-defiziente Maus wurde die Insertion einer PGK/Neomycin-Kassette in Teile des Exon 2 sowie Exon 3 und 4 in das MIA-Gen generiert. Durch diese partielle Deletion des MIA-Gens kann kein aktives MIA-Protein mehr exprimiert werden (Moser et al., 2002).

7.9. Antikörper und rekombinante Proteine

Rekombinante Proteine:

Die Abkürzung „r“ steht für rekombinant.

Rekombinantes Protein	Stocklösung	Verdünnung	Hersteller
rMIA (human)	0.7 mg/ml	50 – 200 ng/ml	
bFGF/FGF-2 (human)	100 µg/ml	2,5 ng/ml	R&D Systems, Minneapolis, USA

Primäre Antikörper:

Antikörper	Anwendung	Verdünnung	Hersteller
MIA 7638 III	Western Blot	1:2000	BioGenes (Berlin)
p21 EPR3993	Western Blot	1:1000	Abcam
Ki-67	Immunfluoreszenz	1:100	BD
β-aktin	Western Blot	1:5000	Sigma-Aldrich

Sekundäre Antikörper:

Antikörper	Anwendung	Verdünnung	Hersteller
Anti-mouse AP	Western Blot	1:2000	Cell Signaling
Anti-rabbit AP	Western Blot	1:2000	Cell Signaling
Cy 3 PABO101	Immunfluoreszenz	1:500	Abnova/Biozol

Zudem wurde für das Anfärben der Zellkerne eine DAPI-Färbung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) durchgeführt.

7.10. Oligonukleotide

Primer für Genotypisierungen:

Gen	Primername	Nukleotidsequenz (forward/ reverse)
mMia/WT	MIA WT Allel anti	GCCACTTTTGATGGTTTGCTG
	MIA WT Allel sense	ATCCTATCTCCATGGCTGTGG
mMia/ko	MIA ko anti	CCCATCAGCCTCACCGTAGGT
	PGK-polyA down	CTGCTCTTTACTGAAGGCTCT
mMia2/Exon2	Mia2 Exon2	AGAGATTACACAGGACCCGAC CCTGCCACAAATCTTCTCTG
mGrm1(EPv)	EPV DCT prom2	TCAGGAGTGGAAGACAAGGAG
	EPV Grm1 rev4	CTTCACCTCAACACATCC

Primer für Expressionsanalysen:

Gen	Primername	Nukleotidsequenz (forward/ reverse)
β-aktin (human)	hβ-Act_735for	CTACGTCGCCCTGGACTTCGAGC
	hβ-Act_1119rev	GATGGAGCCGCGGATCCACACGG
β-aktin (murin)	mβ-Act_885for	TGGAATCCTGTGGCATCCATGAAAC
	mβ-Act_1233rev	TAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG
BRAF (human)	Braf for1597	GGGCTCCAGCTTGTATCAC
	Braf rev1880	GCATTCTGATGACTTCTGGTG
MIA (human)	MIA fw220	CATGCATGCGGTCCTATGCCCAAGCTG
	MIA rev544	GATAAGCTTTCCTGAGTAAATC

Gen	Primername	Nukleotidsequenz (forward/ reverse)
MIA (murin)	mMia1 for184 mMia1 rev391	CCAAGCTGGCTGACTGGAAG GCCAGGTCTCCATAGTAACC
p14/Arf (human)	p14/Arf for161 p14/Arf rev367	ATGGTGCGCAGGTTCTTGG CCCATCATCATGACCTGG
p15/INK4B (human)	p15/INK4B for 153 p15/INK4B rev 502	GGAAAAGCCCGGAGCTAACGACC GCACCTTCTCCACTAGTCCC
p15/INK4B (murin)	mp15/CDKN2B-574for mp15/CDKN2B_949rev	AGAGCAGGGCCACCGTGACA CCCCTGCAGCAGCAGCTTGT
p16/INK4A (human)	p16Ink4A_for218 p16Ink4A_rev498	GGAGCAGCATGGAGCCTTCGGC CCACCAGCGTGTCCAGGAAGC
p16/INK4A (murin)	mp16/INK4A_122for mp16/INK4A_382rev	AGGGCCGTGTGCATGACGTG CATCGCGCACATCCAGCCGA
p19/Arf (murin)	mp19/ARF_186for mp19/ARF_460rev	CCGGAGACCCAGGACAGCGA ATCGCGCACATCCCAGCCGAG
p21/CIP (human)	p21for92 p21rev379	CGAGGCACCGAGGCACTCAGAGG CCTGCCTCCTCCCAACTCATCCC
p21/CIP (murin)	Mm_p21 for Mm_p21 rev	GCTCATGGCGGGCTGTCTCC CCGGGGAATCTTCAGGCCGC
p27/KIP (human)	p27 for714 p27 rev 872	CTTGCCCGAGTTCTACTACAG TCAGTCTTTGGGTCCACCA
p27/KIP (murin)	mp27/KIP1_300for mp27/KIP1605rev	TCCCTGCGCCTCTCTTCCC CAGGCGGAAGGCTTGGGGTG

7.11. siRNA und siPool

Die eingesetzten siRNAs wurden von Qiagen (Hilden, Deutschland), die verwendeten siPool von der Firma siTools Biotech GmbH (Martinsried, Deutschland) synthetisiert

Bezeichnung	Zielsequenz
Si-Kontrolle (unspezifische siRNAs)	Nicht vom Hersteller angegeben
siMIA #7 (SI04268362)	GACAGACAAATGGGATTTCTA
siPool-Kontrolle	Nicht vom Hersteller angegeben
siPool MIA ID8190	Nicht vom Hersteller angegeben

7.12. Medien, Puffer und Lösungen

7.12.1. Medien zur Anzucht von Säugerzelle und Bakterien

Dulbecco´s Modified Eagle Medium DMEM und DMEM high glucose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim; Zusätze: 10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin
Dulbecco´s Phosphate Buffered Saline DPBS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RPMI (Roswell Park Memorial Institute)	RPMI (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), Zusätze: 10 % FKS, 1 % Pencillin/Streptomycin, 13,3 ml Natriumbicarbonat-Lösung (7,5 %)
Medium für humane Melanozyten MGM2	Melanocyte Growth Medium M2 mit Growth Medium M2 SupplementMix (PromoCell, Heidelberg)
MGM-4	MGM-4 Bullet Kit Medium bestehend aus MBM-4 Basal Medium (CC-3250) und MGM-4 SingleQuots Supplements (CC-4435) (Lonza, Basel, Schweiz)

Einfriermedium für humane Zelllinien	25 ml DMEM; Zusätze: 10 % FKS, 15 ml FKS, 5 (50 ml)ml DMSO
Medium 1 für primäre Mausmelanozyten (Vorkultur)	RPMI 1640 ohne L-Glutamine (PAA, Darthmouth, USA); Zusätze: 5 % FKS, 0,1 % Penicillin/Streptomycin, Amphotericin-B (1:500), Glutamax (200 mM), BPE (10 µg/ml), Catalase (100 U/ml), Insulin (10 µg/ml), bFGF (2,5 ng/ml)
Medium 2 für primäre Mausmelanozyten	RPMI 1640 ohne L-Glutamine(PAA, Darthmouth, USA; Zusätze: 5 % FKS, 0,1 % Penicillin/Streptomycin, Amphotericin-B (1:500), Glutamax (200 mM), BPE (10 µg/ml), Catalase (100 U/ml), Insulin (10 µg/ml), TPA (35 ng/ml), 3-Isobutyl-1-methylxanthine (23 ng/ml)
Stopp-Medium	RPMI 1640 ohne L-Glutamine (PAA, Darthmouth, USA; Zusätze: 10 % FKS, 0,1 % Penicillin/Streptomycin, Amphotericin-B (1:500
Trypsin/EDTA-Lösung	0,05 % Trypsin, 0,02 % EDTA, ad PBS
Lysogeny Broth (LB) Medium	Trypton (10g/l), Hefeextrakt (5g/l), NaCl (10 g/l); zur Selektion kann Ampicillin hinzugefügt werden (100 µg/ml)
LB-Medium in Petrischalen	LB-Medium, 15 g/l Agar; zur Selektion kann Ampicillin hinzugefügt werden (100 µg/ml)
Amphotericin-B Stammlösung	250 µg/ml, steril, Lagerung bei -20°C
Penicillin/Streptomycin Stammlösung	steril, Lagerung bei -20°C

7.12.2. Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese

TAE (50x)	1 M Tris/Acetat (pH 8,0), 50 mM EDTA
Agarosegel	1-3 % Agarose, gelöst in 1x TAE
DNA-Ladepuffer	0,25 % Bromphenolblau, 40 % Saccharose, 0,25 % Xylencyanol

Puffer zur Herstellung von Gesamtprotein-Extrakten (RIPA)

RIPA-Puffer	50 mM Tris/HCl (pH 7,5); 150 mM NaCl, 1 % Nonidet®P40, 0,5 % Natriumdesoxycholat, 0,1 % SDS, 10 ml Proteaseinhibitoren (Roche Diagnostics, Mannheim)
-------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Puffer und Gele für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Laufpuffer für SDS-PAGE	25 mM Tris/HCl (pH 8,5), 200 mM Glycin, 0,1 % SDS
Sammelgel (4 %)	375 µl Acrylamid (40 % Stammlösung), 450 µl Tris/HCl (1 M, pH 6,8), 2,85 ml H ₂ O, 37,5 µl SDS (40 % Stammlösung), 25 µl APS, 3,5 µl TEMED
Trenngel (15 %)	375 ml Acrylamid (40 % Stammlösung), 3,75 ml Tris/HCl (1 M, pH 8,8), 2,35 ml H ₂ O, 100 µl SDS (40 % Stammlösung), 50 µl APS, 10 µl TEMED
SDS-PAGE Probenpuffer	Roti®-Load 1 (4x) denaturierend, Roth

Puffer und Lösungen für die Western Blot Analyse

Blotpuffer	50 ml Methanol, 1,5 g Tris/HCl (pH 8,5), 7,1 g Glycin, ddH ₂ O ad 500 ml
TBS (10-fach)	50 mM Tris/HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl

TBS-T (0,1 %)	100 ml TBS (10-fach), 900 ml ddH ₂ O, 1 ml (0,1 %) Tween [®] 20
Blockingpuffer	3 % BSA/PBS oder 5 % Milchpulver/TBS-T
Entwickler	BCIP/NBT Kit (Invitrogen): 1ml Lösung A, 1 ml Lösung B, 8 ml Lösung ddH ₂ O

Sonstige Lösungen und Puffer

1x PBS pH 7,4 (steril)	PAA, Dartmouth, USA
10x PBS pH 7,4	80 g/l NaCl, 1 g/l KCl, Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄
RNAse A	10 mM Tris/HCl pH 7,0, 10 mg/ml RNAse A (Roche Diagnostics, Mannheim)

8. Methoden

8.1. Arbeiten mit *Escherichia coli*

8.1.1. Transformation von *E.coli*

Die kompetenten Bakterien (siehe „7.4 Bakterien“) wurden auf Eis aufgetaut. Im Anschluss wurden 0,1 bis 0,3 µl Vektoren-DNA (je nach Konzentration des Plasmids) zu 100 µl der kompetenten Bakterien gegeben. Dieser Ansatz wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und durch gelegentliches Schnippen durchmischt. Um die Bakterienmembran durchlässiger für DNA zu machen, erfolgte danach ein Hitzeschock auf 42°C für 60 bis 75 Sekunden, um die Bakterien anschließend wieder 60 Sekunden auf Eis zu lagern. Nach der Zugabe von 500 µl LB-Medium wurde der Ansatz eine Stunde auf 37° C geschüttelt. Die transformierten Bakterien wurden bei 3000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Bakterienpellet wurde in der Restflüssigkeit gelöst, 50 µl davon auf einer LB-Selektionsplatte aufgetragen und mit einem Drigalskispatel ausplattiert. Die LB-Platten wurden für 16 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

8.1.2. Kultivierung von *E. coli*

Escherichia coli wurden nach einer Transformation sowohl auf festen LB-Nährböden als auch in LB-Flüssigmedium kultiviert. Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide trugen ein Resistenzgen gegen das Antibiotikum Ampicillin, wodurch die transformierten Bakterien durch das Nährmedium, dem dieses Antibiotikum zugesetzt wurde, selektioniert werden konnten. Die LB-Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank und die der Flüssigkulturen bei 37°C und 250 rpm in einem Schüttler inkubiert.

8.1.3. Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde für diese Arbeit eine Midipräparation durchgeführt. Dafür wurden 50 ml LB-Flüssigkultur mit Ampicillin versetzt und 200 µl Bakteriensuspension einer Vorkultur hinzugefügt. Dieser Ansatz wurde über Nacht in einem Bakterienschüttler bei 37°C gehalten. Die Plasmidisolierung erfolgte am nächsten Tag mit dem Nucleo Bond® Xtra Midi Plus-Kit von Macherey-Nagel GmbH nach Angaben des beiliegenden Protokolls.

8.2. Molekularbiologische Methoden

8.2.1. Isolierung von genomischer DNA aus murinen Geweben

Die Isolierung von genomischer DNA aus murinem Gewebe erfolgte unter Verwendung des MyTag™ Extract-PCR Kit der Firma Bioline GmbH. Dabei wurde die genomische DNA stets zur Genotypisierung von Mäusen genutzt und erfolgte aus Schwanzspitzen der Mäuse.

8.2.2. Isolierung von RNA aus Zellen und Mausgewebe

Die Isolation von RNA aus Zellen und Mausgewebe erfolgte mit dem E.Z.N.A.® Total RNA Kit I der Firma Omega Bio-Tek nach den Angaben des Herstellers. Zur Gewinnung von RNA aus murinem Gewebe wurden diese mit dem Precellys® 24 Homogenisator und dem Precellys Keramik-Kit (PeqLab Biotechnologies GmbH, Erlangen) mechanisch zerkleinert. Zur Vorreinigung der Suspension wurde diese anschließend über Homogenizer Mini Columns (Omega Bio-Tek, Inc, Norcross, USA) bei 10000 rpm für 5 Minuten laufen gelassen. Aus dem gewonnenen Eluat erfolgte die Isolierung der murinen RNA. Die RNA wurde mit 40 µl ddH₂O eluiert. Ähnlich wurde bei konfluent wachsenden Zellen vorgegangen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, entweder mit Trypsin/EDTA Lösung oder mit einem Zellschaber von der Oberfläche der Kulturschale gelöst und bei 3000 rpm für 5 Minuten pelletiert. Die RNA-Isolierung erfolgte aus dem Pellet analog zur Isolierung von RNA aus murinem Gewebe.

8.2.3. Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA

Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA und RNA erfolgte am NanoDrop® 1000 UV/Vis der Firma PeqLab Biotechnologies GmbH.

8.2.4. Reverse Transkription von RNA (RT)

Für die Umschreibung von RNA in cDNA wurden in dieser Arbeit stets 500 ng RNA genutzt und in folgendem Ansatz eingesetzt:

Menge	Reaktionskomponente
4 µl	5x First strand buffer
2 µl	DTT (0,1 M)
1 µl	dN6 Primer (2 mg/ml)
1 µl	dNTPs (jeweils 10 mM)

Dieser Reaktionsansatz wurde mit ddH₂O auf 19 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Reaktionslösung wurde für 5 Minuten auf 70°C erhitzt und vor Zugabe der Superscript II Reverse Transkriptase (Invitrogen) auf 50°C abgekühlt. Die reverse Transkription erfolgte für eine Stunde bei 37°C. Um das Enzym zu inaktivieren, wurden die Proben anschließend 10 Minuten lang auf 70°C erhitzt. Um restliche RNA zu entfernen, wurde 1 µl RNase A zugegeben und 20 Minuten auf 37°C gehalten. Für die Langzeitaufbewahrung wurde die cDNA bei -20°C gelagert.

8.2.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde in dieser Arbeit für die Genotypisierung von Mäusen genutzt.

Mit spezifischen Primern (siehe „7.10. Oligonukleotide“) konnte so festgestellt werden, ob es sich um MIA Wildtyp oder um *Knockout*-Mäuse handelt. Die Ansätze erfolgten in einem Gesamtvolumen von 20 µl und mit folgender Zusammensetzung:

Menge	Reaktionskomponente
0,2 µl	Primer forward (20 µM)
0,2 µl	Primer reverse (20 µM)
2,0 µl	PCR-Puffer (10x)
0,2 µl	dNTPs (je Nukleotid 10 mM)
15,2 µl	ddH ₂ O
0,2 µl	Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)
2,0 µl	genomische DNA

Die PCR erfolgte im Thermocycler T3 von Biometra (Göttingen, Deutschland). Bei den in dieser Arbeit verwendeten Primern wurde stets die gleiche Annealing-Temperatur von 60°C verwendet.

Programm	Temperatur	Zeit
1. Initiale Denaturierung	94°C	60 sec
2. Denaturierung	95°C	30 sec
3. Primer-Annealing	60°C	30 sec
4. Elongation	72°C	30-60 sec
5. Finale Elongation	72°C	5 min
6. Abkühlung	4°C	∞

Die Schritte 2. bis 4. wurden im Thermocycler in 35 Amplifikationszyklen wiederholt und die Proben bezüglich ihrer Größe mittels Agarose-Gelelektrophorese (siehe „8.2.6. Agarose-Gelelektrophorese“) untersucht.

8.2.6. Agarose-Gelelektrophorese

Für die Agarose-Gelelektrophorese wurden je nach Größe der DNA-Fragmente 1 bis 1,5 mg Agarose in 100 ml 1x TAE-Puffer aufgekocht, nach kurzem Abkühlen mit 5µl Midori Green Advance (Biozym Scientific GmbH, Oldendorf) versetzt und in die vorbereiteten Gelkammern gegossen. Die DNA-Proben wurden mit 10x Auftragspuffer (siehe „7.12.2. Puffer und Lösungen“) versetzt und nach dem Aushärten des Gels aufgetragen. Die Auftrennung der Proben erfolgte durch das Anlegen einer konstanten Spannung von 120 Volt für 20 bis 30 Minuten. Da die DNA negativ geladen ist, wandern die Fragmente zum positiven Pol. Durch Anregung mit UV-Licht (245 nm) und unter Abgleich eines ebenfalls aufgetragenen Größendstandards (GeneRuler™ Plus DNA Ladder von Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) konnte die genau Fragmentgröße ermittelt werden.

8.2.7. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Um die relative Expressionsrate von Genen zu bestimmen, wurde eine qRT-PCR am LightCycler®480 (Roche Diagnostics GmbH) durchgeführt. In jedem Lauf wurde zusätzlich ein sogenanntes Haushaltsgen aufgetragen, um Schwankungen zu normalisieren. Als Referenzgen wurde dabei stets β -Aktin gewählt.

Für jedes Zielgen wurde ein Reaktionsansatz mit folgender Zusammensetzung pipettiert:

Menge	Reaktionskomponente
8,0 µl	ddH ₂ O
0,5 µl	spezifischer Primer (forward)
0,5 µl	spezifischer Primer (reverse)
10 µl	LightCycler®480 SYBR Green I Master
1,0 µl	cDNA

Die eingesetzten Primer wurden dabei so gewählt, dass sie ein Hybridisierungsoptimum von 60°C besitzen. Die Messtemperatur wurde für jedes Primerpaar spezifisch ermittelt und vor das Lauf in das LightCycler®480-Programm eingegeben. Im Folgenden wird der Reaktionsablauf im LightCycler®480 dargestellt:

Programm	Temperatur	Zeit	Rampe	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	10 min	4,4°C/s	1
Amplifikation	95°C	10 s	4,4°C/s	45
Annealing	60°C	10 s	2,2°C/s	
Amplifikation	72°C	20 s	4,4°C/s	
Messung	Spezifische Messtemperatur	1 s	4,4°C/s	
Schmelzkurve	95°C	5 s	4,4°C/s	1
	60°C	1 min	2,2°C/s	
	97°C		0,11°C/s	
Abkühlung	40°C	30 s	2,2°C/s	1

8.3. Proteinbiochemische Methoden

8.3.1. Herstellung von Gesamtproteinextrakten

Um Gesamtproteinextrakte aus konfluent wachsenden Zellen zu erhalten, wurde diese mit PBS gewaschen und mit einem Zellschaber von der Oberfläche der Kulturschale gelöst. Nach

einer fünfminütigen Zentrifugation bei 3000 rpm wurde der Überstand dekantiert und das Zellpellet je nach Dicke des Zellpellets in 100 bis 200 µl RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay)-Puffer (7.12.2) resuspendiert. Die Proben wurden im Anschluss bei 4°C für 15 Minuten geschüttelt und 10 Minuten bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die im Überstand enthaltenen Proteine wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C eingefroren.

8.3.2. Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten

Die Bestimmung der Konzentration von Proteinlysaten erfolgte mit dem BCA-Protein-Assay Kit von Thermo Fisher Scientific entsprechend der Angaben des Herstellers. Dabei wurden sowohl von den Proben als auch von der mitgeführten BSA-Standardreihe 5 µl eingesetzt und eine Doppelbestimmung durchgeführt. Nach der Zugabe von 200 µl BCA-Lösung (50 Teile Reagent A und 1 Teil Reagent B) wurden die Proben bei Raumtemperatur inkubiert bis ein Farbumschlag erkennbar war. Die Vermessung der Proben erfolgte am CLARIOstar (BMG Labtech).

8.3.3. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Soweit nicht gesondert angegeben, wurden 100 µg G Proteinextrakt mit 4x Roti-Load Probenpuffer (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und für 10 Minuten bei 70°C aufgekocht. Durch die Denaturierung der Proteine können diese mit der SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese aufgrund ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Dies erfolgte für diese Arbeit stets mit 15%igen Polyacrylamid Gelen (7.12.2) und 0,8 mA/cm². Als Referenz wurde der Standard Precision Plus Protein™ Standard Kaleidoscope™ (Bio-Rad, CA, USA) aufgetragen.

8.3.4. Western Blot

Nach der Gelelektrophorese wurden die SDS-Polyacrylamidgele 15 Minuten in Blotpuffer (7.12.2) vorinkubiert, während parallel dazu eine PVDF-Membran in der gleichen Größe erst 5 Minuten in Methanol *p.a.* und anschließend 5 Minuten ebenfalls in Blotpuffer äquilibriert wurde. Das Blotting vom Gel auf die PVDF-Membran erfolgte mit einer Blotkammer (Bio-Rad, Wide Mini Sub® Cell GT) für 45 Minuten bei konstanten 15 Volt und 400 mA.

Im Anschluss wurden unspezifische Bindungsstellen der PVDF-Membran durch Verwendung einer Blockierlösung (3 % BSA in PBS) abgesättigt. Die Inkubation in der Blockierlösung erfolgte stets eine Stunde lang bei Raumtemperatur. Die Blockierlösung wurde daraufhin mit dem primären Antikörper (7.9) in geeigneter Konzentration versetzt und bei 4°C unter leichtem Schütteln über Nacht gelagert. Vor und nach der Inkubation mit dem AP-konjugiertem sekundären Antikörper (7.9) in PBS wurde die Membran dreimal mit PBS gewaschen. Die

Entwicklung der Western Blots erfolgte mit einer BCIP/NBT-Lösung (Life Technologies, CA, USA)

8.3.5. Densitometrie

Zur Quantifizierung von Western Blots wurde das Programm Image J® (NIH, Bethesda, USA) verwendet.

8.3.6. Immunfluoreszenz

Für den Protein-Nachweis mittels Immunfluoreszenz-Analyse wurden 1/3 aller NHEM aus einem 6-Well auf 4 runde 18 mm Deckgläschen von Carl-Roth (P233.1) in 12-Well Platte ausgesät und 24 Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach 15-minütigem Fixieren mit 4 % Paraformaldehyd erfolgte ein Waschschrift in der 12-Well Platte mit 1x PBS. Für alle folgenden Schritte wurden die auf den Deckgläsern ausgesäten Zellen auf einen 50 µl Tropfen Inkubationslösung aufgelegt und alle Waschschriffe wurden in Tauchbädern vollzogen. Nach jeder Inkubation wurde dreimal mit PBS gewaschen. So erfolgte die gleichzeitige Permeabilisierung und Blockierung der Zellen durch 30-minütige Inkubation mit 0,1 % Triton-X-100 in 1 % BSA/PBS und daraufhin die Primär- und Sekundärantikörperinkubation jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur. Zudem wurde für das Anfärben der Zellkerne eine DAPI-Färbung (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, D9564) durchgeführt (Verdünnung: 1:1000 aus 1 mg/ml Stocklösung in 3 % BSA/PBS). Nach dem folgenden Waschvorgang wurde noch einmal mit autoklaviertem Wasser gewaschen. Unmittelbar danach wurden die Deckgläser mit den Zellen nach unten auf einen Tropfen Aqua Poly/Mount der Firma Polysciences Europe GmbH (Hirschberg), der auf einem mit Ethanol gereinigten Objektträger vorgelegt wurde, aufgelegt und sanft angedrückt. Die Auswertung der Fluoreszenzfärbung erfolgte unter Verwendung des Mikroskops IX83 der Firma Olympus (Tokio, Japan) mit folgenden Filterwürfeln:

Filterwürfel	Anregungsfilter	Emmisionsfilter
DAPI (blau)	325 – 375 nm	435 – 485 nm
GFP (grün)	450 – 490 nm	500 – 550 nm
Cy3 (rot)	533 – 559 nm	570 – 640 nm

8.4. Zellkulturmethoden

8.4.1. Kultivierung von humanen Zelllinien

Die verwendeten Zellen sind unter Abschnitt „7.6. Primäre Zellen und Tumorzelllinien Säugerzelllinien“ mit Angaben zur Herkunft aufgelistet. Die Melanomzelllinien Mel Im und WM35 sowie die immortale Melanozytenzelllinie Mel-STV wurden stets in DMEM (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/ Streptomycin bei 37°C in 8 % CO₂ gehalten. Hek293T-Zellen wurden mit DMEM (high glucose) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/ Streptomycin bei 37°C in 5 % CO₂ kultiviert. Normale humane epidermale Melanozyten wurden je nach Ursprungsfirma mit dem entsprechenden Medium behandelt (Melanozyten Medium MGM2 (PromoCell) oder MGM-4 (Lonza)) und bei 37°C in 5 % CO₂ gehalten. Die Passagierungen erfolgten nach einmaligem Waschen mit 1x PBS durch die Zugabe einer Trypsin/EDTA Lösung. Nach Ablösen aller Zellen durch diese Lösung wurde Medium mit FKS zugegeben, die Zellen darin aufgenommen und bei 1200 rpm für 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und im gewünschten Verhältnis auf neue Zellkulturflaschen verteilt. Bei Melanozyten wurde das Medium einmal in der Woche durch frisches ersetzt.

8.4.2. Isolierung und Kultivierung von Melanozyten aus neugeborenen Mäusen

Die Isolierung von Melanozyten aus Mäusen erfolgte aus 4 bis 10 Tieren. Die maximal 3 Tage alten Tiere wurden durch Dekapitation getötet und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten. Um die Mäuse zu waschen und zu sterilisieren wurden unter der Sterilbank je eine Petrischale mit Braunol[®], PBS, 70 % EtOH und noch einmal PBS vorbereitet. Darin wurden die Mäuse jeweils eine Minute gewaschen, bevor ihnen nach Abtrennung der Gliedmaßen die Haut abgezogen wurde. Die Haut wurde über Nacht in Dispaselösung (Life Technologies) (5 mg/ml in PBS, sterilfiltriert) geschwenkt. Am nächsten Tag erfolgte die Trennung von Epidermis und Dermis mit sterilen Pinzetten. Die Dermis wurde verworfen, wohingegen die Epidermis mit dem Stratum Corneum nach oben in 6-Well Platten ausgebreitet wurden. Zum Ablösen der Zellen aus dem Gewebeverband wurde 1 ml Trypsin/EDTA (0,025 % Trypsin in 0,02 % EDTA/PBS) unter die Epidermisschicht gespritzt und diese bei 37°C für 5 Minuten inkubiert. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte mit 2 ml Stopp-Medium (7.12.1). Nach Überführung der vereinzelter Zellen in 15 ml Falcons wurden diese bei 1200 rpm 4 Minuten lang zentrifugiert. Nach Resuspension des Zellpellets in 10 ml Melanozytenmedium 1 (7.12.1) wurde die noch gemischte Zellepopulation in T75 ausgesät und dort 3 bis 5 Tage kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen durch selektives Trypsinieren (1 Minute bei 37°C) von den Keratinozyten getrennt, abgelöst und in 5 ml Stopp-Medium aufgenommen und zentrifugiert (4

Minuten bei 1200 rpm). Dabei wurden die Zellen von jeweils zwei T75-Flaschen vereint. Das Pellet wurde in 2 ml Kulturmedium 2 (7.12.1) aufgenommen und in ein 6-Well ausgesät. Der Mediumwechsel erfolgte einmal pro Woche, wobei nur 2/3 des Mediums erneuert wurden. Das Protokoll zur Isolierung von primären murinen Melanozyten aus neugeborenen Mäusen wurde von Dr. Sebastian Franken (Institut für Biochemie und Molekulare Biologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt und leicht modifiziert (Sedlmaier et al., 2011).

8.4.3. Einfrieren und Auftauen von murinen und humanen Zellen

Zum Einfrieren von humanen oder murinen Zellen wurde eine volle T75-Flasche verwendet. Die Zellen wurden hierzu abtrypsinisiert und das Pellet in 5 ml entsprechendes Medium aufgenommen. Ab diesem Zeitpunkt erfolgten alle Schritte auf Eis. 900 µl kaltes Einfriermedium wurde in Cryoröhrchen vorgelegt und im Anschluss 900 µl der Zellsuspension zugegeben. Die Medien wurden sanft vermischt und im Mr. Frosty (siehe „7.2. Geräte“) platziert. Dieser wurde über Nacht bei -80°C gelagert und die Zellen am nächsten Tag für die Langzeitlagerung bei -150°C aufbewahrt.

8.4.4. Transiente Transfektion von Zellkulturzellen

Die Transfektion von Melanomzellen bzw. Melanozyten mit siRNAs erfolgte mit dem RNAiMAX Transfektionsreagenz der Firma Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Die Transfektion von Zellen mit Plasmiden wurde mit Lipofectamin™ LTX & Plus™ Reagent (Invitrogen) durchgeführt. In beiden Fällen wurden 80.000 bis 200.000 Zellen in ihren entsprechenden Kulturmedien ausgesät und am nächsten Tag mit 40 nM siRNA (20 µM Stocklösung) bzw. mit der angegebenen Menge an Plasmid DNA nach Angaben des Herstellers transfiziert. Falls nicht anders angegeben erfolgte die Isolierung von RNA und die Gesamtproteinanalyse nach 96 Stunden Inkubation.

8.4.5. Transduktion von humanen Melanozyten

Das Protokoll zur Transduktion von Zellkulturzellen wurde von Prof. Dr. Stephan Hahn (Abteilung für molekulare Gastroenterologie, Ruhr-Universität Bochum) zur Verfügung gestellt und leicht modifiziert (Baraniskin et al., 2013).

Die Herstellung der Viren erfolgte stets direkt vor der Transduktion mit gleichem Ablauf. Dabei wurden 2 Millionen Hek293T-Zellen an Tag 1 in 10 cm Kulturschalen (Corning Incorporated, Corning, USA) in 10 ml DMEM (high Glukose) ausgesät. Am selben Tag wurden auch 200.000 humane Melanozyten auf je ein Well einer 6-Well Kulturschale in jeweils 2 ml Melanozytenmedium MGM-4 (Lonza) ausgesät. Am nächsten Tag erfolgte die Transfektion der Hek293T-Zellen mit 6 µg envelope Plasmid (186) pHIT G, 12 µg helper Plasmid (431)

pCMV Δ R8.2 und 12 μ g packaging Plasmid (für MIA: pCLV-CMV-MIA-IRES-YFP-EF1a-Neo; für BRAF^{V600E}: pCDH-CMV-BRAF-EF1-copGFP) mit Hilfe des LipofectaminTM LTX & PlusTM Reagent. Als interne Kontrolle wurde ein Mock-Lentivirus mitgeführt (pCDH-CMV-MCS-EF1-copGFP). Ab Zugabe des Transfektionsansatzes mussten die Zellen unter S2-Sicherheitsbedingungen gehalten werden. An Tag 3 erfolgte am Morgen ein Mediumwechsel der Hek293T-Zellen auf das Melanozyten-Medium. Dabei wurden nur 7 ml frisches Medium zugegeben, um die Viren in möglichst wenig Medium zu konzentrieren. Am nächsten Tag, ebenfalls morgens, wurde die Transduktion der Zielzellen durchgeführt. Dabei wurde das Melanozytenmedium von den Hek293T-Zellen in eine 10 ml Spritze aufgenommen, durch einen 0,45 μ m-Filter gefiltert, mit 1,5 μ l Polybrene (Endkonzentration: 1 μ g/ μ l) versetzt und auf die an Tag 1 ausgesäten primären Melanozyten gegeben. 6 Stunden später erfolgte ein erneuter Mediumwechsel mit frischem unbehandeltem Melanozytenmedium. Wenn im Experiment angegeben, erfolgte die Behandlung mit dem siRNA Pool gegen MIA und einer siPool-Kontrolle an Tag 5 wie unter Abschnitt „8.4.4. Transiente Transfektion von Zellkulturzellen“ angegeben für 6 Stunden. Nach erneutem Mediumwechsel wurden die Zellen bis zur weiteren Verwendung (RNA-Isolierung, RTCA, Immunfluoreszenz, WB) im Brutschrank kultiviert. Die anschließenden Versuche wurden stets 7 Tage nach der Transduktion unter S1-Bedingungen durchgeführt.

8.4.6. Nachweis von seneszenten Zellen (SA- β -Galaktosidase-Färbung)

Der Nachweis von seneszenten Zellen mit Hilfe der Seneszenz-assoziierten- β -Galactosidase erfolgte mit dem Senescence β -Galactosidase Staining Kit von Cell Signaling Technology. Dabei wurden die Zellen 2- bis 3-mal mit PBS gewaschen bevor sie mit der Fixative Solution für 10 Minuten auf Raumtemperatur fixiert wurden. Der folgende Ansatz der Staining Solution wurde für ein 6-Well berechnet:

Menge	Komponente
837 μ l	ddH ₂ O
93 μ l	10x Staining Solution
10 μ l	Staining Supplement A
10 μ l	Staining Supplement B
50 μ l	X-Gal (20 mg)

1 ml Staining Solution wurde über Nacht bei 37° auf den Zellen inkubiert und am nächsten Tag dreimal mit PBS abgewaschen. Im Anschluss wurden die blau gefärbten Zellen am Mikroskop ausgezählt und deren prozentualer Anteil im Verhältnis zum Gesamtzellzahl ermittelt.

8.4.7. Messung von Proliferation mittels xCELLience/RTCA

In dieser Arbeit wurde das Proliferationsverhalten von isolierten, murinen Melanozyten (siehe „8.4.2. Isolierung und Kultivierung von Melanozyten aus neugeborenen Mäusen“) mittels xCELLience/RTCA-System untersucht. Die Proliferationsmessung fand dabei in E-Plates (Acea Biosciences, San Diego, USA) statt, die anfangs mit je 100 µl Medium 2 für Mausmelanozyten (vergleiche 7.12.1) befüllt und bei 37°C und 5 % CO₂ äquilibriert wurden. Die Zwischenräume der E-Plates wurden mit autoklaviertem Wasser aufgefüllt, um einer Verdunstung des Mediums vorzubeugen. Nach der Äquilibration und einer Hintergrundmessung der E-Plates wurden 4000 murine Melanozyten in 100 µl Medium 2 in die Wells pipettiert. Dabei wurden je Probe 4 Wells belegt. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 5 Tagen und in folgenden Intervallen:

200 Messwerte im Intervall von 2 Minuten

115 Messwerte im Intervall von 60 Minuten

Zudem wurde mit dem xCELLience/RTCA-System ebenfalls das Proliferationsverhalten von MIA-transduzierten NHEM und der entsprechenden copGFP Kontrolle ermittelt. Die Durchführung der Versuche erfolgte wie oben beschrieben. Dabei wurde MGM-4 (Lonza, Basel, Schweiz) als Melanozytenmedium verwendet und die Proliferation mit 6000 Zellen in Triplets bestimmt. Die Messung erfolgte ebenfalls über 5 Tage und in folgenden Intervallen:

200 Messwerte im Intervall von 2 Minuten

100 Messwerte im Intervall von 15 Minuten

100 Messwerte im Intervall von 60 Minuten

Die Auswertung des Proliferationsverhaltens der Zellen erfolgte mit der xCELLience/RTCA-Software (Roche).

8.5. Arbeiten mit Mäusen

8.5.1. Zucht- und Haltungsbedingungen

Alle in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden in konventioneller Haltung nach den Richtlinien der Zentralen Tierlaboratorien der Universität Regensburg bzw. der Universität Nürnberg-Erlangen gezüchtet und versorgt.

Der Hell-Dunkel-Wechsel erfolgte im Zwölf-Stunden Rhythmus bei konstant 22°C. Die Gabe von Wasser und Standard-Pelletfutter erfolgte *ad libitum*. Die Zucht erfolgte nach den Empfehlungen des tierärztlichen Dienstes der Universität Regensburg. Das Mindestalter bei Zuchtbeginn betrug 60 Tage.

8.5.2. Genotypisierung der Mäuse

Grm1-transgene Mäuse

Wie unter Abschnitt „8.2.1. Isolierung von genomischer DNA aus murinen Geweben“ beschrieben wurde die genomische DNA aus einer 2 mm großen Schwanzspitze isoliert und anschließend mittels Quantitativer Real-time PCR (8.2.7) ermittelt, ob es sich bei den Mäusen um hetero- oder homozygote Träger des *Grm1*-Transgens handelt. Dabei wurden spezifische Primer verwendet (mGrm1(EPV), siehe „7.10. Oligonukleotide“) und die qRT-PCR wie unter Abschnitt „8.2.7. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)“ beschrieben am LightCycler®480 (Roche Diagnostics GmbH) durchgeführt. Als Referenz-Gen wurde hierbei ein spezifischer Primer gegen MIA2 (mMia2/Exon2, siehe „7.10. Oligonukleotide“) verwendet. Bei jedem Lauf wurde mindestens eine bekannte Positivkontrolle mitgeführt, um einen internen Abgleich zu ermöglichen. Diese wurde als Referenz auf 1 gesetzt und das Verhältnis der zu untersuchenden Proben berechnet. Homozygote Tiere zeigten ein Verhältnis von 0,75 bis 1,0, wohingegen heterozygote Mäuse ein Verhältnis zwischen 0,25 und 0,75 aufwiesen. Alle Tiere mit Werten unterhalb von 0,25 wurden als Wildtyp-Mäuse bewertet.

Mia-Knockout Mäuse

Für die Genotypisierung von Mia-defizienten Tieren wurde ebenfalls die genomische DNA der Tiere aus der Schwanzspitze isoliert. Die anschließende PCR erfolgte stets wie unter Abschnitt „8.2.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)“ beschrieben. Dabei wurden etablierte Primer verwendet (mMIA/WT und mMIA/ko, siehe „7.10. Oligonukleotide“), um Wildtypiere und *Knockout*-Mäuse unterscheiden zu können. Durch eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe „8.2.6. Agarose-Gelelektrophorese“) konnte anhand der spezifischen Banden Mia-defiziente von Mia-Wildtyp-Mäusen unterschieden werden.

8.6. Statistik

Statistische Auswertungen wurden mittels der GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) durchgeführt. Alle Experimente wurden in mindestens zwei unabhängigen Versuchen wiederholt und die Ergebnisse als Mittelwert beziehungsweise prozentualer Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Signifikanzberechnungen zwischen einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des Student's t-Test oder dem One-Way Anova-Test durchgeführt. *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant.

9. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
*	signifikant
°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AKT	= PKB, Proteinkinase B
ALM	akral-lentigöses Melanom
APS	Ammoniumpersulfat
ARF	alternative reading frame (siehe CDKN2A)
A-Raf	V-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog 1
ATM	ataxia telangiectasia mutated
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3 related
Bax	Bcl2-associated X protein
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl2	B-cell lymphoma 2
B-Raf	V-raf murine sarcoma virus oncogene homolog B1
BSA	bovine serum albumin
ca.	circa
CDK	cyclin-dependent kinase
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	complementary DNA
CD-RAP	cartilage-derived retinoic acid sensitive protein
CIP1	CDK-interacting protein 1, siehe p21
copGFP	copepod green fluorescent protein
c-Rel	REL proto-oncogene, NF-κB subunit
CTLA-4	cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4

DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dd	doppelt destilliert
DDR	DNA Damage Response
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DTT	Dithiothreitol
E	Extinktion
EDTA	ethylene diamine tetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ERK	extracellular-signal regulated kinase
et al.	et alii
FKS	fetales Kälberserum
g	Gramm
gDNA	genomische DNA
GEO	Plattform Gene Expression Omnibus
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Grm1	metabotroper Glutamat-Rezeptor 1
GSE	gene set enrichments
h	Stunde
Hm	siehe Xmerk
HMGB1	high-mobility-group-protein B1
H-Ras	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
HRP	Horseradish Peroxidase
IL	Interleukin

INK4A	Inhibitor of cyclin-dependent kinase 4a (siehe CDKN2A)
INK4B	Inhibitor of cyclin-dependent kinase 4b (siehe p15)
IP3	Inositoltrisphosphat
kb	Kilobase
kg	Kilogramm
KIP1	Kinase inhibitory protein 1, siehe p27
K-Ras	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
Ktrl.	Kontrolle
l	Liter
LB	Lysogeny Broth Medium
LMM	Lentigo-maligna-Melanom
M	Molar
mA	Milliamper
MAP	mitogen-activated protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDM	murine double minute
MEK	= MAPKK, mitogen-activated protein kinase kinase
mg	Milligramm
MGM	Melanocyte Growth Medium
MIA	Melanoma Inhibitory Activity
MiDAS	mitochondrial dysfunction-associated senescence
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrix-Metalloprotease
mRNA	messenger RNA
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NF- κ B1	nuclear factor kappa B subunit 1 (p50)

NF-κB2	nuclear factor kappa B subunit 2 (p52)
ng	Nanogramm
NHEM	normale humane epidermale Melanozyten
NIH	National Institute of Health
NM	noduläres Melanom
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NONO	non-POU domain containing octamer binding, siehe p54
N-Ras	Neuroblastoma rat sarcoma viral oncogene homolog
ns	nicht signifikant
OIS	Onkogen-induzierte Seneszenz
OTOR	otoraplin, fibrocyte-derived protein
p14	p14 ^{ARF} , siehe ARF und CDKN2A
p15	p15 ^{Ink4b}
p16	p16 ^{Ink4a} , siehe INK4A und CDKN2A
p19	murines Homolog zu p14
p21	p21 ^{Cip1, Waf1} , siehe CIP1 und WAF1 sowie CDKN1A
p27	p27 ^{Kip1}
p53	tumor protein p53
p54	p54 ^{nrb} , siehe NONO
p.a.	pro analysi
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PD-1	programmed cell death protein 1
PD-L 1	programmed cell death ligand 1
pH	potentia Hydrogenii
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog

PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative real time polymerase chain reaction
Raf	rat fibrosarcoma
Raf-1	V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
Ras	rat sarcoma
Rb	Retinoblastom
rel.	relativ
RelA	RELA proto-oncogene, NF- κ B subunit (p65)
RelB	RELB proto-oncogene, NF- κ B subunit (
RGP	radial growth phase, radiale Wachstumsphase
RIPA	Radio-immunoprecipitation assay
rMIA	rekombinantes MIA
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	reactive oxygen species
rpm	revolutions per minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RTCA	Real Time Cell Analyzer
SA- β -Gal	Seneszenz-assoziiertes β -Galactosidase
SAHF	Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci
SASP	Seneszenz-assoziiertes sekretorischer Phänotyp
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SEM	standard error of the mean
SH3	Src homology 3
siRNA	small interfering RNA
SSM	superfiziell spreitendes Melanom
t	time
TAE	Tris-Acetat-EDTA

TANGO	transport and Golgi organization protein 1, MIA3
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethyldiamin
TERT	Telomerase-Reverse-Transkriptase
Tg	Transgen
TGFβ	transforming growth factor β
TIS	Therapie-induzierte Seneszenz
TLR	toll like receptor
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
Tris/HCl	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan/Wasserstoffchlorid
u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
V	Volt
VE	vollentsalzt
VGP	vertical growth phase, vertikale Wachstumsphase
vs.	versus
w/o	without
WAF1	wild-type p53-activated factor, siehe p21
WB	Western Blot
Xmerk	Xiphophorus melanoma receptor kinase
YBX1	Y-box binding protein 1
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

10. Literaturverzeichnis

- Abildgaard, C., and P. Guldberg. 2015. Molecular drivers of cellular metabolic reprogramming in melanoma. *Trends Mol Med.* 21:164-171.
- Achuthan, S., T.R. Santhoshkumar, J. Prabhakar, S.A. Nair, and M.R. Pillai. 2011. Drug-induced senescence generates chemoresistant stemlike cells with low reactive oxygen species. *J Biol Chem.* 286:37813-37829.
- Acosta, J.C., A. Banito, T. Wuestefeld, A. Georgilis, P. Janich, J.P. Morton, D. Athineos, T.W. Kang, F. Lasitschka, M. Andrulis, G. Pascual, K.J. Morris, S. Khan, H. Jin, G. Dharmalingam, A.P. Snijders, T. Carroll, D. Capper, C. Pritchard, G.J. Inman, T. Longerich, O.J. Sansom, S.A. Benitah, L. Zender, and J. Gil. 2013. A complex secretory program orchestrated by the inflammasome controls paracrine senescence. *Nat Cell Biol.* 15:978-990.
- Acosta, J.C., and J. Gil. 2009. A role for CXCR2 in senescence, but what about in cancer? *Cancer Res.* 69:2167-2170.
- Acosta, J.C., A. O'Loghlen, A. Banito, M.V. Guijarro, A. Augert, S. Raguz, M. Fumagalli, M. Da Costa, C. Brown, N. Popov, Y. Takatsu, J. Melamed, F. d'Adda di Fagagna, D. Bernard, E. Hernando, and J. Gil. 2008. Chemokine signaling via the CXCR2 receptor reinforces senescence. *Cell.* 133:1006-1018.
- Adameyko, I., F. Lallemand, J.B. Aquino, J.A. Pereira, P. Topilko, T. Muller, N. Fritz, A. Beljajeva, M. Mochii, I. Liste, D. Usoskin, U. Suter, C. Birchmeier, and P. Ernfors. 2009. Schwann cell precursors from nerve innervation are a cellular origin of melanocytes in skin. *Cell.* 139:366-379.
- Al-Kaisy, A.A., and A. Salih Sahib. 2005. Role of the antioxidant effect of vitamin e with vitamin C and topical povidone-iodine ointment in the treatment of burns. *Annals of burns and fire disasters.* 18:19-30.
- Alberts, B. 2002. Molecular biology of the cell. Garland Science, New York. xxxiv, 1548 pages pp.
- Alcorta, D.A., Y. Xiong, D. Phelps, G. Hannon, D. Beach, and J.C. Barrett. 1996. Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:13742-13747.
- Alimonti, A., C. Nardella, Z. Chen, J.G. Clohessy, A. Carracedo, L.C. Trotman, K. Cheng, S. Varmeh, S.C. Kozma, G. Thomas, E. Rosivatz, R. Woscholski, F. Cognetti, H.I. Scher, and P.P. Pandolfi. 2010. A novel type of cellular senescence that can be enhanced in mouse models and human tumor xenografts to suppress prostate tumorigenesis. *J Clin Invest.* 120:681-693.
- Alonso, S.R., P. Ortiz, M. Pollan, B. Perez-Gomez, L. Sanchez, M.J. Acuna, R. Pajares, F.J. Martinez-Tello, C.M. Hortelano, M.A. Piris, and J.L. Rodriguez-Peralto. 2004. Progression in cutaneous malignant melanoma is associated with distinct expression profiles: a tissue microarray-based study. *Am J Pathol.* 164:193-203.
- Ancrile, B., K.H. Lim, and C.M. Counter. 2007. Oncogenic Ras-induced secretion of IL6 is required for tumorigenesis. *Genes Dev.* 21:1714-1719.
- Anna, B., Z. Blazej, G. Jacqueline, C.J. Andrew, R. Jeffrey, and S. Andrzej. 2007. Mechanism of UV-related carcinogenesis and its contribution to nevi/melanoma. *Expert Rev Dermatol.* 2:451-469.
- Apfel, R., F. Lottspeich, J. Hoppe, C. Behl, G. Durr, and U. Bogdahn. 1992. Purification and analysis of growth regulating proteins secreted by a human melanoma cell line. *Melanoma Res.* 2:327-336.
- Arndt, S., and A.K. Bosserhoff. 2006. TANGO is a tumor suppressor of malignant melanoma. *Int J Cancer.* 119:2812-2820.
- Arndt, S., C. Melle, K. Mondal, G. Klein, F. von Eggeling, and A.K. Bosserhoff. 2007. Interactions of TANGO and leukocyte integrin CD11c/CD18 regulate the migration of human monocytes. *J Leukoc Biol.* 82:1466-1472.

- Auer, K.L., J.S. Park, P. Seth, R.J. Coffey, G. Darlington, A. Abo, M. McMahon, R.A. Depinho, P.B. Fisher, and P. Dent. 1998. Prolonged activation of the mitogen-activated protein kinase pathway promotes DNA synthesis in primary hepatocytes from p21Cip-1/WAF1-null mice, but not in hepatocytes from p16INK4a-null mice. *Biochem J.* 336 (Pt 3):551-560.
- Baksh, K., and J. Weber. 2015. Immune checkpoint protein inhibition for cancer: preclinical justification for CTLA-4 and PD-1 blockade and new combinations. *Semin Oncol.* 42:363-377.
- Bandyopadhyay, D., N. Timchenko, T. Suwa, P.J. Hornsby, J. Campisi, and E.E. Medrano. 2001. The human melanocyte: a model system to study the complexity of cellular aging and transformation in non-fibroblastic cells. *Exp Gerontol.* 36:1265-1275.
- Baraniskin, A., S. Nopel-Dunnebacke, M. Ahrens, S.G. Jensen, H. Zollner, A. Maghnouj, A. Wos, J. Mayerle, J. Munding, D. Kost, A. Reinacher-Schick, S. Liffers, R. Schroers, A.M. Chromik, H.E. Meyer, W. Uhl, S. Klein-Scory, F.U. Weiss, C. Stephan, I. Schwarte-Waldhoff, M.M. Lerch, A. Tannapfel, W. Schmiegell, C.L. Andersen, and S.A. Hahn. 2013. Circulating U2 small nuclear RNA fragments as a novel diagnostic biomarker for pancreatic and colorectal adenocarcinoma. *Int J Cancer.* 132:E48-57.
- Bartkova, J., J. Lukas, P. Guldborg, J. Alsner, A.F. Kirkin, J. Zeuthen, and J. Bartek. 1996. The p16-cyclin D/Cdk4-pRb pathway as a functional unit frequently altered in melanoma pathogenesis. *Cancer Res.* 56:5475-5483.
- Bataille, V., H. Snieder, A.J. MacGregor, P. Sasieni, and T.D. Spector. 2000. Genetics of risk factors for melanoma: an adult twin study of nevi and freckles. *J Natl Cancer Inst.* 92:457-463.
- Bauer, J., and C. Garbe. 2003. Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. *Pigment Cell Res.* 16:297-306.
- Bauer, R., M. Humphries, R. Fassler, A. Winklmeier, S.E. Craig, and A.K. Bosserhoff. 2006. Regulation of integrin activity by MIA. *J Biol Chem.* 281:11669-11677.
- Beausejour, C.M., A. Krtolica, F. Galimi, M. Narita, S.W. Lowe, P. Yaswen, and J. Campisi. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 22:4212-4222.
- Bennett, D.C. 2016. Genetics of melanoma progression: the rise and fall of cell senescence. *Pigment Cell Melanoma Res.* 29:122-140.
- Bevona, C., W. Goggins, T. Quinn, J. Fullerton, and H. Tsao. 2003. Cutaneous melanomas associated with nevi. *Arch Dermatol.* 139:1620-1624; discussion 1624.
- Bianchi-Smiraglia, A., B.C. Lipchick, and M.A. Nikiforov. 2017. The Immortal Senescence. *Methods Mol Biol.* 1534:1-15.
- Bissell, M.J., and D. Radisky. 2001. Putting tumours in context. *Nat Rev Cancer.* 1:46-54.
- Blesch, A., A.K. Bosserhoff, R. Apfel, C. Behl, B. Hessdoerfer, A. Schmitt, P. Jachimczak, F. Lottspeich, R. Buettner, and U. Bogdahn. 1994. Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA. *Cancer Res.* 54:5695-5701.
- Bodnar, A.G., M. Ouellette, M. Frolkis, S.E. Holt, C.P. Chiu, G.B. Morin, C.B. Harley, J.W. Shay, S. Lichtsteiner, and W.E. Wright. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science.* 279:349-352.
- Bosserhoff, A.K. 2005. Melanoma inhibitory activity (MIA): an important molecule in melanoma development and progression. *Pigment Cell Res.* 18:411-416.
- Bosserhoff, A.K., B. Echtenacher, R. Hein, and R. Buettner. 2001. Functional role of melanoma inhibitory activity in regulating invasion and metastasis of malignant melanoma cells in vivo. *Melanoma Res.* 11:417-421.
- Bosserhoff, A.K., A. Hauschild, R. Hein, D. Schadendorf, E. Stockfleth, T. Bogenrieder, M. Landthaler, R. Buettner, and W. Stolz. 2000. Elevated MIA serum levels are of relevance for management of metastasized malignant melanomas: results of a German multicenter study. *J Invest Dermatol.* 114:395-396.
- Bosserhoff, A.K., R. Hein, U. Bogdahn, and R. Buettner. 1996. Structure and promoter analysis of the gene encoding the human melanoma-inhibiting protein MIA. *J Biol Chem.* 271:490-495.

- Bosserhoff, A.K., M. Kaufmann, B. Kaluza, I. Bartke, H. Zirngibl, R. Hein, W. Stolz, and R. Buettner. 1997. Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma. *Cancer Res.* 57:3149-3153.
- Bosserhoff, A.K., M. Moser, and R. Buettner. 2004. Characterization and expression pattern of the novel MIA homolog TANGO. *Gene Expr Patterns.* 4:473-479.
- Bosserhoff, A.K., M. Moser, R. Hein, M. Landthaler, and R. Buettner. 1999. In situ expression patterns of melanoma-inhibiting activity (MIA) in melanomas and breast cancers. *J Pathol.* 187:446-454.
- Bosserhoff, A.K., M. Moser, J. Scholmerich, R. Buettner, and C. Hellerbrand. 2003a. Specific expression and regulation of the new melanoma inhibitory activity-related gene MIA2 in hepatocytes. *J Biol Chem.* 278:15225-15231.
- Bosserhoff, A.K., R. Stoll, J.P. Sleeman, F. Bataille, R. Buettner, and T.A. Holak. 2003b. Active detachment involves inhibition of cell-matrix contacts of malignant melanoma cells by secretion of melanoma inhibitory activity. *Lab Invest.* 83:1583-1594.
- Brenner, M., K. Degitz, R. Besch, and C. Berking. 2005. Differential expression of melanoma-associated growth factors in keratinocytes and fibroblasts by ultraviolet A and ultraviolet B radiation. *Br J Dermatol.* 153:733-739.
- Brown, J.P., W. Wei, and J.M. Sedivy. 1997. Bypass of senescence after disruption of p21CIP1/WAF1 gene in normal diploid human fibroblasts. *Science.* 277:831-834.
- Campisi, J. 2005a. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell.* 120:513-522.
- Campisi, J. 2005b. Suppressing cancer: the importance of being senescent. *Science.* 309:886-887.
- Campisi, J., and F. d'Adda di Fagagna. 2007. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:729-740.
- Carrieri, G., E. Marzi, F. Olivieri, F. Marchegiani, L. Cavallone, M. Cardelli, S. Giovagnetti, R. Stecconi, C. Molendini, C. Trapassi, G. De Benedictis, D. Kletsas, and C. Franceschi. 2004. The G/C915 polymorphism of transforming growth factor beta1 is associated with human longevity: a study in Italian centenarians. *Aging Cell.* 3:443-448.
- Carvalho, L., M. Lipay, F. Belfort, I. Santos, J. Andrade, A. Haddad, F. Brunstein, and L. Ferreira. 2006. Telomerase activity in prognostic histopathologic features of melanoma. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 59:961-968.
- Castiglioni, A., V. Canti, P. Rovere-Querini, and A.A. Manfredi. 2011. High-mobility group box 1 (HMGB1) as a master regulator of innate immunity. *Cell Tissue Res.* 343:189-199.
- Catalgol, B. 2012. Chapter 8 - Proteasome and Cancer. *In Progress in Molecular Biology and Translational Science.* Vol. 109. T. Grune, editor. Academic Press. 277-293.
- Chakradeo, S., L.W. Elmore, and D.A. Gewirtz. 2016. Is Senescence Reversible? *Curr Drug Targets.* 17:460-466.
- Chandler, H., and G. Peters. 2013. Stressing the cell cycle in senescence and aging. *Curr Opin Cell Biol.* 25:765-771.
- Chang, B.D., Y. Xuan, E.V. Broude, H. Zhu, B. Schott, J. Fang, and I.B. Roninson. 1999. Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. *Oncogene.* 18:4808-4818.
- Chapman, P.B., A. Hauschild, C. Robert, J.B. Haanen, P. Ascierto, J. Larkin, R. Dummer, C. Garbe, A. Testori, M. Maio, D. Hogg, P. Lorigan, C. Lebbe, T. Jouary, D. Schadendorf, A. Ribas, S.J. O'Day, J.A. Sosman, J.M. Kirkwood, A.M. Eggermont, B. Dreno, K. Nolop, J. Li, B. Nelson, J. Hou, R.J. Lee, K.T. Flaherty, G.A. McArthur, and B.-S. Group. 2011. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 364:2507-2516.
- Chatterjee, M., C. Rancso, T. Stuhmer, N. Eckstein, M. Andrulis, C. Gerecke, H. Lorentz, H.D. Royer, and R.C. Bargou. 2008. The Y-box binding protein YB-1 is associated with progressive disease and mediates survival and drug resistance in multiple myeloma. *Blood.* 111:3714-3722.
- Chien, Y., C. Scuoppo, X. Wang, X. Fang, B. Balgley, J.E. Bolden, P. Premsrirut, W. Luo, A. Chicas, C.S. Lee, S.C. Kogan, and S.W. Lowe. 2011. Control of the senescence-

- associated secretory phenotype by NF-kappaB promotes senescence and enhances chemosensitivity. *Genes Dev.* 25:2125-2136.
- Christiansen, S.A., S. Khan, and G.T. Gibney. 2017. Targeted Therapies in Combination With Immune Therapies for the Treatment of Metastatic Melanoma. *Cancer J.* 23:59-62.
- Ciampi, R., and Y.E. Nikiforov. 2007. RET/PTC rearrangements and BRAF mutations in thyroid tumorigenesis. *Endocrinology.* 148:936-941.
- Cohen-Salmon, M., D. Frenz, W. Liu, E. Verpy, S. Voegeling, and C. Petit. 2000. Fdp, a new fibrocyte-derived protein related to MIA/CD-RAP, has an in vitro effect on the early differentiation of the inner ear mesenchyme. *J Biol Chem.* 275:40036-40041.
- Collado, M., and M. Serrano. 2006. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer.* 6:472-476.
- Cong, Y.S., J. Wen, and S. Bacchetti. 1999. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet.* 8:137-142.
- Coppe, J.P., P.Y. Desprez, A. Krtolica, and J. Campisi. 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol.* 5:99-118.
- Coppe, J.P., C.K. Patil, F. Rodier, Y. Sun, D.P. Munoz, J. Goldstein, P.S. Nelson, P.Y. Desprez, and J. Campisi. 2008. Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. *PLoS Biol.* 6:2853-2868.
- Costin, G.E., and V.J. Hearing. 2007. Human skin pigmentation: melanocytes modulate skin color in response to stress. *FASEB J.* 21:976-994.
- d'Adda di Fagagna, F. 2008. Living on a break: cellular senescence as a DNA-damage response. *Nat Rev Cancer.* 8:512-522.
- d'Adda di Fagagna, F., P.M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N.P. Carter, and S.P. Jackson. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature.* 426:194-198.
- Dai, C.Y., and G.H. Enders. 2000. p16 INK4a can initiate an autonomous senescence program. *Oncogene.* 19:1613-1622.
- Dalle, S., N. Poulalhon, and L. Thomas. 2011. Vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 365:1448-1449; author reply 1450.
- Damsky, W., G. Micevic, K. Meeth, V. Muthusamy, D.P. Curley, M. Santhanakrishnan, I. Erdelyi, J.T. Platt, L. Huang, N. Theodosakis, M.R. Zaidi, S. Tighe, M.A. Davies, D. Dankort, M. McMahon, G. Merlino, N. Bardeesy, and M. Bosenberg. 2015. mTORC1 activation blocks BrafV600E-induced growth arrest but is insufficient for melanoma formation. *Cancer Cell.* 27:41-56.
- Damsky, W.E., and M. Bosenberg. 2017. Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship. *Oncogene.* 36:5771-5792.
- Dankort, D., D.P. Curley, R.A. Cartlidge, B. Nelson, A.N. Karnezis, W.E. Damsky, Jr., M.J. You, R.A. DePinho, M. McMahon, and M. Bosenberg. 2009. Braf(V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma. *Nat Genet.* 41:544-552.
- Davies, H., G.R. Bignell, C. Cox, P. Stephens, S. Edkins, S. Clegg, J. Teague, H. Woffendin, M.J. Garnett, W. Bottomley, N. Davis, E. Dicks, R. Ewing, Y. Floyd, K. Gray, S. Hall, R. Hawes, J. Hughes, V. Kosmidou, A. Menzies, C. Mould, A. Parker, C. Stevens, S. Watt, S. Hooper, R. Wilson, H. Jayatilake, B.A. Gusterson, C. Cooper, J. Shipley, D. Hargrave, K. Pritchard-Jones, N. Maitland, G. Chenevix-Trench, G.J. Riggins, D.D. Bigner, G. Palmieri, A. Cossu, A. Flanagan, A. Nicholson, J.W. Ho, S.Y. Leung, S.T. Yuen, B.L. Weber, H.F. Seigler, T.L. Darrow, H. Paterson, R. Marais, C.J. Marshall, R. Wooster, M.R. Stratton, and P.A. Futreal. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature.* 417:949-954.
- de Jel, M.M., J.C. Engelmann, M. Kunz, S. Schiffner, S. Kuphal, and A.K. Bosserhoff. 2014. Transcriptome sequencing of melanocytic nevi and melanomas from Grm1 transgenic mice to determine melanoma driver mutations. *Pigment Cell Melanoma Res.* 27:678-680.
- Demaria, M., M.N. O'Leary, J. Chang, L. Shao, S. Liu, F. Alimirah, K. Koenig, C. Le, N. Mitin, A.M. Deal, S. Alston, E.C. Academia, S. Kilmarx, A. Valdovinos, B. Wang, A. de Bruin,

- B.K. Kennedy, S. Melov, D. Zhou, N.E. Sharpless, H. Muss, and J. Campisi. 2017. Cellular Senescence Promotes Adverse Effects of Chemotherapy and Cancer Relapse. *Cancer Discov.* 7:165-176.
- Demaria, M., N. Ohtani, S.A. Youssef, F. Rodier, W. Toussaint, J.R. Mitchell, R.M. Laberge, J. Vijg, H. Van Steeg, M.E. Dolle, J.H. Hoeijmakers, A. de Bruin, E. Hara, and J. Campisi. 2014. An essential role for senescent cells in optimal wound healing through secretion of PDGF-AA. *Dev Cell.* 31:722-733.
- Dhillon, A.S., S. Hagan, O. Rath, and W. Kolch. 2007. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene.* 26:3279-3290.
- Dhomen, N., J.S. Reis-Filho, S. da Rocha Dias, R. Hayward, K. Savage, V. Delmas, L. Larue, C. Pritchard, and R. Marais. 2009. Oncogenic Braf induces melanocyte senescence and melanoma in mice. *Cancer Cell.* 15:294-303.
- Di Leonardo, A., S.P. Linke, K. Clarkin, and G.M. Wahl. 1994. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G1 arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. *Genes Dev.* 8:2540-2551.
- Di Micco, R., M. Fumagalli, A. Cicalese, S. Piccinin, P. Gasparini, C. Luise, C. Schurra, M. Garre, P.G. Nuciforo, A. Bensimon, R. Maestro, P.G. Pelicci, and F. d'Adda di Fagagna. 2006. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature.* 444:638-642.
- Dietz, U.H., and L.J. Sandell. 1996. Cloning of a retinoic acid-sensitive mRNA expressed in cartilage and during chondrogenesis. *J Biol Chem.* 271:3311-3316.
- Duncan, L.M. 2009. The classification of cutaneous melanoma. *Hematol Oncol Clin North Am.* 23:501-513, ix.
- Dunn, K.L., P.S. Espino, B. Drobic, S. He, and J.R. Davie. 2005. The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling. *Biochem Cell Biol.* 83:1-14.
- Elwood, J.M., and J. Jopson. 1997. Melanoma and sun exposure: an overview of published studies. *Int J Cancer.* 73:198-203.
- Erickson, C.A., and T.L. Goins. 1995. Avian neural crest cells can migrate in the dorsolateral path only if they are specified as melanocytes. *Development.* 121:915-924.
- Ershler, W.B., and E.T. Keller. 2000. Age-associated increased interleukin-6 gene expression, late-life diseases, and frailty. *Annu Rev Med.* 51:245-270.
- Fedorenko, I.V., G.T. Gibney, and K.S. Smalley. 2013. NRAS mutant melanoma: biological behavior and future strategies for therapeutic management. *Oncogene.* 32:3009-3018.
- Freund, A., A.V. Orjalo, P.Y. Desprez, and J. Campisi. 2010. Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. *Trends Mol Med.* 16:238-246.
- Freund, A., C.K. Patil, and J. Campisi. 2011. p38MAPK is a novel DNA damage response-independent regulator of the senescence-associated secretory phenotype. *EMBO J.* 30:1536-1548.
- Friedrich, S., and K. Kraywinkel. 2018. Faktenblatt: Epidemiologie des malignen Melanoms in Deutschland. *Der Onkologe.* 24:447-452.
- Gandini, S., F. Sera, M.S. Cattaruzza, P. Pasquini, D. Abeni, P. Boyle, and C.F. Melchi. 2005. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer.* 41:28-44.
- Garnett, M.J., and R. Marais. 2004. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. *Cancer Cell.* 6:313-319.
- Garnier, J.P., S. Letellier, B. Cassinat, C. Lebbe, D. Kerob, M. Baccard, P. Morel, N. Basset-Seguin, L. Dubertret, B. Bousquet, K. Stoitchkov, and T. Le Bricon. 2007. Clinical value of combined determination of plasma L-DOPA/tyrosine ratio, S100B, MIA and LDH in melanoma. *Eur J Cancer.* 43:816-821.
- Gartel, A.L., and A.L. Tyner. 1999. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res.* 246:280-289.
- Gencler, B., and M. Gonul. 2016. Cutaneous Side Effects of BRAF Inhibitors in Advanced Melanoma: Review of the Literature. *Dermatol Res Pract.* 2016:5361569.
- Gedes, J., H. Lemke, H. Baisch, H.H. Wacker, U. Schwab, and H. Stein. 1984. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 133:1710-1715.

- Giacinti, C., and A. Giordano. 2006. RB and cell cycle progression. *Oncogene*. 25:5220-5227.
- Gilmore, T.D. 2006. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 25:6680-6684.
- Giuliano, S., M. Ohanna, R. Ballotti, and C. Bertolotto. 2011. Advances in melanoma senescence and potential clinical application. *Pigment Cell Melanoma Res*. 24:295-308.
- Glaeszl, A., A.K. Bosserhoff, R. Buettner, U. Hohenleutner, M. Landthaler, and W. Stolz. 1999. Increase in telomerase activity during progression of melanocytic cells from melanocytic naevi to malignant melanomas. *Arch Dermatol Res*. 291:81-87.
- Goel, V.K., N. Ibrahim, G. Jiang, M. Singhal, S. Fee, T. Flotte, S. Westmoreland, F.S. Haluska, P.W. Hinds, and F.G. Haluska. 2009. Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. *Oncogene*. 28:2289-2298.
- Goldstein, S., E.J. Moerman, S. Fujii, and B.E. Sobel. 1994. Overexpression of plasminogen activator inhibitor type-1 in senescent fibroblasts from normal subjects and those with Werner syndrome. *J Cell Physiol*. 161:571-579.
- Gray-Schopfer, V.C., S.C. Cheong, H. Chong, J. Chow, T. Moss, Z.A. Abdel-Malek, R. Marais, D. Wynford-Thomas, and D.C. Bennett. 2006. Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16? *Br J Cancer*. 95:496-505.
- Grichnik, J.M., A.L. Ross, S.L. Schneider, M.I. Sanchez, M.S. Eller, and K.E. Hatzistergos. 2014. How, and from which cell sources, do nevi really develop? *Exp Dermatol*. 23:310-313.
- Griewank, K.G., R. Murali, J.A. Puig-Butille, B. Schilling, E. Livingstone, M. Potrony, C. Carrera, T. Schimming, I. Moller, M. Schwamborn, A. Sucker, U. Hillen, C. Badenas, J. Malvehy, L. Zimmer, A. Scherag, S. Puig, and D. Schadendorf. 2014. TERT promoter mutation status as an independent prognostic factor in cutaneous melanoma. *J Natl Cancer Inst*. 106.
- Grimaldi, A.M., E. Simeone, and P.A. Ascierto. 2015. Vemurafenib plus cobimetinib in the treatment of mutated metastatic melanoma: the CoBRIM trial. *Melanoma Manag*. 2:209-215.
- Guba, M., A.K. Bosserhoff, M. Steinbauer, C. Abels, M. Anthuber, R. Buettner, and K.W. Jauch. 2000. Overexpression of melanoma inhibitory activity (MIA) enhances extravasation and metastasis of A-mel 3 melanoma cells in vivo. *Br J Cancer*. 83:1216-1222.
- Gupta, P.B., C. Kuperwasser, J.P. Brunet, S. Ramaswamy, W.L. Kuo, J.W. Gray, S.P. Naber, and R.A. Weinberg. 2005. The melanocyte differentiation program predisposes to metastasis after neoplastic transformation. *Nat Genet*. 37:1047-1054.
- Haenssle, H.A., U. Krueger, C. Vente, K.M. Thoms, H.P. Bertsch, M. Zutt, A. Rosenberger, C. Neumann, and S. Emmert. 2006. Results from an observational trial: digital epiluminescence microscopy follow-up of atypical nevi increases the sensitivity and the chance of success of conventional dermoscopy in detecting melanoma. *J Invest Dermatol*. 126:980-985.
- Haferkamp, S., T.M. Becker, L.L. Scurr, R.F. Kefford, and H. Rizos. 2008. p16INK4a-induced senescence is disabled by melanoma-associated mutations. *Aging Cell*. 7:733-745.
- Haferkamp, S., A. Borst, C. Adam, T.M. Becker, S. Motschenbacher, S. Windhovel, A.L. Hufnagel, R. Houben, and S. Meierjohann. 2013. Vemurafenib induces senescence features in melanoma cells. *J Invest Dermatol*. 133:1601-1609.
- Hara, E., R. Smith, D. Parry, H. Tahara, S. Stone, and G. Peters. 1996. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol*. 16:859-867.
- Harper, J.W., G.R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S.J. Elledge. 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell*. 75:805-816.
- Harrison, S.L., R.M. MacKie, and R. MacLennan. 2000. Development of melanocytic nevi in the first three years of life. *J Natl Cancer Inst*. 92:1436-1438.

- Haugstetter, A.M., C. Loddenkemper, D. Lenze, J. Grone, C. Standfuss, I. Petersen, B. Dorken, and C.A. Schmitt. 2010. Cellular senescence predicts treatment outcome in metastasised colorectal cancer. *Br J Cancer*. 103:505-509.
- Hayflick, L., and P.S. Moorhead. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*. 25:585-621.
- Heidenreich, B., E. Nagore, P.S. Rachakonda, Z. Garcia-Casado, C. Requena, V. Traves, J. Becker, N. Soufir, K. Hemminki, and R. Kumar. 2014. Telomerase reverse transcriptase promoter mutations in primary cutaneous melanoma. *Nat Commun*. 5:3401.
- Hellerbrand, C., T. Amann, J. Schlegel, P. Wild, F. Bataille, T. Spruss, A. Hartmann, and A.K. Bosserhoff. 2008. The novel gene MIA2 acts as a tumour suppressor in hepatocellular carcinoma. *Gut*. 57:243-251.
- Herbig, U., M. Ferreira, L. Condel, D. Carey, and J.M. Sedivy. 2006. Cellular senescence in aging primates. *Science*. 311:1257.
- Hernandez-Segura, A., T.V. de Jong, S. Melov, V. Guryev, J. Campisi, and M. Demaria. 2017. Unmasking Transcriptional Heterogeneity in Senescent Cells. *Curr Biol*. 27:2652-2660 e2654.
- Hernandez-Segura, A., J. Nehme, and M. Demaria. 2018. Hallmarks of Cellular Senescence. *Trends Cell Biol*. 28:436-453.
- Herranz, N., and J. Gil. 2018. Mechanisms and functions of cellular senescence. *J Clin Invest*. 128:1238-1246.
- Hodi, F.S., S.J. O'Day, D.F. McDermott, R.W. Weber, J.A. Sosman, J.B. Haanen, R. Gonzalez, C. Robert, D. Schadendorf, J.C. Hassel, W. Akerley, A.J. van den Eertwegh, J. Lutzky, P. Lorigan, J.M. Vaubel, G.P. Linette, D. Hogg, C.H. Ottensmeier, C. Lebbe, C. Peschel, I. Quirt, J.I. Clark, J.D. Wolchok, J.S. Weber, J. Tian, M.J. Yellin, G.M. Nichol, A. Hoos, and W.J. Urba. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 363:711-723.
- Hodis, E., I.R. Watson, G.V. Kryukov, S.T. Arold, M. Imielinski, J.P. Theurillat, E. Nickerson, D. Auclair, L. Li, C. Place, D. Dicara, A.H. Ramos, M.S. Lawrence, K. Cibulskis, A. Sivachenko, D. Voet, G. Saksena, N. Stransky, R.C. Onofrio, W. Winckler, K. Ardlie, N. Wagle, J. Wargo, K. Chong, D.L. Morton, K. Stemke-Hale, G. Chen, M. Noble, M. Meyerson, J.E. Ladbury, M.A. Davies, J.E. Gershenwald, S.N. Wagner, D.S. Hoon, D. Schadendorf, E.S. Lander, S.B. Gabriel, G. Getz, L.A. Garraway, and L. Chin. 2012. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*. 150:251-263.
- Horn, S., A. Figl, P.S. Rachakonda, C. Fischer, A. Sucker, A. Gast, S. Kadel, I. Moll, E. Nagore, K. Hemminki, D. Schadendorf, and R. Kumar. 2013. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science*. 339:959-961.
- Huang, J.M., I. Chikeka, and T.J. Hornyak. 2017. Melanocytic Nevi and the Genetic and Epigenetic Control of Oncogene-Induced Senescence. *Dermatol Clin*. 35:85-93.
- Isola, A.L., K. Eddy, K. Zembrzuski, J.S. Goydos, and S. Chen. 2018. Exosomes released by metabotropic glutamate receptor 1 (GRM1) expressing melanoma cells increase cell migration and invasiveness. *Oncotarget*. 9:1187-1199.
- Itahana, K., J. Campisi, and G.P. Dimri. 2007. Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. *Methods Mol Biol*. 371:21-31.
- Itahana, K., G. Dimri, and J. Campisi. 2001. Regulation of cellular senescence by p53. *Eur J Biochem*. 268:2784-2791.
- Ito, S., and K. Wakamatsu. 2003. Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review. *Pigment Cell Res*. 16:523-531.
- Jackson, J.G., V. Pant, Q. Li, L.L. Chang, A. Quintas-Cardama, D. Garza, O. Tavana, P. Yang, T. Manshour, Y. Li, A.K. El-Naggar, and G. Lozano. 2012. p53-mediated senescence impairs the apoptotic response to chemotherapy and clinical outcome in breast cancer. *Cancer Cell*. 21:793-806.
- Jakob, J.A., R.L. Bassett, Jr., C.S. Ng, J.L. Curry, R.W. Joseph, G.C. Alvarado, M.L. Rohlfs, J. Richard, J.E. Gershenwald, K.B. Kim, A.J. Lazar, P. Hwu, and M.A. Davies. 2012.

- NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer*. 118:4014-4023.
- Jemal, A., R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu, T. Murray, and M.J. Thun. 2008. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 58:71-96.
- Johmura, Y., M. Shimada, T. Misaki, A. Naiki-Ito, H. Miyoshi, N. Motoyama, N. Ohtani, E. Hara, M. Nakamura, A. Morita, S. Takahashi, and M. Nakanishi. 2014. Necessary and sufficient role for a mitosis skip in senescence induction. *Mol Cell*. 55:73-84.
- Juergensen, A., U. Holzappel, R. Hein, W. Stolz, R. Buettner, and A. Bosserhoff. 2001. Comparison of two prognostic markers for malignant melanoma: MIA and S100 beta. *Tumour Biol*. 22:54-58.
- Jun, J.I., and L.F. Lau. 2011. Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 10:945-963.
- Jung, Y.S., Y. Qian, and X. Chen. 2010. Examination of the expanding pathways for the regulation of p21 expression and activity. *Cell Signal*. 22:1003-1012.
- Jurchott, K., S. Bergmann, U. Stein, W. Walther, M. Janz, I. Manni, G. Piaggio, E. Fietze, M. Dietel, and H.D. Royer. 2003. YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J Biol Chem*. 278:27988-27996.
- Kaidbey, K.H., P.P. Agin, R.M. Sayre, and A.M. Kligman. 1979. Photoprotection by melanin--a comparison of black and Caucasian skin. *J Am Acad Dermatol*. 1:249-260.
- Kanitakis, J. 2002. Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol*. 12:390-399; quiz 400-391.
- Kato, D., K. Miyazawa, M. Ruas, M. Starborg, I. Wada, T. Oka, T. Sakai, G. Peters, and E. Hara. 1998. Features of replicative senescence induced by direct addition of antenpedia-p16INK4A fusion protein to human diploid fibroblasts. *FEBS Lett*. 427:203-208.
- Kittler, H., H. Pehamberger, K. Wolff, and M. Binder. 2000. Follow-up of melanocytic skin lesions with digital epiluminescence microscopy: patterns of modifications observed in early melanoma, atypical nevi, and common nevi. *J Am Acad Dermatol*. 43:467-476.
- Kuilman, T., C. Michaloglou, W.J. Mooi, and D.S. Peeper. 2010. The essence of senescence. *Genes Dev*. 24:2463-2479.
- Kuilman, T., C. Michaloglou, L.C. Vredeveld, S. Douma, R. van Doorn, C.J. Desmet, L.A. Aarden, W.J. Mooi, and D.S. Peeper. 2008. Oncogene-induced senescence relayed by an interleukin-dependent inflammatory network. *Cell*. 133:1019-1031.
- Landa, I., T. Ibrahimasic, L. Boucai, R. Sinha, J.A. Knauf, R.H. Shah, S. Dogan, J.C. Ricarte-Filho, G.P. Krishnamoorthy, B. Xu, N. Schultz, M.F. Berger, C. Sander, B.S. Taylor, R. Ghossein, I. Ganly, and J.A. Fagin. 2016. Genomic and transcriptomic hallmarks of poorly differentiated and anaplastic thyroid cancers. *J Clin Invest*. 126:1052-1066.
- Larkin, J., F.S. Hodi, and J.D. Wolchok. 2015. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 373:1270-1271.
- Lasham, A., S. Moloney, T. Hale, C. Homer, Y.F. Zhang, J.G. Murison, A.W. Braithwaite, and J. Watson. 2003. The Y-box-binding protein, YB1, is a potential negative regulator of the p53 tumor suppressor. *J Biol Chem*. 278:35516-35523.
- Lasithiotakis, K.G., I.E. Petrakis, and C. Garbe. 2010. Cutaneous melanoma in the elderly: epidemiology, prognosis and treatment. *Melanoma Res*. 20:163-170.
- Lecot, P., F. Alimirah, P.Y. Desprez, J. Campisi, and C. Wiley. 2016. Context-dependent effects of cellular senescence in cancer development. *Br J Cancer*. 114:1180-1184.
- Lee, B.Y., J.A. Han, J.S. Im, A. Morrone, K. Johung, E.C. Goodwin, W.J. Kleijer, D. DiMaio, and E.S. Hwang. 2006. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell*. 5:187-195.
- Leikam, C., A. Hufnagel, M. Schartl, and S. Meierjohann. 2008. Oncogene activation in melanocytes links reactive oxygen to multinucleated phenotype and senescence. *Oncogene*. 27:7070-7082.
- Lin, W.M., S. Luo, A. Muzikansky, A.Z. Lobo, K.K. Tanabe, A.J. Sober, A.B. Cosimi, H. Tsao, and L.M. Duncan. 2015. Outcome of patients with de novo versus nevus-associated melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 72:54-58.

- Liu, D., and P.J. Hornsby. 2007. Senescent human fibroblasts increase the early growth of xenograft tumors via matrix metalloproteinase secretion. *Cancer Res.* 67:3117-3126.
- Liu, J., M. Fukunaga-Kalabis, L. Li, and M. Herlyn. 2014. Developmental pathways activated in melanocytes and melanoma. *Arch Biochem Biophys.* 563:13-21.
- Liu, Y., J.L. Martindale, M. Gorospe, and N.J. Holbrook. 1996. Regulation of p21WAF1/CIP1 expression through mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *Cancer Res.* 56:31-35.
- Liu, Y., J. Zhao, W. Zhang, J. Gan, C. Hu, G. Huang, and Y. Zhang. 2015. lncRNA GAS5 enhances G1 cell cycle arrest via binding to YBX1 to regulate p21 expression in stomach cancer. *Sci Rep.* 5:10159.
- Long, G.V., D. Stroyakovskiy, H. Gogas, E. Levchenko, F. de Braud, J. Larkin, C. Garbe, T. Jouary, A. Hauschild, J.J. Grob, V. Chiarion-Sileni, C. Lebbe, M. Mandala, M. Millward, A. Arance, I. Bondarenko, J.B. Haanen, J. Hansson, J. Utikal, V. Ferraresi, N. Kovalenko, P. Mohr, V. Probachai, D. Schadendorf, P. Nathan, C. Robert, A. Ribas, D.J. DeMarini, J.G. Irani, S. Swann, J.J. Legos, F. Jin, B. Mookerjee, and K. Flaherty. 2015. Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet.* 386:444-451.
- Long, G.V., J.S. Weber, J. Larkin, V. Atkinson, J.J. Grob, D. Schadendorf, R. Dummer, C. Robert, I. Marquez-Rodas, C. McNeil, H. Schmidt, K. Briscoe, J.F. Baurain, F.S. Hodi, and J.D. Wolchok. 2017. Nivolumab for Patients With Advanced Melanoma Treated Beyond Progression: Analysis of 2 Phase 3 Clinical Trials. *JAMA Oncol.* 3:1511-1519.
- Luke, J.J., K.T. Flaherty, A. Ribas, and G.V. Long. 2017. Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. *Nat Rev Clin Oncol.* 14:463-482.
- Ma, Y., H. Yang, J.M. Pitt, G. Kroemer, and L. Zitvogel. 2016. Therapy-induced microenvironmental changes in cancer. *J Mol Med (Berl).* 94:497-508.
- Macerola, E., B. Loggini, R. Giannini, G. Garavello, M. Giordano, A. Proietti, C. Niccoli, F. Basolo, and G. Fontanini. 2015. Coexistence of TERT promoter and BRAF mutations in cutaneous melanoma is associated with more clinicopathological features of aggressiveness. *Virchows Arch.* 467:177-184.
- Mackenzie Ross, A.D., M.G. Cook, H. Chong, M. Hossain, H.S. Pandha, and D.C. Bennett. 2013. Senescence evasion in melanoma progression: uncoupling of DNA-damage signaling from p53 activation and p21 expression. *Pigment Cell Melanoma Res.* 26:226-235.
- Mackie, R.M., A. Hauschild, and A.M. Eggermont. 2009. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol.* 20 Suppl 6:vi1-7.
- Marin, Y.E., and S. Chen. 2004. Involvement of metabotropic glutamate receptor 1, a G protein coupled receptor, in melanoma development. *J Mol Med (Berl).* 82:735-749.
- Marin, Y.E., J. Namkoong, K. Cohen-Solal, S.S. Shin, J.J. Martino, M. Oka, and S. Chen. 2006. Stimulation of oncogenic metabotropic glutamate receptor 1 in melanoma cells activates ERK1/2 via PKCepsilon. *Cell Signal.* 18:1279-1286.
- Markovic, S.N., L.A. Erickson, R.D. Rao, R.H. Weenig, B.A. Pockaj, A. Bardia, C.M. Vachon, S.E. Schild, R.R. McWilliams, J.L. Hand, S.D. Laman, L.A. Kottschade, W.J. Maples, M.R. Pittelkow, J.S. Pulido, J.D. Cameron, E.T. Creagan, and C. Melanoma Study Group of the Mayo Clinic Cancer. 2007. Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. *Mayo Clin Proc.* 82:364-380.
- Marr, D.G., I. Poser, Y.G. Shellman, A.K. Bosserhoff, and D.A. Norris. 2004. Ultraviolet radiation induces release of MIA: a new mechanism for UVR-induced progression of melanoma. *Int J Oncol.* 25:105-111.
- Marti, F.M., J. de Naurois, M.H. Cullen, I. Novitzky-Basso, M.J. Gill, and F. Roila. 2010. Management of febrile neutropenia: ESMO Clinical Practice Guidelines. *Annals of Oncology.* 21:v252-v256.
- Masters, J.R. 2000. Human cancer cell lines: fact and fantasy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:233-236.

- Matsumoto, K., and A.P. Wolffe. 1998. Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. *Trends Cell Biol.* 8:318-323.
- Meier, F., M. Nesbit, M.Y. Hsu, B. Martin, P. Van Belle, D.E. Elder, G. Schaumburg-Lever, C. Garbe, T.M. Walz, P. Donatien, T.M. Crombleholme, and M. Herlyn. 2000. Human melanoma progression in skin reconstructs : biological significance of bFGF. *Am J Pathol.* 156:193-200.
- Michaloglou, C., L.C. Vredeveld, M.S. Soengas, C. Denoyelle, T. Kuilman, C.M. van der Horst, D.M. Majoor, J.W. Shay, W.J. Mooi, and D.S. Peeper. 2005. BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. *Nature.* 436:720-724.
- Miller, A.J., and M.C. Mihm, Jr. 2006. Melanoma. *N Engl J Med.* 355:51-65.
- Miller, D.M., and K.T. Flaherty. 2014. Cyclin-dependent kinases as therapeutic targets in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 27:351-365.
- Mirza, A.M., S. Gysin, N. Malek, K. Nakayama, J.M. Roberts, and M. McMahon. 2004. Cooperative regulation of the cell division cycle by the protein kinases RAF and AKT. *Mol Cell Biol.* 24:10868-10881.
- Mitra, A., J. Chakrabarti, and A. Chatterjee. 2003. Binding of alpha5 monoclonal antibody to cell surface alpha5beta1 integrin modulates MMP-2 and MMP-7 activity in B16F10 melanoma cells. *J Environ Pathol Toxicol Oncol.* 22:167-178.
- Mitsui, H., F. Kiecker, A. Shemer, M.V. Cannizzaro, C.Q.F. Wang, N. Gulati, H. Ohmatsu, K.R. Shah, P. Gilleaudeau, M. Sullivan-Whalen, I. Cueto, N.S. McNutt, M. Suarez-Farinas, and J.G. Krueger. 2016. Discrimination of Dysplastic Nevi from Common Melanocytic Nevi by Cellular and Molecular Criteria. *J Invest Dermatol.* 136:2030-2040.
- Mooi, W.J., and D.S. Peeper. 2006. Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. *N Engl J Med.* 355:1037-1046.
- Moser, M., A.K. Bosserhoff, E.B. Hunziker, L. Sandell, R. Fassler, and R. Buettner. 2002. Ultrastructural cartilage abnormalities in MIA/CD-RAP-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 22:1438-1445.
- Munoz-Espin, D., and M. Serrano. 2014. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 15:482-496.
- Murphy, L.O., and J. Blenis. 2006. MAPK signal specificity: the right place at the right time. *Trends Biochem Sci.* 31:268-275.
- Nakanishi, M., G.R. Adami, R.S. Robetorye, A. Noda, S.F. Venable, D. Dimitrov, O.M. Pereira-Smith, and J.R. Smith. 1995. Exit from G0 and entry into the cell cycle of cells expressing p21Sdi1 antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92:4352-4356.
- Namkoong, J., S.S. Shin, H.J. Lee, Y.E. Marin, B.A. Wall, J.S. Goydos, and S. Chen. 2007. Metabotropic glutamate receptor 1 and glutamate signaling in human melanoma. *Cancer Res.* 67:2298-2305.
- Napetschnig, J., and H. Wu. 2013. Molecular basis of NF-kappaB signaling. *Annu Rev Biophys.* 42:443-468.
- Narita, M., S. Nunez, E. Heard, M. Narita, A.W. Lin, S.A. Hearn, D.L. Spector, G.J. Hannon, and S.W. Lowe. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. *Cell.* 113:703-716.
- Nelson, D.M., T. McBryan, J.C. Jeyapalan, J.M. Sedivy, and P.D. Adams. 2014. A comparison of oncogene-induced senescence and replicative senescence: implications for tumor suppression and aging. *Age (Dordr).* 36:9637.
- NIH. 1992. NIH Consensus conference. Diagnosis and treatment of early melanoma. *JAMA.* 268:1314-1319.
- Okamoto, T., H. Izumi, T. Imamura, H. Takano, T. Ise, T. Uchiumi, M. Kuwano, and K. Kohno. 2000. Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression. *Oncogene.* 19:6194-6202.
- Olumi, A.F., G.D. Grossfeld, S.W. Hayward, P.R. Carroll, T.D. Tlsty, and G.R. Cunha. 1999. Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res.* 59:5002-5011.
- Paget, G. 1889. Remarks on a Case of Alternate Partial Anaesthesia. *Br Med J.* 1:1-3.
- Paluncic, J., Z. Kovacevic, P.J. Jansson, D. Kalinowski, A.M. Merlot, M.L. Huang, H.C. Lok, S. Sahni, D.J. Lane, and D.R. Richardson. 2016. Roads to melanoma: Key pathways and

- emerging players in melanoma progression and oncogenic signaling. *Biochim Biophys Acta*. 1863:770-784.
- Patton, E.E., H.R. Widlund, J.L. Kutok, K.R. Kopani, J.F. Amatruda, R.D. Murphey, S. Berghmans, E.A. Mayhall, D. Traver, C.D. Fletcher, J.C. Aster, S.R. Granter, A.T. Look, C. Lee, D.E. Fisher, and L.I. Zon. 2005. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Curr Biol*. 15:249-254.
- Pawlikowski, J.S., T. McBryan, J. van Tuyn, M.E. Drotar, R.N. Hewitt, A.B. Maier, A. King, K. Blyth, H. Wu, and P.D. Adams. 2013. Wnt signaling potentiates nevogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:16009-16014.
- Perkins, A., and R.L. Duffy. 2015. Atypical moles: diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 91:762-767.
- Pestana, A., J. Vinagre, M. Sobrinho-Simoes, and P. Soares. 2017. TERT biology and function in cancer: beyond immortalisation. *J Mol Endocrinol*. 58:R129-R146.
- Petitjean, A., E. Mathe, S. Kato, C. Ishioka, S.V. Tavtigian, P. Hainaut, and M. Olivier. 2007. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Human mutation*. 28:622-629.
- Petrova, N.V., A.K. Velichko, S.V. Razin, and O.L. Kantidze. 2016. Small molecule compounds that induce cellular senescence. *Aging Cell*. 15:999-1017.
- Pfahlberg, A., K.F. Kolmel, O. Gefeller, and G. Febim Study. 2001. Timing of excessive ultraviolet radiation and melanoma: epidemiology does not support the existence of a critical period of high susceptibility to solar ultraviolet radiation- induced melanoma. *Br J Dermatol*. 144:471-475.
- Piris, A., M.C. Mihm, Jr., and M.P. Hoang. 2015. BAP1 and BRAFV600E expression in benign and malignant melanocytic proliferations. *Hum Pathol*. 46:239-245.
- Plettenberg, A., C. Ballaun, J. Pammer, M. Mildner, D. Strunk, W. Weninger, and E. Tschachler. 1995. Human melanocytes and melanoma cells constitutively express the Bcl-2 proto-oncogene in situ and in cell culture. *Am J Pathol*. 146:651-659.
- Plonka, P.M., T. Passeron, M. Brenner, D.J. Tobin, S. Shibahara, A. Thomas, A. Slominski, A.L. Kadakara, D. Herschkovitz, E. Peters, J.J. Nordlund, Z. Abdel-Malek, K. Takeda, R. Paus, J.P. Ortonne, V.J. Hearing, and K.U. Schallreuter. 2009. What are melanocytes really doing all day long...? *Exp Dermatol*. 18:799-819.
- Pollock, P.M., K. Cohen-Solal, R. Sood, J. Namkoong, J.J. Martino, A. Koganti, H. Zhu, C. Robbins, I. Makalowska, S.S. Shin, Y. Marin, K.G. Roberts, L.M. Yudt, A. Chen, J. Cheng, A. Incao, H.W. Pinkett, C.L. Graham, K. Dunn, S.M. Crespo-Carbone, K.R. Mackason, K.B. Ryan, D. Sinsimer, J. Goydos, K.R. Reuhl, M. Eckhaus, P.S. Meltzer, W.J. Pavan, J.M. Trent, and S. Chen. 2003a. Melanoma mouse model implicates metabotropic glutamate signaling in melanocytic neoplasia. *Nat Genet*. 34:108-112.
- Pollock, P.M., U.L. Harper, K.S. Hansen, L.M. Yudt, M. Stark, C.M. Robbins, T.Y. Moses, G. Hostetter, U. Wagner, J. Kakareka, G. Salem, T. Pohida, P. Heenan, P. Duray, O. Kallioniemi, N.K. Hayward, J.M. Trent, and P.S. Meltzer. 2003b. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet*. 33:19-20.
- Populo, H., P. Boaventura, J. Vinagre, R. Batista, A. Mendes, R. Caldas, J. Pardal, F. Azevedo, M. Honavar, I. Guimaraes, J. Manuel Lopes, M. Sobrinho-Simoes, and P. Soares. 2014. TERT promoter mutations in skin cancer: the effects of sun exposure and X-irradiation. *J Invest Dermatol*. 134:2251-2257.
- Poser, I., M. Golob, R. Buettner, and A.K. Bosserhoff. 2003. Upregulation of HMG1 leads to melanoma inhibitory activity expression in malignant melanoma cells and contributes to their malignancy phenotype. *Mol Cell Biol*. 23:2991-2998.
- Poser, I., J. Tatzel, S. Kuphal, and A.K. Bosserhoff. 2004. Functional role of MIA in melanocytes and early development of melanoma. *Oncogene*. 23:6115-6124.
- Poynter, J.N., J.T. Elder, D.R. Fullen, R.P. Nair, M.S. Soengas, T.M. Johnson, B. Redman, N.E. Thomas, and S.B. Gruber. 2006. BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi. *Melanoma Res*. 16:267-273.
- Pumiglia, K.M., and S.J. Decker. 1997. Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:448-452.

- Qian, Y., and X. Chen. 2013. Senescence regulation by the p53 protein family. *Methods Mol Biol.* 965:37-61.
- Quelle, D.E., F. Zindy, R.A. Ashmun, and C.J. Sherr. 1995. Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell.* 83:993-1000.
- Quevedo, W.C., G. Szabo, and J. Virks. 1969. Influence of age and UV on the populations of dopa-positive melanocytes in human skin. *J Invest Dermatol.* 52:287-290.
- Rasoamanantana, P., R. Thweatt, J. Labat-Robert, and S. Goldstein. 1994. Altered regulation of fibronectin gene expression in Werner syndrome fibroblasts. *Exp Cell Res.* 213:121-127.
- Rastrelli, M., S. Tropea, C.R. Rossi, and M. Alaibac. 2014. Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification. *In Vivo.* 28:1005-1011.
- Ray-Coquard, I., C. Cropet, M. Van Glabbeke, C. Sebban, A. Le Cesne, I. Judson, O. Tredan, J. Verweij, P. Biron, I. Labidi, J.P. Guastalla, T. Bachelot, D. Perol, S. Chabaud, P.C. Hogendoorn, P. Cassier, A. Dufresne, J.Y. Blay, R. European Organization for, T. Treatment of Cancer Soft, and G. Bone Sarcoma. 2009. Lymphopenia as a prognostic factor for overall survival in advanced carcinomas, sarcomas, and lymphomas. *Cancer Res.* 69:5383-5391.
- Ribas, A., O. Hamid, A. Daud, F.S. Hodi, J.D. Wolchok, R. Kefford, A.M. Joshua, A. Patnaik, W.J. Hwu, J.S. Weber, T.C. Gangadhar, P. Hersey, R. Dronca, R.W. Joseph, H. Zarour, B. Chmielowski, D.P. Lawrence, A. Algazi, N.A. Rizvi, B. Hoffner, C. Mateus, K. Gergich, J.A. Lindia, M. Giannotti, X.N. Li, S. Ebbinghaus, S.P. Kang, and C. Robert. 2016. Association of Pembrolizumab With Tumor Response and Survival Among Patients With Advanced Melanoma. *JAMA.* 315:1600-1609.
- Riechers, A., and A.K. Bosserhoff. 2014. Melanoma inhibitory activity in melanoma diagnostics and therapy - a small protein is looming large. *Exp Dermatol.* 23:12-14.
- Rigel, D.S. 2010. Epidemiology of melanoma. *Semin Cutan Med Surg.* 29:204-209.
- Rinderknecht, J.D., S.M. Goldinger, S. Rozati, J. Kamarashev, K. Kerl, L.E. French, R. Dummer, and B. Belloni. 2013. RASopathia skin eruptions during vemurafenib therapy. *PLoS One.* 8:e58721.
- Rizos, H., S. Haferkamp, and L. L. Scurr. 2017. Senescence. *In Melanoma Development: Molecular Biology, Genetics and Clinical Application.* Anja Bosserhoff. 289-310.
- Roberson, R.S., S.J. Kussick, E. Vallieres, S.Y. Chen, and D.Y. Wu. 2005. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res.* 65:2795-2803.
- Robert, C., B. Karaszewska, J. Schachter, P. Rutkowski, A. Mackiewicz, D. Stroiakovski, M. Lichinitser, R. Dummer, F. Grange, L. Mortier, V. Chiarion-Sileni, K. Drucis, I. Krajsova, A. Hauschild, P. Lorigan, P. Wolter, G.V. Long, K. Flaherty, P. Nathan, A. Ribas, A.M. Martin, P. Sun, W. Crist, J. Legos, S.D. Rubin, S.M. Little, and D. Schadendorf. 2015. Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib. *N Engl J Med.* 372:30-39.
- Robertson, N.G., S. Heller, J.S. Lin, B.L. Resendes, S. Weremowicz, C.S. Denis, A.M. Bell, A.J. Hudspeth, and C.C. Morton. 2000. A novel conserved cochlear gene, OTOR: identification, expression analysis, and chromosomal mapping. *Genomics.* 66:242-248.
- Robinson, J.K., and B.J. Nickoloff. 2004. Digital epiluminescence microscopy monitoring of high-risk patients. *Arch Dermatol.* 140:49-56.
- Rodier, F., J.P. Coppe, C.K. Patil, W.A. Hoeijmakers, D.P. Munoz, S.R. Raza, A. Freund, E. Campeau, A.R. Davalos, and J. Campisi. 2009. Persistent DNA damage signalling triggers senescence-associated inflammatory cytokine secretion. *Nat Cell Biol.* 11:973-979.
- Roh, M.R., P. Eliades, S. Gupta, and H. Tsao. 2015. Genetics of melanocytic nevi. *Pigment Cell Melanoma Res.* 28:661-672.
- Romanov, V.S., M.V. Abramova, S.B. Svetlikova, T.V. Bykova, S.G. Zubova, N.D. Aksenov, A.J. Fornace, T.V. Pospelova, and V.A. Pospelov. 2010. p21Waf1 is required for cellular senescence but not for cell cycle arrest induced by the HDAC inhibitor sodium butyrate. *Cell Cycle.* 9:3945-3955.

- Rossi, D.J., D. Bryder, J. Seita, A. Nussenzweig, J. Hoeijmakers, and I.L. Weissman. 2007. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*. 447:725-729.
- Sagebiel, R.W. 1993. Melanocytic nevi in histologic association with primary cutaneous melanoma of superficial spreading and nodular types: effect of tumor thickness. *J Invest Dermatol*. 100:322S-325S.
- Salama, R., M. Sadaie, M. Hoare, and M. Narita. 2014. Cellular senescence and its effector programs. *Genes Dev*. 28:99-114.
- Salminen, A., A. Kauppinen, and K. Kaarniranta. 2012. Emerging role of NF-kappaB signaling in the induction of senescence-associated secretory phenotype (SASP). *Cell Signal*. 24:835-845.
- Sanlorenzo, M., A. Choudhry, I. Vujic, C. Posch, K. Chong, K. Johnston, M. Meier, S. Osella-Abate, P. Quaglino, A. Daud, A. Algazi, K. Rappersberger, and S. Ortiz-Urda. 2014. Comparative profile of cutaneous adverse events: BRAF/MEK inhibitor combination therapy versus BRAF monotherapy in melanoma. *J Am Acad Dermatol*. 71:1102-1109 e1101.
- Sasahira, T., A.K. Bosserhoff, and T. Kirita. 2018. The importance of melanoma inhibitory activity gene family in the tumor progression of oral cancer. *Pathol Int*. 68:278-286.
- Schadendorf, D., F.S. Hodi, C. Robert, J.S. Weber, K. Margolin, O. Hamid, D. Patt, T.T. Chen, D.M. Berman, and J.D. Wolchok. 2015. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *J Clin Oncol*. 33:1889-1894.
- Schaffer, J.V. 2015. Update on melanocytic nevi in children. *Clin Dermatol*. 33:368-386.
- Schick, U., J. Kyula, H. Barker, R. Patel, S. Zaidi, C. Gregory, H. Hafsi, V. Roulstone, E. Deutsch, M. McLaughlin, and K. Harrington. 2015. Trametinib radiosensitises RAS- and BRAF-mutated melanoma by perturbing cell cycle and inducing senescence. *Radiother Oncol*. 117:364-375.
- Schiffner, S., B.M. Braunger, M.M. de Jel, S.E. Coupland, E.R. Tamm, and A.K. Bosserhoff. 2014. Tg(Grm1) transgenic mice: a murine model that mimics spontaneous uveal melanoma in humans? *Exp Eye Res*. 127:59-68.
- Schiffner, S., S. Chen, J.C. Becker, and A.K. Bosserhoff. 2012. Highly pigmented Tg(Grm1) mouse melanoma develops non-pigmented melanoma cells in distant metastases. *Exp Dermatol*. 21:786-788.
- Schiffner, S., N. Zimara, R. Schmid, and A.K. Bosserhoff. 2011. p54nrb is a new regulator of progression of malignant melanoma. *Carcinogenesis*. 32:1176-1182.
- Schitteck, B., M. de Jel, and T. Tüting. 2017. Melanoma Model Systems. In *Melanoma Development: Molecular Biology, Genetics and Clinical Application*. A.K. Bosserhoff, editor. Springer International Publishing, Cham. 369-398.
- Schitteck, B., K. Psenner, B. Sauer, F. Meier, T. Iftner, and C. Garbe. 2007. The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance. *Int J Cancer*. 120:2110-2118.
- Schmid, R., and A.K. Bosserhoff. 2014. Redundancy in regulation of chondrogenesis in MIA/CD-RAP-deficient mice. *Mech Dev*. 131:24-34.
- Schmid, R., K. Meyer, R. Spang, B. Schitteck, and A.K. Bosserhoff. 2013. Melanoma inhibitory activity promotes melanoma development through activation of YBX1. *Pigment Cell Melanoma Res*. 26:685-696.
- Schmid, R., S. Schiffner, A. Opolka, S. Grassel, T. Schubert, M. Moser, and A.K. Bosserhoff. 2010. Enhanced cartilage regeneration in MIA/CD-RAP deficient mice. *Cell Death Dis*. 1:e97.
- Schmidt, J., and A.K. Bosserhoff. 2009. Processing of MIA protein during melanoma cell migration. *Int J Cancer*. 125:1587-1594.
- Schmidt, J., A. Riechers, and A.K. Bosserhoff. 2013. MIA--a new target protein for malignant melanoma therapy. *Histol Histopathol*. 28:421-426.
- Schmidt, J., A. Riechers, R. Stoll, T. Amann, F. Fink, T. Spruss, W. Gronwald, B. König, C. Hellerbrand, and A.K. Bosserhoff. 2012. Targeting melanoma metastasis and

- immunosuppression with a new mode of melanoma inhibitory activity (MIA) protein inhibition. *PLoS One*. 7:e37941.
- Schmitt, C.A., J.S. Fridman, M. Yang, S. Lee, E. Baranov, R.M. Hoffman, and S.W. Lowe. 2002. A senescence program controlled by p53 and p16INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell*. 109:335-346.
- Schmitt, C.A., and S.W. Lowe. 2002. Apoptosis and chemoresistance in transgenic cancer models. *J Mol Med (Berl)*. 80:137-146.
- Scholzen, T., and J. Gerdes. 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 182:311-322.
- Sedlmaier, A., N. Wernert, R. Gallitzendorfer, M.M. Abouzied, V. Gieselmann, and S. Franken. 2011. Overexpression of hepatoma-derived growth factor in melanocytes does not lead to oncogenic transformation. *BMC Cancer*. 11:457.
- Sekulic, A., P. Haluska, Jr., A.J. Miller, J. Genebriera De Lamo, S. Ejadi, J.S. Pulido, D.R. Salomao, E.C. Thorland, R.G. Vile, D.L. Swanson, B.A. Pockaj, S.D. Laman, M.R. Pittelkow, S.N. Markovic, and C. Melanoma Study Group of Mayo Clinic Cancer. 2008. Malignant melanoma in the 21st century: the emerging molecular landscape. *Mayo Clin Proc*. 83:825-846.
- Serrano, M., H. Lee, L. Chin, C. Cordon-Cardo, D. Beach, and R.A. DePinho. 1996. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell*. 85:27-37.
- Serrano, M., A.W. Lin, M.E. McCurrach, D. Beach, and S.W. Lowe. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*. 88:593-602.
- Sewing, A., B. Wiseman, A.C. Lloyd, and H. Land. 1997. High-intensity Raf signal causes cell cycle arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*. 17:5588-5597.
- Sharpless, E., and L. Chin. 2003. The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene*. 22:3092-3098.
- Sharpless, N.E., and C.J. Sherr. 2015. Forging a signature of in vivo senescence. *Nat Rev Cancer*. 15:397-408.
- Shay, J.W., and S. Bacchetti. 1997. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer*. 33:787-791.
- Shay, J.W., and W.E. Wright. 2005. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*. 26:867-874.
- Sherr, C.J. 1996. Cancer cell cycles. *Science*. 274:1672-1677.
- Shitara, D., M.M. Nascimento, S. Puig, S. Yamada, M.M. Enokihara, N. Michalany, and E. Bagatin. 2014. Nevus-associated melanomas: clinicopathologic features. *Am J Clin Pathol*. 142:485-491.
- Shtivelman, E., M.Q. Davies, P. Hwu, J. Yang, M. Lotem, M. Oren, K.T. Flaherty, and D.E. Fisher. 2014. Pathways and therapeutic targets in melanoma. *Oncotarget*. 5:1701-1752.
- Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal. 2018. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 68:7-30.
- Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal. 2019. Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin*. 69:7-34.
- Sinnberg, T., B. Sauer, P. Holm, B. Spangler, S. Kuphal, A. Bosserhoff, and B. Schitteck. 2012. MAPK and PI3K/AKT mediated YB-1 activation promotes melanoma cell proliferation which is counteracted by an autoregulatory loop. *Exp Dermatol*. 21:265-270.
- Smalley, K.S., M. Lioni, and M. Herlyn. 2006. Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 42:242-247.
- Soo, J.K., A.D. Mackenzie Ross, D.M. Kallenberg, C. Milagre, W. Heung Chong, J. Chow, L. Hill, S. Hoare, R.S. Collinson, M. Hossain, W.N. Keith, R. Marais, and D.C. Bennett. 2011. Malignancy without immortality? Cellular immortalization as a possible late event in melanoma progression. *Pigment Cell Melanoma Res*. 24:490-503.
- Sosman, J.A., K.B. Kim, L. Schuchter, R. Gonzalez, A.C. Pavlick, J.S. Weber, G.A. McArthur, T.E. Hutson, S.J. Moschos, K.T. Flaherty, P. Hersey, R. Kefford, D. Lawrence, I. Puzanov, K.D. Lewis, R.K. Amaravadi, B. Chmielowski, H.J. Lawrence, Y. Shyr, F. Ye,

- J. Li, K.B. Nolop, R.J. Lee, A.K. Joe, and A. Ribas. 2012. Survival in BRAF V600-mutant advanced melanoma treated with vemurafenib. *N Engl J Med.* 366:707-714.
- Stahlecker, J., A. Gauger, A. Bosserhoff, R. Buttner, J. Ring, and R. Hein. 2000. MIA as a reliable tumor marker in the serum of patients with malignant melanoma. *Anticancer Res.* 20:5041-5044.
- Stam-Posthuma, J.J., C. van Duinen, E. Scheffer, J. Vink, and W. Bergman. 2001. Multiple primary melanomas. *J Am Acad Dermatol.* 44:22-27.
- Stein, G.H., L.F. Drullinger, A. Soulard, and V. Dulic. 1999. Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. *Mol Cell Biol.* 19:2109-2117.
- Stoll, R., and A. Bosserhoff. 2008. Extracellular SH3 domain containing proteins--features of a new protein family. *Curr Protein Pept Sci.* 9:221-226.
- Stoll, R., C. Renner, M. Zweckstetter, M. Bruggert, D. Ambrosius, S. Palme, R.A. Engh, M. Golob, I. Breibach, R. Buettner, W. Voelter, T.A. Holak, and A.K. Bosserhoff. 2001. The extracellular human melanoma inhibitory activity (MIA) protein adopts an SH3 domain-like fold. *EMBO J.* 20:340-349.
- Stros, M. 2010. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochim Biophys Acta.* 1799:101-113.
- Sugrue, M.M., D.Y. Shin, S.W. Lee, and S.A. Aaronson. 1997. Wild-type p53 triggers a rapid senescence program in human tumor cells lacking functional p53. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94:9648-9653.
- Suram, A., J. Kaplunov, P.L. Patel, H. Ruan, A. Cerutti, V. Boccardi, M. Fumagalli, R. Di Micco, N. Mirani, R.L. Gurung, M.P. Hande, F. d'Adda di Fagagna, and U. Herbig. 2012. Oncogene-induced telomere dysfunction enforces cellular senescence in human cancer precursor lesions. *EMBO J.* 31:2839-2851.
- Tang, D., R. Kang, H.J. Zeh, 3rd, and M.T. Lotze. 2011. High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease. *Antioxid Redox Signal.* 14:1315-1335.
- Tannous, Z.S., M.C. Mihm, Jr., A.J. Sober, and L.M. Duncan. 2005. Congenital melanocytic nevi: clinical and histopathologic features, risk of melanoma, and clinical management. *J Am Acad Dermatol.* 52:197-203.
- Tatzel, J., I. Poser, J. Schroeder, and A.K. Bosserhoff. 2005. Inhibition of melanoma inhibitory activity (MIA) expression in melanoma cells leads to molecular and phenotypic changes. *Pigment Cell Res.* 18:92-101.
- te Poele, R.H., A.L. Okorokov, L. Jardine, J. Cummings, and S.P. Joel. 2002. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 62:1876-1883.
- Titus-Ernstoff, L., A.E. Perry, S.K. Spencer, J.J. Gibson, B.F. Cole, and M.S. Ernstoff. 2005. Pigmentary characteristics and moles in relation to melanoma risk. *Int J Cancer.* 116:144-149.
- Tran, S.L., S. Haferkamp, L.L. Scurr, K. Gowrishankar, T.M. Becker, C. Desilva, J.F. Thompson, R.A. Scolyer, R.F. Kefford, and H. Rizos. 2012. Absence of distinguishing senescence traits in human melanocytic nevi. *J Invest Dermatol.* 132:2226-2234.
- Tsao, H., V. Goel, H. Wu, G. Yang, and F.G. Haluska. 2004. Genetic interaction between NRAS and BRAF mutations and PTEN/MMAC1 inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol.* 122:337-341.
- Tsao, H., and K. Niendorf. 2004. Genetic testing in hereditary melanoma. *J Am Acad Dermatol.* 51:803-808.
- Ventura, A., D.G. Kirsch, M.E. McLaughlin, D.A. Tuveson, J. Grimm, L. Lintault, J. Newman, E.E. Reczek, R. Weissleder, and T. Jacks. 2007. Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo. *Nature.* 445:661-665.
- Wan, P.T., M.J. Garnett, S.M. Roe, S. Lee, D. Niculescu-Duvaz, V.M. Good, C.M. Jones, C.J. Marshall, C.J. Springer, D. Barford, R. Marais, and P. Cancer Genome. 2004. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell.* 116:855-867.

- Wang, Q., P.C. Wu, D.Z. Dong, I. Ivanova, E. Chu, S. Zeliadt, H. Vesselle, and D.Y. Wu. 2013. Polyploidy road to therapy-induced cellular senescence and escape. *Int J Cancer*. 132:1505-1515.
- Wiley, C.D., M.C. Velarde, P. Lecot, S. Liu, E.A. Sarnoski, A. Freund, K. Shirakawa, H.W. Lim, S.S. Davis, A. Ramanathan, A.A. Gerencser, E. Verdin, and J. Campisi. 2016. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. *Cell Metab*. 23:303-314.
- Woods, D., D. Parry, H. Cherwinski, E. Bosch, E. Lees, and M. McMahon. 1997. Raf-induced proliferation or cell cycle arrest is determined by the level of Raf activity with arrest mediated by p21Cip1. *Mol Cell Biol*. 17:5598-5611.
- Wu, J., A.L. Stratford, A. Astanehe, and S.E. Dunn. 2007. YB-1 is a Transcription/Translation Factor that Orchestrates the Oncogenome by Hardwiring Signal Transduction to Gene Expression. *Transl Oncogenomics*. 2:49-65.
- Xu, Y., Y. Yang, Y. Cai, F. Liu, Y. Liu, Y. Zhu, and J. Wu. 2011. The X protein of hepatitis B virus activates hepatoma cell proliferation through repressing melanoma inhibitory activity 2 gene. *Biochem Biophys Res Commun*. 416:379-384.
- Xue, W., L. Zender, C. Miething, R.A. Dickins, E. Hernando, V. Krizhanovsky, C. Cordon-Cardo, and S.W. Lowe. 2007. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*. 445:656-660.
- Yamamoto, T., M. Ebisuya, F. Ashida, K. Okamoto, S. Yonehara, and E. Nishida. 2006. Continuous ERK activation downregulates antiproliferative genes throughout G1 phase to allow cell-cycle progression. *Curr Biol*. 16:1171-1182.
- Yi, X., V.M. Tesmer, I. Savre-Train, J.W. Shay, and W.E. Wright. 1999. Both transcriptional and posttranscriptional mechanisms regulate human telomerase template RNA levels. *Mol Cell Biol*. 19:3989-3997.
- Yoon, S., and R. Seger. 2006. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors*. 24:21-44.
- Yosef, R., N. Pilpel, N. Papisov, H. Gal, Y. Ovadya, E. Vadai, S. Miller, Z. Porat, S. Bendor, and V. Krizhanovsky. 2017. p21 maintains senescent cell viability under persistent DNA damage response by restraining JNK and caspase signaling. *EMBO J*. 36:2280-2295.
- Young, J.I., J.M. Sedivy, and J.R. Smith. 2003. Telomerase expression in normal human fibroblasts stabilizes DNA 5-methylcytosine transferase I. *J Biol Chem*. 278:19904-19908.
- Yu, L.J., B.A. Wall, J. Wangari-Talbot, and S. Chen. 2017. Metabotropic glutamate receptors in cancer. *Neuropharmacology*. 115:193-202.
- Zaidi, M.R., C.P. Day, and G. Merlino. 2008. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *J Invest Dermatol*. 128:2381-2391.
- Zhu, J., D. Woods, M. McMahon, and J.M. Bishop. 1998. Senescence of human fibroblasts induced by oncogenic Raf. *Genes Dev*. 12:2997-3007.
- Zimmer, L., U. Hillen, E. Livingstone, M.E. Lacouture, K. Busam, R.D. Carvajal, F. Egberts, A. Hauschild, M. Kashani-Sabet, S.M. Goldinger, R. Dummer, G.V. Long, G. McArthur, A. Scherag, A. Sucker, and D. Schadendorf. 2012. Atypical melanocytic proliferations and new primary melanomas in patients with advanced melanoma undergoing selective BRAF inhibition. *J Clin Oncol*. 30:2375-2383.

11. Publikationen

Stieglitz, D., S. Lamm, S. Braig, **L. Feuerer**, S. Kuphal, P. Dietrich, S. Arndt, B. Echtenacher, C. Hellerbrand, S. Karrer, and A.K. Bosserhoff. 2019. BMP6-induced modulation of the tumor micro-milieu. *Oncogene*. 38:609-621.

Feuerer, L., S. Lamm, I. Henz, M. Kappelmann-Fenzl, S. Haferkamp, S. Meierjohann, C. Hellerbrand, S. Kuphal, A.K. Bosserhoff. 2019. Role of MIA (melanoma inhibitory activity) in melanocyte senescence. *Pigment Cell and Melanoma Research (PCMR)* (in Revision).

12. Selbständigkeitserklärung

Ich, Lena Feuerer, geboren am 01.06.1984 in Landshut, erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

eigenhändige Unterschrift des Promovenden

13. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt...

- ... Prof. Dr. Anja-Katrin Bosserhoff für die intensive Betreuung meiner Doktorarbeit mit vielen hilfreichen Anregungen und lehrreichen Diskussionen. Außerdem möchte ich mich für die besondere Unterstützung und Förderung bei der Etablierung des Schülerlabors an der Universität Erlangen bedanken.
- ... Prof. Dr. Richard Warth für die Übernahme der Mentorenschaft im Rahmen des RIGel-Programms und die Erstellung des Zweitgutachtens.
- ... Dr. Sebastian Haferkamp für die Übernahme der Mentorenschaft sowie die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe ein Praktikum zu absolvieren.
- ... Silke Kuphal für die hilfreichen Diskussion in vielen Phasen der Doktorarbeit und das Korrekturlesen dieser Arbeit.
- ... Ingmar Henz für deine Unterstützung in den letzten Jahren, besonders gegen Ende der Doktorarbeit!
- ... den ehemaligen und aktuellen Kollegen und Kolleginnen der AG Bosserhoff sowie dem gesamten Institut für Biochemie für das angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit! Ganz speziell möchte ich mich bei meinen Kollegen und Freunden David, Silke, Ingmar, Janika, Mandy und Dominik bedanken, die sowohl privat als auch arbeitstechnisch alles etwas schöner gemacht haben.
- ... meinen Eltern Hanni, Peter und Gerhard, die mir durch ihre finanzielle und persönliche Unterstützung das Studium und damit auch diese Doktorarbeit erst möglich gemacht haben und trotz kleinerer Durchhänger immer an mich geglaubt haben. Zusammen mit Kurt und meinen Schwiegereltern Franz und Evi habt ihr auf vielfältige Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.
- ... meiner Frau Kati, die nun schon in der zweiten Abschlussarbeit in der Danksagung steht und das wirklich verdient hat. Danke für deine Unterstützung, dein Durchhaltevermögen und deine Geduld! Und danke, dass du immer für mich da bist.
- ... Luise und Charlotte, die zwei besten Gründe, eine Doktorarbeit zu unterbrechen.