

**Tumor-fördernde Zielgene von BRAF und damit therapeutische
Targets können von Seneszenz-auslösenden Zielgenen
unterschieden werden**

Biochemisches Institut

Der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

zur
Erlangung des Doktorgrades Dr. med.
vorgelegt von

Felix Seefried

**Als Dissertation genehmigt von der
Medizinischen Fakultät der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg**

Vorsitzender des Promotionsorgans: Prof. Dr. Markus F. Neurath

Gutachter: Prof. Dr. Silke Kuphal

Gutachter: Prof. Dr. Anja Katrin Bosserhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Februar 2022

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Abstract | 1 |
| 2 | Zusammenfassung | 2 |
| | 2.1 Hintergrund und Ziele..... | 2 |
| | 2.2 Methoden..... | 2 |
| | 2.3 Ergebnisse und Beobachtungen..... | 3 |
| | 2.4 Schlussfolgerungen | 4 |
| 3 | Einleitung..... | 5 |
| | 3.1 Entstehung..... | 5 |
| | 3.1.1 Melanozyten | 5 |
| | 3.1.2 Melanozytischer Naevus | 6 |
| | 3.1.3 Dysplastischer Naevus..... | 6 |
| | 3.1.4 Melanom..... | 7 |
| | 3.1.5 Metastasiertes Melanom | 8 |
| | 3.2 Klassifikation | 9 |
| | 3.2.1 Superfiziell spreitendes Melanom (SSM)..... | 9 |
| | 3.2.2 Noduläres Melanom (NM) | 9 |
| | 3.2.3 Lentigo-maligna-Melanom (LMM)..... | 9 |
| | 3.2.4 Akrolentiginöses Melanom (ALM)..... | 10 |
| | 3.3 Therapieoptionen..... | 10 |
| | 3.4 Melanom assoziierte BRAF Mutationen..... | 11 |
| | 3.5 Zelluläre Seneszenz..... | 13 |
| | 3.6 <i>Epidermal Growth Factor</i> -Rezeptor und dessen Ligand Amphiregulin 14 | |
| 4 | Zielsetzung | 16 |
| 5 | Ergebnisse..... | 18 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 5.1 | Auswahl BRAF abhängiger Gene | 18 |
| 5.2 | Erfolgreiche lentivirale Transduktion von Tumorzelllinien mit BRAFV600E | 19 |
| 5.2.1 | Erhöhte BRAFV600E mRNA-Expression in transduzierten Zellen . | 20 |
| 5.2.2 | Erhöhte BRAFV600E Proteinexpression in transduzierten Zellen.. | 21 |
| 5.2.3 | Erhöhte BRAFV600E Proteinexpression in transduzierten Melanozyten | 22 |
| 5.3 | Veränderung der Expressionslevel der Kandidatengene in den BRAFV600E transduzierten Tumorzelllinien | 23 |
| 5.4 | Veränderung der Expressionslevel von AREG in den BRAFV600E transduzierten Tumorzelllinien und NHEMs | 27 |
| 5.5 | <i>Amphiregulin (AREG)</i> | 30 |
| 5.5.1 | Variierende <i>AREG</i> Expression in verschiedenen Tumorzelllinien .. | 30 |
| 5.5.2 | Veränderte Zelleigenschaften bei modulierter <i>AREG</i> Expression .. | 33 |
| 5.5.2.1 | Verringerung der <i>AREG</i> Expression durch siRNA- <i>Knockdown</i> . | 33 |
| 5.5.2.2 | Erhöhte Proliferation und Migration durch verringerte <i>AREG</i> Expression | 34 |
| 5.5.2.3 | Verbesserte Sphäroidbildung durch verringerte <i>AREG</i> Expression | 35 |
| 5.5.2.4 | Erhöhte <i>AREG</i> Expression durch Transfektion eines <i>AREG</i> Expressionsvektors..... | 36 |
| 5.5.2.5 | Verringerte Proliferation bei erhöhter <i>AREG</i> Expression..... | 37 |
| 5.5.3 | Immunhistochemischer Nachweis der intrazellulären Lokalisation von <i>AREG</i> in Melanomstanzen | 38 |
| 5.5.4 | Einfluss von Amphiregulin auf Seneszenz im Melanom | 42 |
| 6 | Diskussion | 44 |
| 6.1 | BRAF-Mutationen in Seneszenz und Tumorentstehung | 44 |
| 6.2 | BRAFV600E abhängige Regulation von Genen | 45 |
| 6.3 | <i>AREG</i> in BRAFV600E Abhängigkeit | 48 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 6.3.1 | AREG reguliert Proliferation und Migration in Melanomzellen..... | 51 |
| 6.3.2 | AREG induziert Seneszenz in NHEMs..... | 53 |
| 6.3.3 | AREG induziert keine Seneszenz in Melanomzellen..... | 53 |
| 6.3.4 | AREG als Tumorsuppressor im Melanom..... | 53 |
| 6.4 | Fazit | 54 |
| 7 | Material | 56 |
| 7.1 | Verbrauchsmaterial | 56 |
| 7.2 | Reagenzien..... | 58 |
| 7.3 | Medien und Puffer für Zellkultur..... | 61 |
| 7.4 | Kits..... | 61 |
| 7.5 | Antikörper..... | 63 |
| 7.5.1 | Primäre Antikörper | 63 |
| 7.5.2 | Sekundäre Antikörper..... | 63 |
| 7.6 | Puffer und Lösungen..... | 65 |
| 7.7 | siRNAs | 67 |
| 7.8 | Oligonukleotide für quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) | 67 |
| 7.9 | Geräte | 70 |
| 7.10 | Software..... | 73 |
| 7.11 | Zelllinien | 73 |
| 8 | Methoden | 75 |
| 8.1 | Bestimmung von Zellzahl..... | 75 |
| 8.2 | Kultivierung humaner Tumorzelllinien..... | 75 |
| 8.3 | Generierung von Zellpellets..... | 75 |
| 8.4 | Transfektion von humanen Zellen..... | 76 |
| 8.4.1 | Vektor Transfektion | 76 |
| 8.4.2 | siRNA Transfektion..... | 76 |
| 8.4.3 | Lentivirale Transduktion | 77 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 8.5 | Plasmid Herstellung | 78 |
| 8.5.1 | Transformation | 78 |
| 8.5.2 | Plasmid Isolation (Mini/Midi) | 78 |
| 8.5.3 | Restriktionsverdau | 79 |
| 8.6 | Sphäroid Assay | 79 |
| 8.7 | xCELLigence/RTCA | 79 |
| 8.8 | RNA Isolation aus Zellen | 80 |
| 8.9 | Messung der RNA- und DNA-Konzentration | 81 |
| 8.10 | Reverse Transkription | 81 |
| 8.11 | Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) | 82 |
| 8.12 | Agarose-Gelelektrophorese | 83 |
| 8.13 | Proteinextraktion | 84 |
| 8.14 | Bestimmung der Proteinkonzentration | 84 |
| 8.15 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) | 84 |
| 8.16 | Proteindetektion mittels Western Blot | 85 |
| 8.17 | Immunhistochemie | 85 |
| 8.18 | SA-β-Galaktosidase-Färbung zum Nachweis seneszenten Zellen | 86 |
| 8.19 | Seneszenzinduktion mittels Etoposid | 87 |
| 9 | Abkürzungsverzeichnis | 88 |
| 10 | Literaturverzeichnis | 90 |
| 11 | Danksagung | 100 |
| 12 | Erklärung | 101 |

1 Abstract

Malignant melanoma with its high metastatic potential and metastasis at early tumour stages is one of the deadliest cancers worldwide.

Some melanocytic cells in BRAFV600E mutated nevi show the phenomenon of senescence, the absence of proliferative activity. Though, a small subset of these mutated nevi eventually evolves into malignant melanoma. Further mutations or molecular alterations in BRAF-dependent genes could either contribute to the maintenance of a senescence cell state or on the contrary be involved in malignant degeneration and tumour progression. To identify and further characterise these BRAF dependent genes, a variety of possible BRAF target genes was chosen and analysed due to BRAFV600E dependent expression. Analyses showed a striking connection between BRAFV600E mutation and the regulation of the gene AREG.

BRAFV600E induces mRNA expression of AREG in wildtype BRAF NHEM, two wildtype BRAF melanoma cell lines and in one BRAFV600E mutated melanoma cell line. While protein levels were respectively increased in wildtype BRAF melanoma cell lines, we found AREG protein expression repressed in the melanoma cell line with endogenous BRAFV600E mutation. Tumour suppressive characteristics of AREG were found in AREG knockdown experiments. These findings can be supported by *in silico* analyses of patient data. AREG dependent induction of senescence in melanoma cell lines could not be proven.

2 Zusammenfassung

2.1 Hintergrund und Ziele

Das maligne Melanom mit seiner stetig steigenden Inzidenz ist eine der tödlichsten Krebsformen weltweit. Grund für den aggressiven und rasanten Krankheitsverlauf ist unter anderem das hohe Metastasierungspotenzial und die Bildung von Tumormetastasen zu einem ungewöhnlich frühen Zeitpunkt der Erkrankung. Wie bereits bekannt, ist die BRAFV600E Mutation ein entscheidender Faktor bei der Entstehung von Melanomen. Es ist allerdings auch bekannt, dass die alleinige Mutation von BRAF zelluläre Seneszenz auslöst und nicht zur Entartung von Naevi und damit zur Tumorbildung führt. Aufgrund dessen wurde in dieser Arbeit versucht, Zielgene von BRAF zu identifizieren und eine Unterscheidung in Seneszenz-fördernde und tatsächlich Tumor-fördernde und damit mögliche therapeutische Zielgene durchzuführen. Ziel des Forschungsansatzes ist es, spezifische Gene zu definieren, welche die *onkogene driver* Mutation BRAFV600E unterstützen, um Melanome zu initiieren. Es ist wichtig zu definieren, was melanozytäres Wachstum fördert und was es stoppt.

2.2 Methoden

Zu Beginn der Arbeit erfolgte eine Auswahl verschiedener Gene durch *in silico* Analysen von verschiedenen Datenbanken. Des Weiteren wurden Melanozyten und Melanomzellen in Zellkultur angezchtet und deren Genexpression mithilfe von siRNAs, Vektorkonstrukten und lentiviraler Transduktion moduliert. Danach erfolgte eine Expressionsanalyse der ausgewählten Gene in den behandelten Zellen mithilfe von qRT-PCR und Western Blot Techniken. In weiterführenden Experimenten wurden durch *Real-Time-Cell-Analysis* (RTCA) und Sphäroidassays die veränderten Proliferations- und Migrationseigenschaften bei veränderter Genexpression in den Zellen untersucht. Seneszenzinduktion durch spezifische Reagenzien wurde über eine Seneszenz-assoziierte- β -Galaktosidase-Färbung (SA- β -Gal) visualisiert. Darüber

hinaus wurden Gewebestanzten aus Melanompatienten mithilfe von immunhistochemischen Färbungen analysiert.

2.3 Ergebnisse und Beobachtungen

Es konnten zehn Kandidatengene, welche im Zusammenhang mit einer BRAFV600E Mutation in NHEMs und Melanomzelllinien differentielle Expressionsmuster zeigten, für diese Arbeit durch das Auswerten zweier Datenbanken identifiziert werden. In einem ersten Schritt der Arbeit wurden verschiedene Melanomzelllinien erfolgreich mit einem lentiviralen BRAFV600E Konstrukt transduziert. Die erfolgreiche Transduktion zeigte sich sowohl in erhöhter mRNA Expression von BRAF in qRT-PCR als auch in erhöhter Proteinexpression von BRAFV600E in Western Blot Analysen. Als Nächstes wurden die ausgewählten Kandidatengene auf ihre veränderte Expression in den mit BRAFV600E transduzierten Zellen getestet. Bei den Genen *EDIL3* und *TFPI2* konnte keine stabile qRT-PCR etabliert werden. Die Gene *SULF1*, *CRABP2*, *DUSP6* und *CDCP1* zeigten in den BRAFV600E transduzierten Zellen keine signifikante Veränderung der mRNA Expression. Aufgrund dessen wurden diese sechs Gene in dieser Arbeit nicht weiter analysiert. *NPTX2*, *SERPINB2* und *SLC16A6* wurden ebenfalls in allen transduzierten Tumorzelllinien auf veränderte mRNA Expression analysiert. Alle drei Gene zeigten in primären Melanozyten (NHEMs) und/oder in Melanomzellen eine Beeinflussung der mRNA Expression durch BRAFV600E.

Das Gen *AREG* wurde ebenfalls in transduzierten Tumorzelllinien mittels qRT-PCR und Western Blot und zusätzlich in transduzierten NHEMs mit qRT-PCR überprüft. Auf mRNA Ebene zeigte sich sowohl in den Tumorzelllinien als auch in den NHEMs eine signifikante Erhöhung der *AREG* Expression. Auf Proteinebene ergab sich bei zwei Tumorzelllinien mit Wildtyp BRAF eine erhöhte und bei einer Tumorzelllinie mit BRAFV600E Mutation eine erniedrigte *AREG* Expression. Die *AREG* Analyse wird in dieser Arbeit besonders hervorgehoben, weil die Ergebnisse bei diesem Gen am signifikantesten sind.

Eine Analyse verschiedener Zelllinien mit unterschiedlichem Mutationsstatus und Tumorstadium wies lediglich eine Tendenz zu erhöhter *AREG* Proteinexpression in nicht BRAF mutierten Melanomzelllinien auf.

Durch einen siRNA vermittelten AREG Knockdown wurden die Einflüsse von AREG auf Proliferation und Migration getestet. Dabei zeichnete sich in den Experimenten eine signifikant erhöhte Proliferation und Migration bei gleichzeitig erniedrigter AREG Expression ab. Zusätzlich zeigte sich eine signifikant verbesserte Sphäroidbildung bei den AREG Knockdown Zellen. Im Anschluss an den Knockdown Versuch wurde durch eine AREG Vektor Transfektion eine Überexpression herbeigeführt. Bei den Zellen mit erhöhter AREG Expression konnte eine Tendenz zu einer reduzierten Proliferation festgestellt werden.

Eine im weiteren Verlauf der Arbeit durchgeführte immunhistochemische Färbung sollte Aufschluss über Zusammenhänge von AREG Lokalisation und Tumorprogression bzw. Mutationsstatus geben. Dabei konnte keine Abhängigkeit von dem jeweiligen Mutationsstatus gezeigt werden. Bei der Lokalisation, abhängig von der Tumorprogression, war eine vorwiegende Expression von AREG in den Kernen von Naevi- und Primärtumorstanzen, jedoch keine vorwiegende Lokalisation bei Metastasen, zu erkennen. Bei Experimenten zum Einfluss von AREG auf Seneszenzinduktion in Tumorzelllinien zeigte sich sowohl bei verringerter AREG Expression als auch bei Zugabe von rekombinantem AREG keine Veränderung gegenüber den Kontrollen.

2.4 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit konnte am Beispiel des Moleküls AREG gezeigt werden, dass BRAF abhängige Zielgene identifiziert werden können und in weiteren Untersuchungen eine Unterscheidung zwischen Seneszenz- oder Tumor-fördernden Eigenschaften der jeweiligen Zielgene möglich ist. Dabei konnte in diesem Forschungsansatz eine BRAFV600E abhängige Regulation von AREG in Melanomzellen aufgedeckt werden. Bei erhöhter Expression in nicht BRAF mutierten Melanomzellen wirkt AREG als Tumorsuppressor, wohingegen es bei BRAF mutierten Melanomzellen mit geringer Expression von AREG diese tumorsuppressive Wirkung nicht mehr erfüllen kann. Dagegen konnten vorläufige Untersuchungen erkennen lassen, dass AREG neben seiner Funktion als Tumorsuppressor wahrscheinlich keine seneszenzinduzierende Wirkung in Melanomzellen besitzt.

3 Einleitung

Das maligne Melanom ist eine der tödlichsten Krebsformen überhaupt und der Hauttumor mit dem höchsten Metastasierungspotential. Dieses ist für 90 % der Mortalität bei Patientin mit Hautkrebs verantwortlich (C. Garbe 2019). Die Inzidenz des Melanoms ist in den letzten Jahren stetig gestiegen und hat sich dabei seit den 70er Jahren in Deutschland verfünffacht (Robert Koch Institut 2016). Aktuelle Zahlen der WHO zeigen weltweit eine Inzidenz von über 287 000 Neuerkrankungen und eine Sterblichkeit von über 60 000 Patienten pro Jahr (Globocan 2018). Des Weiteren wird davon ausgegangen, dass die Inzidenzraten weiter ansteigen. Dabei soll es bei Männern in 20 Jahren und bei Frauen in 30 Jahren zu einer Verdopplung der Inzidenzraten kommen (C. Garbe 2019). Die Prognosen für das Jahr 2020 gehen davon aus, dass 20,7 Frauen und 21,3 Männer je 100.000 Einwohner am malignen Melanom erkranken werden (Robert Koch Institut 2016).

3.1 Entstehung

3.1.1 Melanozyten

Melanozyten sind diejenigen Zellen, die über die Produktion von Melanin für die Pigmentierung unserer Haut, unserer Haare und unserer Augen verantwortlich sind. Darüber hinaus schützt uns das produzierte Melanin vor UV-Strahlung und damit einhergehenden DNA-Schäden (Kondo und Hearing 2011). In der menschlichen Haut befinden sich ca. 3 Milliarden Melanozyten, was einer Anzahl von 1500 Melanozyten pro Quadratmillimeter Haut entspricht (Kanitakis 2002). Diese Melanozyten produzieren zwei verschiedene Arten von Melanin, das häufigere braun-schwarze Eumelanin und das rötlich-gelbe Pheomelanin, welches überwiegend bei Menschen mit Hauttyp 1 vorkommt. Melanin wird nach der Synthese an die umliegenden Keratinozyten abgegeben (Thody et al. 1991). Während Eumelanin vor allem protektive Eigenschaften besitzt und DNA-Schäden verhindert, trägt Pheomelanin bei Sonneneinstrahlung zur Radikalbildung in der menschlichen Haut bei und gilt daher eher als toxisch (Ito et al. 2018). In der menschlichen Entwicklung migrieren Zellen aus

der Neuralleiste über den dorsolateralen Pfad in die Dermis und entwickeln sich zu Melanozyten (Erickson und Goins 1995). Diese befinden sich letztendlich nicht nur in der Haut, sondern lassen sich auch in der Cochlea, der Leptomenix, der Substantia Nigra und dem Gehirn wiederfinden (Plonka et al. 2009).

3.1.2 Melanozytischer Naevus

Ein Naevus besteht aus Zellen, welche sich im Vergleich zu normalen Melanozyten in mehreren Eigenschaften unterscheiden. Melanozyten unterliegen einer kontaktabhängigen Wachstumsinhibition, die dafür sorgt, dass sich die Zellen vereinzelt in der Epidermis befinden und keine Zellverbände bilden. Naevuszellen verlieren diese Wachstumsinhibition und bilden kleine Zellverbände, welche dann als der eigentliche Naevus auf der Haut sichtbar werden. Außerdem verlieren Naevuszellen die melanozytären Fortsätze und zeigen eine Pigmentretention im Zytoplasma (Smolle et al. 1992). In der Regel entsteht ein Naevus in den ersten 20 Lebensjahren und bildet sich ab dem 60. Lebensjahr wieder zurück (Zalaudek et al. 2011). Naevi können entweder als kongenitale Naevi bereits bei der Geburt vorhanden sein oder als erworbene Naevi erst im Lauf des Lebens entstehen. Viele Naevi, ob kongenital oder erworben, besitzen eine aktivierende Mutation des MAP-Kinase Signalwegs, oft eine BRAFV600E Mutation (Pollock et al. 2003). Dabei führt die BRAFV600E Mutation zunächst zu erhöhter Proliferation und der damit einhergehenden Naevus Entstehung, bevor der gebildete Naevus in einen seneszenzartigen Zustand übergeht, in dem er nicht weiter wächst (Michaloglou et al. 2005). Durch zusätzliche Mutationen und Faktoren aber können Naevi dennoch weiterhin proliferieren und letztendlich entarten (Tran und Rizos 2013).

3.1.3 Dysplastischer Naevus

Dysplastische Naevi stellen eine Zwischenform vom benignen Naevus zum malignen Melanom dar. Dabei zeigen sich dysplastische Naevi sowohl bei Menschen mit einem bereits diagnostizierten Melanom, aber auch bei Menschen ohne jegliche Form des Melanoms. Des Weiteren kommen sie sowohl sporadisch als auch syndromal vor (Kanzler und Mraz-Gernhard 2001). Die klinische Definition eines dysplastischen

Naevus setzt eine Größe von über 5 mm Durchmesser mit einer bräunlichen Farbe voraus. Darüber hinaus müssen noch zwei weitere der drei Kriterien ungleiche Pigmentierung, Asymmetrie und unscharfe Begrenzung erfüllt sein (Tucker et al. 1997). Dysplastische Naevi können nach histologischen Kriterien in die drei verschiedenen Gruppen geringes, mäßiges und hohes Risiko, bezogen auf die Wahrscheinlichkeit der Entstehung eines Melanoms, eingeteilt werden (Arumi-Uria et al. 2003). Im Vergleich zu den melanozytären Naevi, die meist eine einzelne BRAFV600E Mutation besitzen, kommen in dysplastischen Naevi vor allem NRAS und andere BRAF Mutationen in Verbindung mit weiteren Veränderungen wie einer TERT, CDK4 oder CDKNA2 Mutation vor (Shain et al. 2015; Goldstein et al. 2007; Zuo et al. 1996).

3.1.4 Melanom

Noch nicht metastasierte Melanome können grob in zwei Gruppen, nämlich RGP (*radial growth phase*) und VGP (*vertical growth phase*), unterschieden werden. Bei den RGP Melanomen handelt es sich um die erste Phase der Melanomentstehung, in welcher maligne Zellen oberhalb der Basalmembran proliferieren (Piscioli et al. 2016). Nach längerer Zeit kann es dazu kommen, dass einzelne Zellen über die Basalmembran hinweg in die Dermis einwachsen. Dieses Stadium wird bei fehlenden Mitosen als nicht tumoröses „*micro invasive*“ RGP bezeichnet, welches kein Metastasierungspotential besitzt. Bei weiterer Proliferation hingegen können diese Läsionen in die nächste Stufe der Melanomentstehung, das VGP Melanom, übergehen (Roncati und Piscioli 2018). Diese VGP Melanome sind durch zwei Merkmale, die entweder gemeinsam oder getrennt voneinander auftreten können, gekennzeichnet. Eines dieser Merkmale stellen die dermalen Mitosefiguren dar, welche ein Zeichen von Proliferation darstellen. Das andere Merkmal sind dermale Tumorknoten, größer als jegliche in der Epidermis gelegene Knoten (Gimotty et al. 2005). VGP Melanome besitzen im Gegensatz zu RGP Melanomen aufgrund ihres invasiven Wachstums in der Dermis ein erhöhtes Potential für Fernmetastasierung (Roncati und Piscioli 2018).

Zur Früherkennung des Melanoms wird in der Praxis die ABCDE Regel angewandt. Hiermit werden Eigenschaften eines melanomverdächtigen Naevus beschrieben. A beschreibt eine asymmetrische Form des Naevus, B steht für ungenaue Begrenzung,

C bezieht sich auf ein ungleiches Colorit, ein Durchmesser über 5 mm wird mit D bezeichnet, während E die Erhabenheit des Naevus angibt (Abbildung 1) (Franziska Walz 2017).

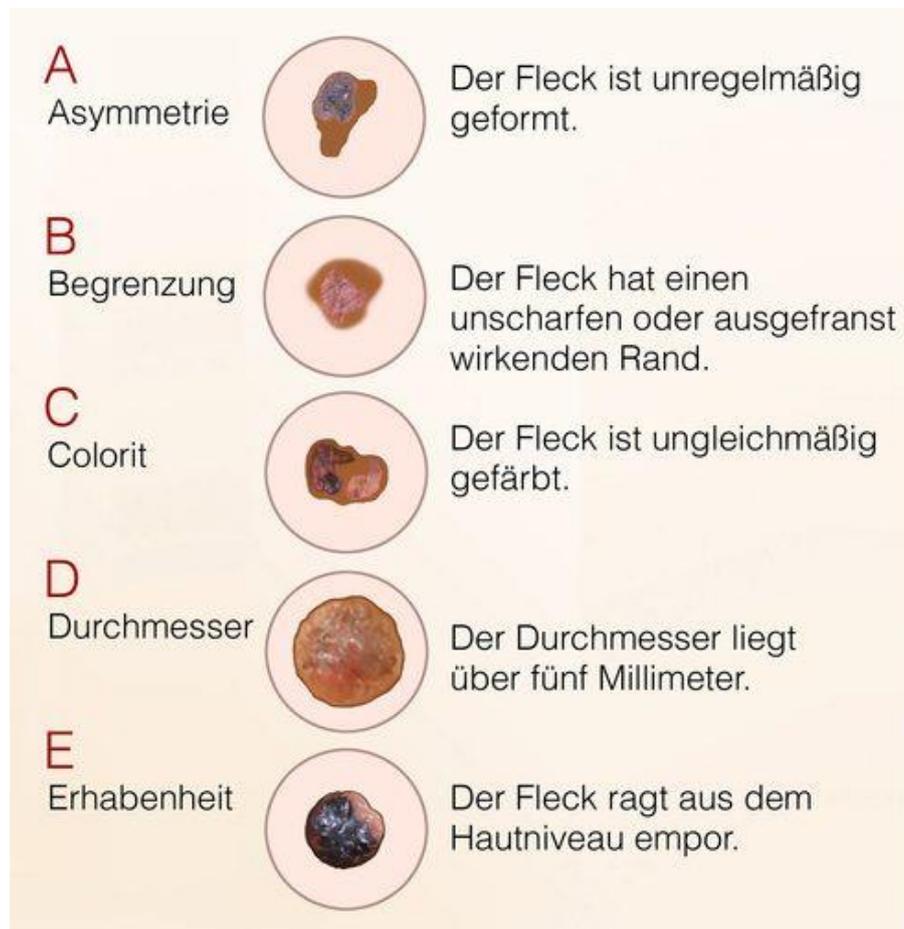


Abbildung 1: ABCDE Regel zu Früherkennung eines malignen Melanoms.

Merkmale, die in der Praxis für die Unterscheidung zwischen unbedenklichen und bedenklichen Naevi herangezogen werden (Franziska Walz 2017)

3.1.5 Metastasiertes Melanom

Bei metastasierten Melanomen können drei verschiedene Ausbreitungsarten unterschieden werden. Zunächst können sich lokal fortgeschrittene Metastasen bilden, die vorwiegend in der benachbarten Haut zu finden sind. Dabei werden je nach Abstand vom jeweiligen Primarius *in-transit*- und Satelliten-Metastasen unterschieden. Bei der nächsten Ausbreitungsstufe handelt es sich um regionale bzw. Lymphknotenmetastasen. Als letzte Stufe der Ausbreitung kann es auch zu einer Fernmetastasierung in verschiedenste Organe kommen (Elder 2016).

3.2 Klassifikation

3.2.1 Superfiziell spreitendes Melanom (SSM)

Das superfiziell spreitende Melanom ist das am häufigsten vorkommende Melanom weltweit. In der weißen Bevölkerung nimmt es einen Anteil von ca. 70 % aller malignen Melanome ein. Bevorzugt kommt es bei Frauen an der Rückseite der Beine oder bei Männern auf dem Rücken vor (Newell et al. 1988). Das SSM ist mit einer intermittierenden Sonnenexposition assoziiert und zeigt unterschiedlichste Farbtöne von hellbraun, braun, grau, schwarz, rötlich, pink, violett und selten auch blau oder weiß. Bei der Inspektion der Haut zeigen sich scharf begrenzte, unregelmäßig gefärbte Plaques oder Knoten mit halbinselförmigen Ausläufern (Duncan 2009).

3.2.2 Noduläres Melanom (NM)

Das Noduläre Melanom ist mit einem Anteil von 20 % das am zweit häufigsten vorkommende maligne Melanom in der weißen Bevölkerung. Inspektorisch zeigt sich ein meist homogener braunschwarzer Knoten, welcher in vielen Fällen ulzeriert und eine starke Blutungsneigung hat. Das NM kann in speziellen Fällen auch als amelanotische Sonderform mit einer rötlichen Farbe auftreten. Darüber hinaus wächst das NM im Gegensatz zu allen anderen Formen nicht primär horizontal (RGP), sondern vertikal (VGP), was im Allgemeinen mit einer schlechteren Prognose einhergeht (Sterry 2018). Das NM ist wie auch das SSM mit intermittierender Sonnenexposition assoziiert (Duncan 2009).

3.2.3 Lentigo-maligna-Melanom (LMM)

Bei einem Lentigo-maligna-Melanom handelt es sich meist um ein recht großes, flaches und irregulär begrenztes Melanom mit brauner bis schwarzer Pigmentierung (Duncan 2009). Das LMM hat einen Anteil von 5 – 10 % an den malignen Melanomen der weißen Bevölkerung und kommt vor allem bei älteren Menschen im Gesichtsbereich vor. Es zeigt ein vorwiegend langsames, horizontales

Wachstumsmuster (RGP) mit meist guten Prognosen (Sterry 2018). Diese Art des Melanoms wächst über Jahrzehnte langsam in der durch lange chronische Sonnenexposition geschädigten Haut, bevor es zu einer Invasion in die Dermis kommt (Markovic et al. 2007).

3.2.4 Akrolentiginöses Melanom (ALM)

Das Akrolentiginöse Melanom ist in der weißen Bevölkerung eher selten und nur mit 5 % vertreten. Im Gegensatz dazu ist es aber bei Menschen mit asiatischer, afrikanischer oder spanischer Abstammung die am häufigsten vorkommende Melanomart. Das ALM tritt bei älteren Menschen bevorzugt bei Frauen an den Füßen und Händen, hier des Öfteren auch subungual an den Fingern, auf (Markovic et al. 2007).

3.3 Therapieoptionen

Die Therapieoptionen des malignen Melanoms unterscheiden sich je nach Fortschritt des Tumorstadiums. Dabei kommt bei nur lokalen Tumorstadien eine chirurgische Therapie in Frage. Bei bereits weiter fortgeschrittenen Melanomen ist eine kombiniert medikamentös systemische Therapie in Betracht zu ziehen. Bei der chirurgischen Therapie von lokalen Melanomen wird das Ausmaß der Resektionsweite anhand des T-Stadiums des TNM-Systems bestimmt (Swetter et al. 2019). Bei nicht resezierbaren Melanomen wird aktuell eine Immuntherapie empfohlen (Onkologie 2019). Dabei zeigt sich die Kombination aus PD1 - Antikörpern wie Pembrolizumab und Nivolumab mit CTLA-4 Antikörpern wie Ipilimumab gegenüber einer Monotherapie als überlegen (Larkin et al. 2015). Bei Melanomen, in welchen eine BRAFV600 Mutation festgestellt wurde, sollte zusätzlich zur Immuntherapie eine Kombination aus BRAF- und MEK-Inhibitoren verabreicht werden (Onkologie 2019). Durch die zusätzliche Gabe von MEK-Inhibitoren kann einer Resistenzbildung vorgebeugt und die toxische Wirkung der BRAF-Inhibitoren reduziert werden (Eroglu und Ribas 2016). Nach erfolgloser Immuntherapie und bei nachgewiesenen c-Kit-Inhibitor sensitiven c-Kit Mutation kann eine Therapie mit c-Kit-Kinaseinhibitoren durchgeführt werden (Onkologie 2019). Eine klassische Chemotherapie kommt nur bei Patienten mit Therapieversagen der bereits

genannten Optionen in Betracht. Dabei zeigten sich sowohl bei Mono- als auch bei Polychemotherapien keine verbesserten Überlebensraten der Patienten (Onkologie 2019).

3.4 Melanom assoziierte BRAF Mutationen

BRAF Mutationen nehmen eine wichtige Rolle in der Entstehung, Progression und Therapie des Melanoms ein. Dies zeigt sich bereits daran, dass ca. 50 % aller diagnostizierten Melanome eine BRAF Mutation besitzen. Dabei kann das BRAF Gen an unterschiedlichsten Stellen mutiert sein. Die mit Abstand am häufigsten vorkommende Mutation ist die Punktmutation V600E, wobei auch V600K und V600R Mutationen dokumentiert sind. Darüber hinaus ist die BRAFK601 Mutation zu beachten, welche am zweithäufigsten vorkommt (Genomic Classification of Cutaneous Melanoma 2015). Die BRAFV600E Mutation kommt dabei vor allem bei jüngeren Patienten und Melanomen von gelegentlich sonnenexponierter Haut vor (Davis et al. 2018). Die BRAF Mutationen stellen meist eine aktivierende Mutation dar, welche über die MEK und ERK Phosphorylierung und der damit einhergehenden Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs zu zellulärem Wachstum und der Inhibition von Apoptose führen (Abbildung 2) (Sharma et al. 2005).

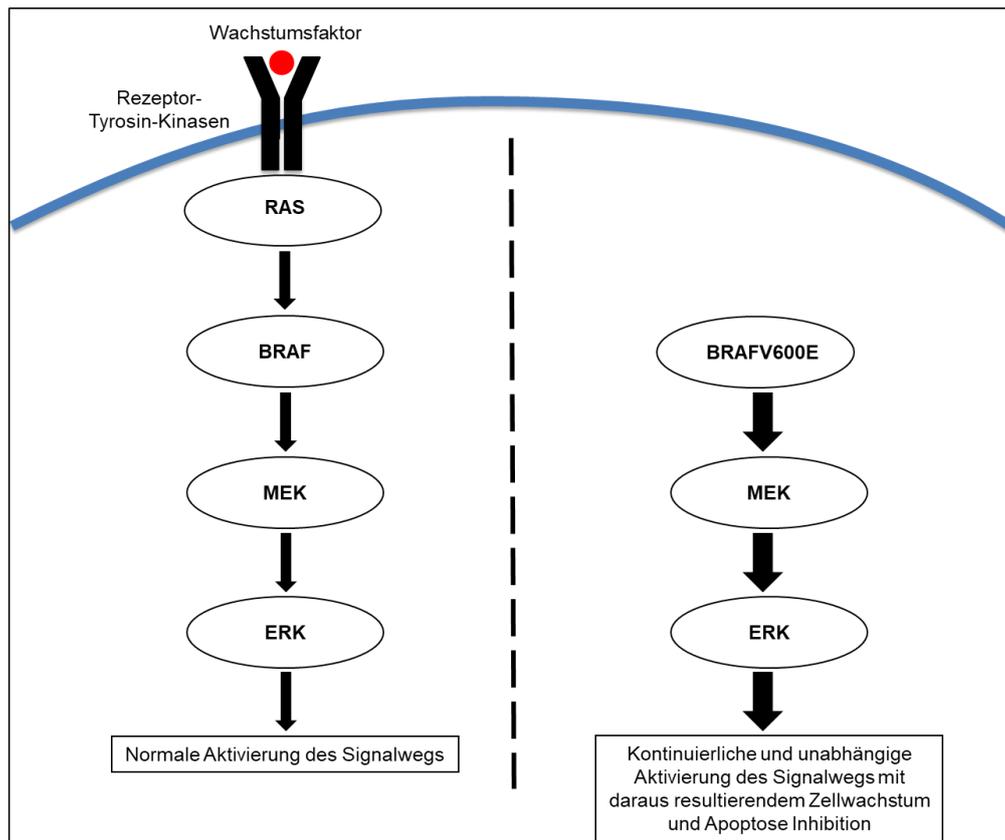


Abbildung 2: MAP-Kinase Signalweg bei normaler und kontinuierlicher Aktivität durch die BRAFV600E Mutation.

Links: normaler MAP-Kinase Signalweg bei Aktivierung über Rezeptor-Tyrosin-Kinasen mit normalem Zellwachstum. Rechts: dauerhaft aktivierter Signalweg unabhängig von der Aktivierung über die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen durch die BRAFV600E Mutation und daraus resultierendes dauerhaftes Zellwachstum und Apoptose Inhibition.

In über 80 % der melanozytären Naevi zeigte sich eine aktivierende BRAF Mutation (Pollock et al. 2003). Der größte Teil dieser Naevi entwickelt sich jedoch nie zu einem Melanom, weshalb die BRAF Mutation alleine keinen Auslöser für die Entstehung eines malignen Melanoms darstellen kann (Dong et al. 2003). Somit ergibt sich, dass die aktivierende BRAF Mutation einen positiven Einfluss auf das Wachstum und die Förderung des malignen Melanoms hat, nicht aber der alleinige Auslöser der Melanomentstehung sein kann. Um die zellulären Vorgänge und Mechanismen in BRAF mutierten Naevuszellen zu untersuchen und verstehen zu lernen, entwickelten Michaloglou *et al.* 2005 ein Zellkulturmodell bestehend aus Melanozyten, welche retroviral mit einem BRAFV600E Konstrukt transduziert wurden (Michaloglou et al. 2005). Mit diesem Modell war es ihm möglich zu zeigen, dass die BRAFV600E Mutation in Melanozyten Seneszenz und Zell-Zyklus Arrest initiiert (Michaloglou et al.

2005). Seither wird dieses Zellkulturmodell in der Melanomforschung weltweit häufig verwendet.

3.5 Zelluläre Seneszenz

Zelluläre Seneszenz beschreibt einen spezifischen Zustand von Zellen, charakterisiert durch Zellzyklusarrest, sowie Veränderungen in Genexpression, Metabolismus und dem Epigenom (Coppé et al. 2008). Dieser Zustand limitiert die proliferative Lebensspanne der Zellen als Reaktion auf intrinsischen Stress. Der senescente Zustand einer Zelle kann durch mitogene Stimuli in der Regel nicht aufgehoben werden (Campisi 2005). Neben der physiologisch ausgelösten replikativen Seneszenz als Reaktion auf das Verkürzen der Telomere nach einer gewissen Anzahl von Zellteilungen existieren auch noch die sogenannte Onkogen induzierte Seneszenz und stressinduzierte Seneszenz (HAYFLICK und MOORHEAD 1961). Die Onkogen induzierte Seneszenz wird, wie der Name beschreibt, durch aktivierende Onkogene ausgelöst, während stressinduzierte Seneszenz durch verschiedenste Stressoren wie DNA-Schäden oder ROS (*reactive oxygen species*) ausgelöst werden kann (Höhn et al. 2017; Peeper 2011).

Durch den Zellzyklusarrest im Zuge der Seneszenz verändern sich die Expressionsmuster der Zellzyklusmarker. Diese können dann zum Nachweis von Seneszenz verwendet werden (Hernandez-Segura et al. 2018). Als Goldstandard zum Nachweis zellulärer Seneszenz gilt die sogenannte SA- β -Gal-Färbung. Diese weist die lysosomale Akkumulation von Seneszenz-assoziiierter β -Galactosidase nach. Der Nachweis beruht auf der Durchführung der Färbung bei einem für das Enzym suboptimalen pH-Wert von 6,0 (optimaler pH: 4,5). Ein blauer Farbumschlag, der als Nachweis für die Enzymaktivität gilt, findet nur in seneszenten Zellen statt (Itahana et al. 2007; Lee et al. 2006).

3.6 Epidermal Growth Factor-Rezeptor und dessen Ligand Amphiregulin

Der *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) gehört zu der ErbB Familie der Tyrosin-Kinase Rezeptoren und besteht aus transmembranen Glykoproteinen. Durch die Aktivierung des EGFR und die damit verbundene Phosphorylierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen kommt es zu einer Aktivierung von verschiedensten Signalwegen. Die aktivierten Signalwege spielen vor allem bei der Proliferation, Differenzierung und dem Überleben von Zellen eine wichtige Rolle. Eine unnatürliche Aktivierung des EGFR ist häufig in der Entstehung verschiedenster Krebsarten involviert (Singh et al. 2016). Der EGFR spielt weiterhin eine wichtige Rolle im Melanom und dessen Therapie. Dabei konnte durch Sun et. al. 2014 gezeigt werden, dass es bei Patienten, welche eine Therapie mit BRAF Inhibitoren erhielten, durch eine reaktive Erhöhung des EGFR zu Resistenzen gegenüber den Medikamenten kam (Sun et al. 2014).

Amphiregulin (AREG) gehört zu den Liganden des EGF-Rezeptors und wurde zuerst in einer Zelllinie eines Adenokarzinoms der Mamma beschrieben (Shoyab et al. 1988). Dabei zeigte sich ein bifunktionelles Verhalten von AREG, indem es je nach Zellart einen positiven oder negativen Einfluss auf die jeweilige Proliferation und Differenzierung nahm. Deshalb erhielt es damals auch den Namen *Amphi-regulin*.

Das AREG Protein wird als 252 Aminosäuren langer transmembranöser Vorläufer (Pro-AREG) synthetisiert. An der Plasmamembran wird pro-AREG sequenziell proteolytisch innerhalb seiner Ektodomäne an der Stelle Lys 187 geschnitten und dann als lösliches AREG Protein freigesetzt. Pro-AREG kann juxtakrin, das reife AREG auch autokrin und parakrin wirken. Bekannt ist, dass AREG als Ligand an den EGF-Rezeptor bindet. Infolgedessen werden die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktiviert. Dies führt zur weiteren Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs und damit zu Proliferation. Andererseits wird durch die Aktivierung der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen auch der PI3K Signalweg angestoßen, welcher das Zellüberleben fördert (Abbildung 3) (Berasain und Avila 2014).

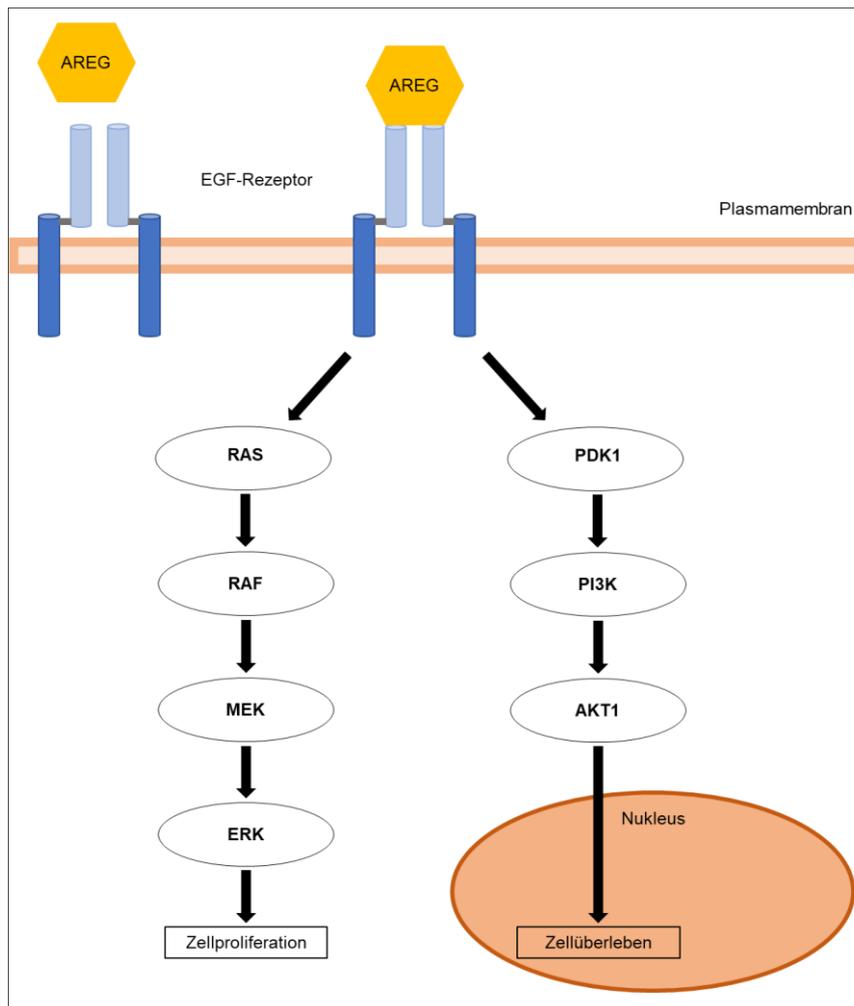


Abbildung 3: Signalwege bei Aktivierung des EGF-Rezeptors durch AREG.

Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs über RAS, RAF, MEK und ERK führt zu Zellproliferation. Aktivierung des PI3K Signalwegs über PDK1 und AKT1 führt im Nukleus zu Zellüberleben.

Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass das Glykoprotein AREG das Wachstum von MCF-7, einer Zelllinie aus einem Adenokarzinom der Mamma, hemmen konnte (Shoyab et al. 1988). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei besonders schnell wachsenden Keratoakanthomen ein gleichgerichteter Zusammenhang zwischen Proliferation und *AREG* Expression. Durch artifizielle Erhöhung von AREG in Keratinozyten konnte die Proliferation gefördert und Tumorentstehung initiiert werden (Billings et al. 2003). Aufgrund der unterschiedlichen Auswirkungen von *AREG* braucht es auch eine differenzierte Betrachtung von *AREG* in verschiedenen Zellarten. Deshalb und angesichts mangelnder Untersuchung von *AREG* im Melanom wurde dessen Rolle in dieser Arbeit weiter analysiert.

4 Zielsetzung

Ziel des Forschungsansatzes ist es spezifische Gene zu definieren, welche die *onkogene driver* Mutation BRAF auf epigenetische Weise unterstützen, um Melanome zu initiieren. Gerade hinsichtlich der Rolle von BRAF in der Seneszenz ist es wichtig zu definieren, was melanozytäres Wachstum im BRAF Kontext fördert und stoppt.

Im Rahmen des Dissertationsprojektes sollen mithilfe der bereits im Labor vorliegenden Array Analysen zunächst Gengruppen *in silico* definiert werden. Darunter bildet sich die Schnittmenge (1) (Abbildung 4), auf die es zu fokussieren gilt. In dieser Schnittmenge befinden sich Gencluster, welche beim Vergleich der Gruppen NHEM (normale humane epidermale Melanozyten) /BRAFmut versus NHEM/GFP (Kontrolle), entweder eine gesteigerte oder verminderte Expression aufweisen und welche zusätzlich in Melanomzelllinien mit endogen mutiertem BRAF (MM/BRAFmut) versus Melanozyten ebenso wiederzufinden sind. Unsere Hypothese ist, dass diese neu definierten Gene gemeinsam mit BRAF-V600E an frühen Prozessen der Melanom Entstehung beteiligt sind (Abbildung 4). Die Gengruppe der Menge (2) soll ebenfalls *in silico* definiert werden, wird aber aus Zeitgründen im Rahmen dieser Dissertation nicht weiter charakterisiert. In der Menge (2) befinden sich nach unserer Hypothese vorrangig Seneszenz-induzierende oder –stabilisierende Gene. Weitere *in silico* Analysen mit Computerprogrammen (STRING: string-db.org; DAVID: david.ncifcrf.gov/home.jsp; GO-terms: geneontology.org/page/go-enrichment-analysis) sollen klären, ob die von uns definierte Gengruppe (1) bereits eine Korrelation zu bekannten Gensignaturen oder auch zu definierten Protein-Protein assoziierten Signalnetzwerken besitzt. Wir erhoffen uns dadurch, Netzwerke beispielsweise der Proliferation, Migration und Invasion wiederzufinden, welche unsere festgelegte Gengruppe (1) nochmals validiert und durch neue Proteinnetzwerke ergänzt.

Zunächst sollen im Labor verschiedene Melanozytenzelllinien (~10) mit NHEM/BRAFmut gegen die parentalen Zellen ohne Mutation (NHEM/GFP) in Zellkultur genommen werden, um aus diesen mRNAs und Proteinlysate anzufertigen. Durch diese sollen mittels quantitativer RT-PCR(RNA-Ebene) zehn der Top-Kandidatengene der *in silico* Analysen bestätigt werden. Dies erfolgt zunächst auf mRNA Ebene. Werden aber signifikant differentiell regulierte Gene auf mRNA Ebene gefunden, sollen

diese auch auf Proteinebene in Western Blot Analysen bestätigt werden. Sind damit die Gene auf eine kleinere Zahl (maximal vier) eingegrenzt, werden die Ergebnisse an *in vivo* Material von Melanom Patienten bestätigt. Dazu besteht die Möglichkeit, mRNA aus Patientengewebe zu verwenden und/oder immunhistologische Färbungen an *tissue microarrays* (TMAs) vorzunehmen.

Im nächsten Schritt sollen funktionelle Analysen der neu gefundenen Gene erfolgen. Die Gene der Schnittmenge (1) sind hypothetisch frühe Gene der Melanom Entstehung. Je nach Eingruppierung der Gene in ihre funktionellen Signalnetzwerke werden die in diesem Teil der Arbeit erfolgenden Assays ausgewählt. Zunächst wird der Fokus auf eher frühe Ereignisse der Melanom Entwicklung in Proliferations- (z.B. xCelligence-Real-Time-Proliferation, XTT-Cell Proliferation Assay) und Migrationsexperimente (z.B. xCelligence-Cell Migration Assay) gesetzt. Durch spezifische siRNA Experimente gegenüber der Gene, angewendet in den zwei am stärksten exprimierenden Melanomzelllinien, werden die erfolgreichen Herabregulationen zunächst mittels qRT-PCR überprüft. Im Anschluss können die oben genannten funktionellen Assays durchgeführt werden.

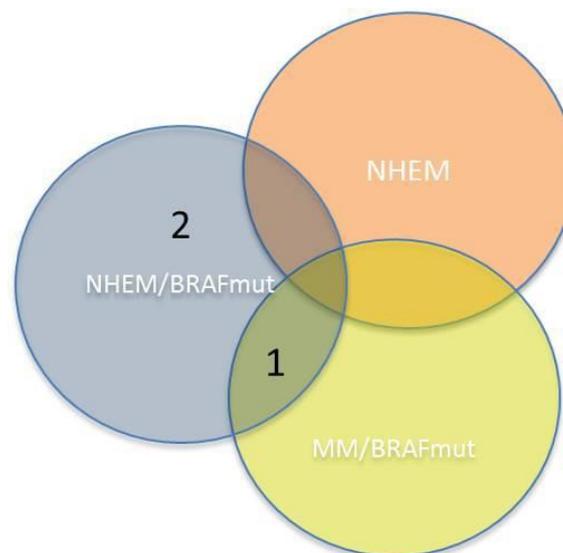


Abbildung 4: Diagramm über die Gencluster und Schnittmengen der *in silico* Analysen.

Auswertung der vorliegenden cDNA-Array und RNA-Sequenzierungs Ergebnisse (MM, malignes Melanom; NHEM, normale humane epidermale Melanozyten; mut, BRAFV600E-Mutation). Schnittmenge (1) bildet Gencluster ab, welche beim Vergleich der Gruppen NHEM/BRAFmut versus NHEM/GFP (Kontrolle), entweder eine gesteigerte oder verminderte Expression aufweisen und welche zusätzlich in Melanomzelllinien, mit endogen mutiertem BRAF (MM/BRAFmut) versus Melanozyten, ebenso wiederzufinden sind. In der Menge (2) befinden sich nach unserer Hypothese vorrangig Seneszenz-induzierende oder –stabilisierende Gene.

5 Ergebnisse

5.1 Auswahl BRAF abhängiger Gene

Die in dieser Arbeit untersuchten Gene wurden mithilfe von zwei Datenbanken ausgewählt. Eine der Datenbanken enthält Daten einer RNA-Sequenzierung in der zwei Gruppen von NHEMs (normale humane epidermale Melanozyten) miteinander verglichen werden. Lentiviral BRAFV600E transduzierten NHEMs werden kontroll-transduzierten NHEMs (BRAF mock/unmutiert) und ganz untransduzierten NHEMs gegenübergestellt (Feurerer et al. 2019). Die zweite Datenbank enthält cDNA Daten von Melanomzelllinien mit BRAFV600E Mutation und Melanozyten (Kappelmann-Fenzl et al. 2019). Gene, welche in beiden Datenbanken eine signifikante Änderung der Expression gegenüber den Kontrollen aufwiesen, wurden für weitere Untersuchungen in Betracht gezogen (Tabelle 1). Diese Gene sind in der folgenden Tabelle dargestellt. Die Gene zeigen entweder eine signifikante Verringerung der Expression (↓) oder eine signifikante Erhöhung der Expression (↑) in den jeweiligen Spalten, wobei die Spalte 1 den Daten aus der RNA-Sequenzierung und die Spalte 2 den Daten aus der cDNA Datenbank entspricht. Die Gene wurden nach den Daten der RNA-Sequenzierung geordnet. Dabei entspricht oben der am stärksten negativen und unten der am stärksten positiven Veränderung gegenüber den Kontrollen.

| Gen | Vollständiger Name | 1: NHEM/ BRAFmut | 2: MM/ BRAFmut |
|----------|---|---------------------|-------------------|
| EDIL3 | EGF-LIKE REPEATS- AND DISCOIDIN I-LIKE DOMAINS-CONTAINING PROTEIN 3 | ↓ | ↑ |
| CRABP2 | RETINOIC ACID-BINDING PROTEIN, CELLULAR, TYPE II | ↓ | ↑ |
| SULF1 | SULFATASE 1 | ↑ | ↑ |
| NPTX2 | PENTRAXIN II, NEURONAL | ↑ | ↑ |
| SLC16A6 | SOLUTE CARRIER FAMILY 16, MEMBER 6 | ↑ | ↓ |
| CDCP1 | CUB DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 1 | ↑ | ↑ |
| DUSP6 | DUAL-SPECIFICITY PHOSPHATASE 6 | ↑ | ↑ |
| TFPI2 | TISSUE FACTOR PATHWAY INHIBITOR 2 | ↑ | ↑ |
| SERPINB2 | SERPIN PEPTIDASE INHIBITOR 2 | ↑ | ↑ |
| AREG | AMPHIREGULIN | ↑ | ↑ |

Tabelle 1: Ausgewählte Gene und ihre Veränderung in der Expression.

Veränderung der Genexpression gezeigter Gene in RNA-Sequenzierung im Vergleich der Gruppen NHEM/BRAFmut versus NHEM/GFP (Kontrolle) (1). Veränderung der Genexpression gezeigter Gene in cDNA-Array in endogen mutiertem BRAF Melanomzelllinien (MM/BRAFmut) versus Melanozyten. Pfeil nach oben impliziert erhöhte Genexpression gegenüber NHEMs, Pfeil nach unten erniedrigte Genexpression gegenüber NHEMs. Ranking nach Wert der Veränderung gegenüber den Kontrollen in der RNA-Sequenzierung (Spalte 1), von der oben am stärksten negativen bis unten zur am stärksten positiven Expression.

5.2 Erfolgreiche lentivirale Transduktion von Tumorzelllinien mit BRAFV600E

Zur weiteren Überprüfung der zuvor ausgewählten Gene wurden verschiedene Zelllinien mit einem lentiviralen BRAFV600E Konstrukt oder mit einem Kontroll-Vektor transduziert. Dafür wurden drei Melanomzelllinien und NHEMs (primäre Zellen) verwendet.

Bei den Melanomzellen wurden die Primärtumor-Zelllinien WM1366, WM3211 und WM35 verwendet. Dabei handelt es sich bei WM1366 und WM3211 um zwei Zelllinien, in denen *BRAF* nicht mutiert ist, wohingegen WM35 Zellen die BRAFV600E Mutation

tragen. Diese Zellen sollten im weiteren Verlauf der Arbeit für verschiedene Expressionsanalysen herangezogen werden. Deshalb wurde die erfolgreiche Transduktion einerseits mit qRT-PCR für die mRNA-Expression, andererseits mit Western Blot für die Proteinexpression überprüft.

5.2.1 Erhöhte BRAFV600E mRNA-Expression in transduzierten Zellen

Um die erfolgreiche Transduktion der Zellen mit dem lentiviralen BRAFV600E Konstrukt auf mRNA-Ebene nachzuweisen, wurden spezifische Primer für das BRAF Gen in einer qRT-PCR verwendet. Die zu analysierende RNA wurde innerhalb einer Woche zu verschiedenen Zeitpunkten, je 120 h, 144 h und 168 h nach Transduktion, aus den Zellen gewonnen. Es wurden sowohl Zellen analysiert, die mit dem BRAFV600E Konstrukt transduziert wurden, als auch Zellen, welche nur mit einem Kontrollvektor behandelt wurden. Dies geschah, um sicher zu gehen, dass nicht allein durch die virale Stimulation ein erhöhtes BRAFV600E Level zustande kommt. Die Analyse ergab in den mit dem BRAFV600E Konstrukt behandelten Zellen eine signifikant erhöhte Menge an spezifischer mRNA für diese Mutation (Abbildung 5). Für die weiteren Versuche wurden jeweils die Zellen mit der höchsten mRNA Expression von BRAFV600E ausgewählt. Dies bedeutet eine Isolation der RNA bzw. der Proteine für die Zellen WM1366 168 h nach der Transduktion und für WM3211 144 h nach der Transduktion. Für WM35 erfolgte diese Isolierung 120 h und 168 h nach der Transduktion mit dem lentiviralen BRAFV600E Konstrukt (Abbildung 5).

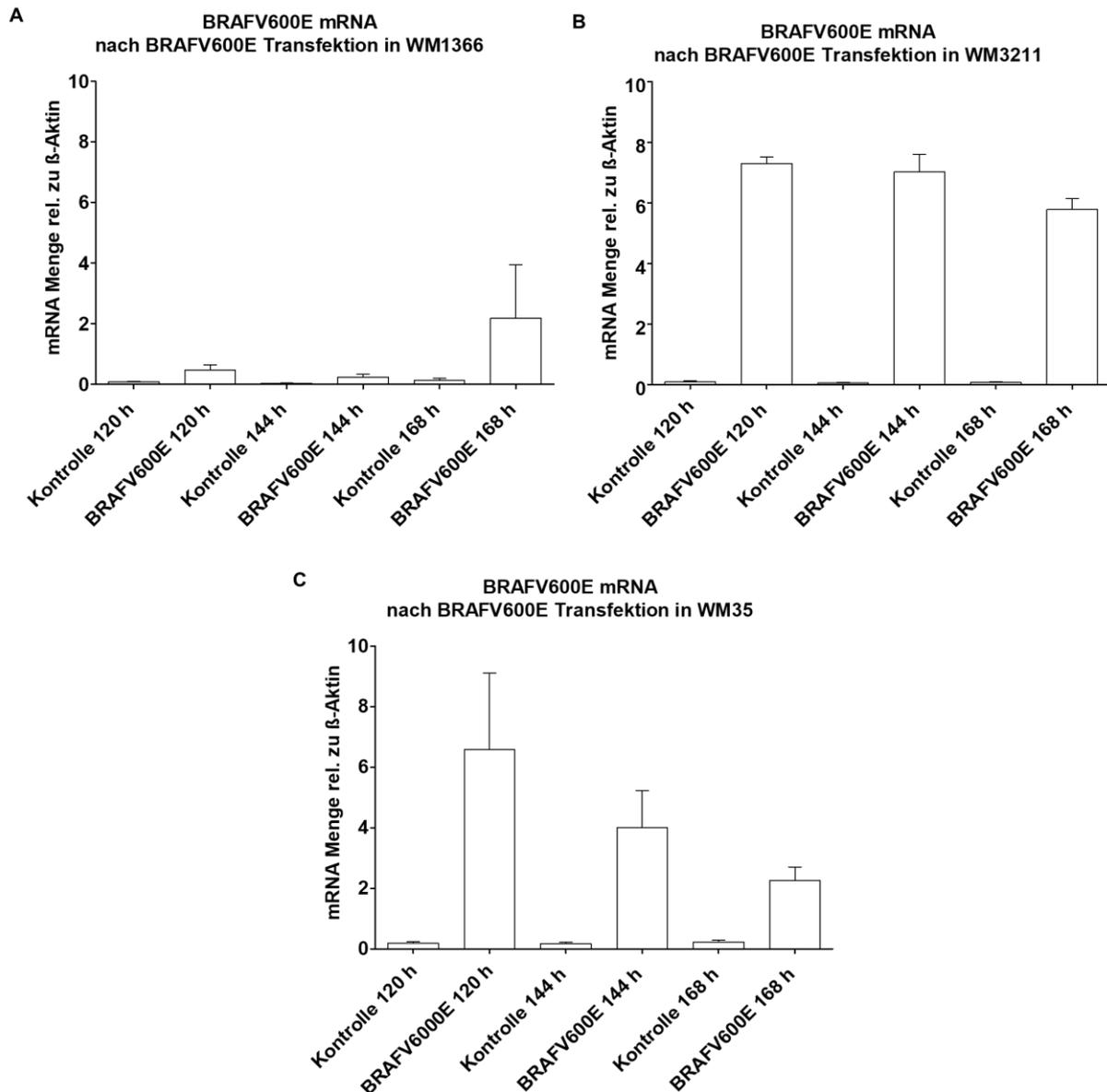


Abbildung 5: Nachweis BRAF spezifischer mRNA mittels qRT-PCR nach lentiviraler BRAFV600E Überexpression.

Melanomzellen (WM1366 (A), WM3211 (B), WM35(C)) wurden mit einem lentiviralen BRAFV600E und einem Kontrollvektor transduziert. Die RNA-Isolation erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transduktion, 120 h, 144 h und 168 h. Die Menge an BRAF mRNA wurde mittels qRT-PCR nachgewiesen und relativ zur mRNA Menge des Haushaltsgens β -Aktin aufgetragen.

5.2.2 Erhöhte BRAFV600E Proteinexpression in transduzierten Zellen

Um die Ergebnisse aus der qRT-PCR zu validieren, wurde zusätzlich eine Proteinexpressionsanalyse mittels Western Blot Methodik durchgeführt. Der

verwendete Antikörper detektiert laut Hersteller spezifisch BRAFV600E. Auch hier konnte gegenüber den Kontrollen eine größere Menge des mutierten Proteins in den BRAFV600E transduzierten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 6). Durch den parallelen Nachweis des *Housekeeping* Gens β -Aktin und der gleichmäßigen Proteinmenge kann das Auftragen verschiedener Lysatmengen und die dadurch bedingte Veränderung der Ergebnisse ausgeschlossen werden. Die Zelllinie WM35 zeigt, besonders im Proteinlysat nach 168 Stunden isoliert, die endogene BRAFV600E Expression (Abbildung 6).

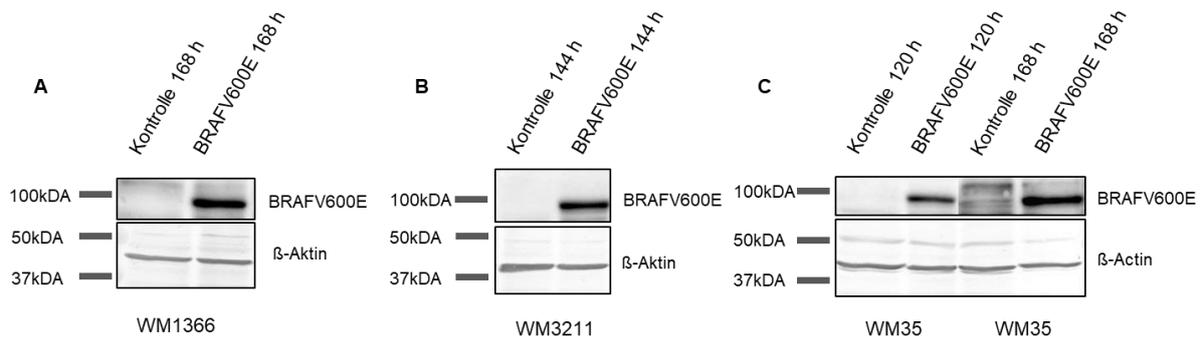


Abbildung 6: Nachweis von BRAFV600E Proteinexpression mit Western Blot Analyse nach lentiviraler BRAFV600E Überexpression.

Verschiedene Melanomzellen (WM1366 (A), WM3211 (B), WM35 (C)) wurden mit einem lentiviralen BRAFV600E und einem Kontrollvektor transduziert. Proteinlysate der Zellen mit der höchstem mRNA für BRAFV600E (WM1366 168 h nach Transduktion, WM3211 144 h nach Transduktion, WM35 120 h und 168 h nach Transduktion) wurden mittels Western Blot analysiert. Aufgetrennte Proteinbanden wurden mit Antikörpern gegen BRAFV600E und β -Aktin detektiert.

Beide Verfahren, sowohl mRNA- als auch Proteinexpressionsanalysen, zeigten eine erfolgreiche Transduktion der Zellen, weshalb diese im Verlauf der Arbeit für weitere Experimente verwendet werden konnten.

5.2.3 Erhöhte BRAFV600E Proteinexpression in transduzierten Melanozyten

Die transduzierten NHEMs, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, wurden im Zuge der Dissertation von Lena Feuerer (Lena Feuerer 2019) erstellt. Ihre erfolgreiche Transduktion wurde bereits untersucht und bestätigt, weshalb sie in dieser Arbeit keiner weiteren Überprüfung unterzogen wurden.

5.3 Veränderung der Expressionslevel der Kandidatengene in den BRAFV600E transduzierten Tumorzelllinien

Als Nächstes erfolgte die Analyse der Veränderung der mRNA-Expression der bereits zuvor ausgewählten Kandidatengene der Tabelle 1 für BRAFV600E abhängige Expressionsregulation, gemessen mittels qRT-PCR. Dazu wurden für die verschiedenen Gene spezifische Primer zur Amplifikation der DNA in qRT-PCR verwendet. Für die Gene *EDIL3* und *TFPI2* konnte keine stabile qRT-PCR etabliert werden, weshalb diese Gene in weiterführenden Experimenten nicht weiter berücksichtigt wurden. Die Analyse der mRNA-Mengen der Gene *SULF1*, *CRABP2*, *DUSP6* und *CDCP1* wurde zunächst nur in der Melanomzelllinie WM1366 durchgeführt. Dabei ergaben sich keine signifikanten Unterschiede der mRNA-Mengen zwischen Kontrollzellen und BRAFV600E transduzierten Zellen (Abbildung 7), weshalb auch diese im weiteren Verlauf der Arbeit nicht näher untersucht und von weiteren Analysen ausgeschlossen wurden.

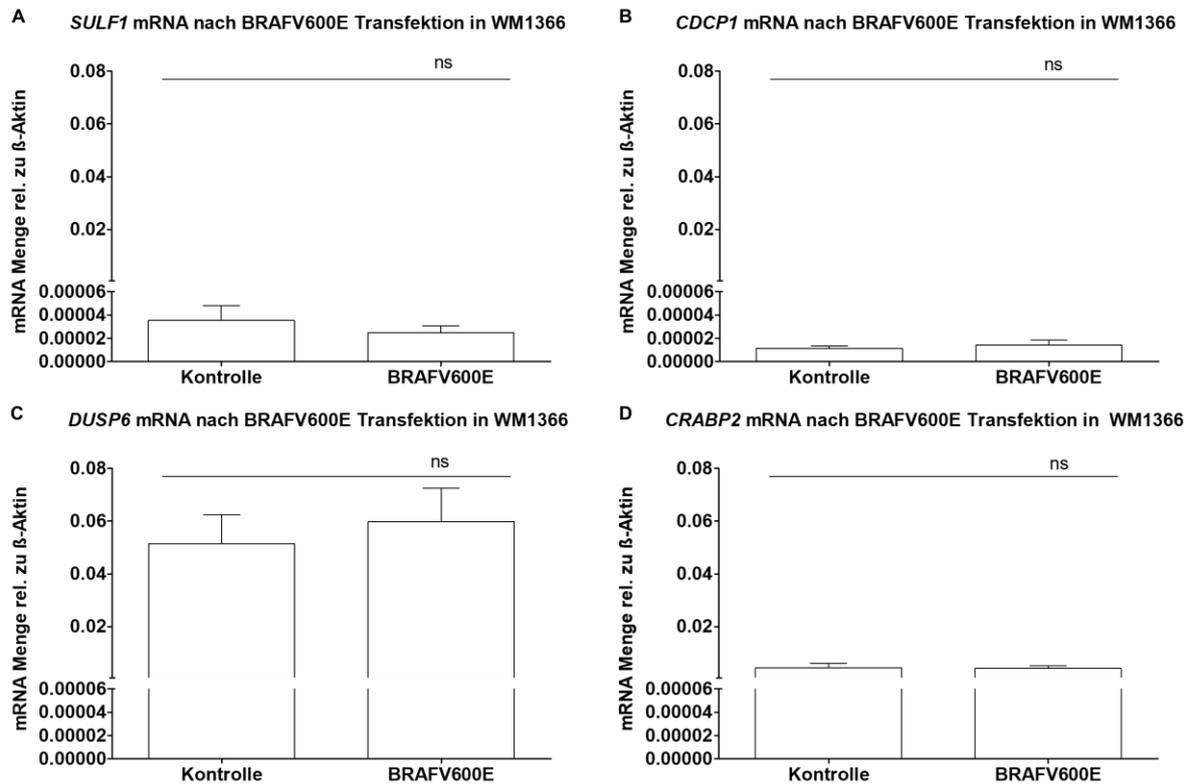
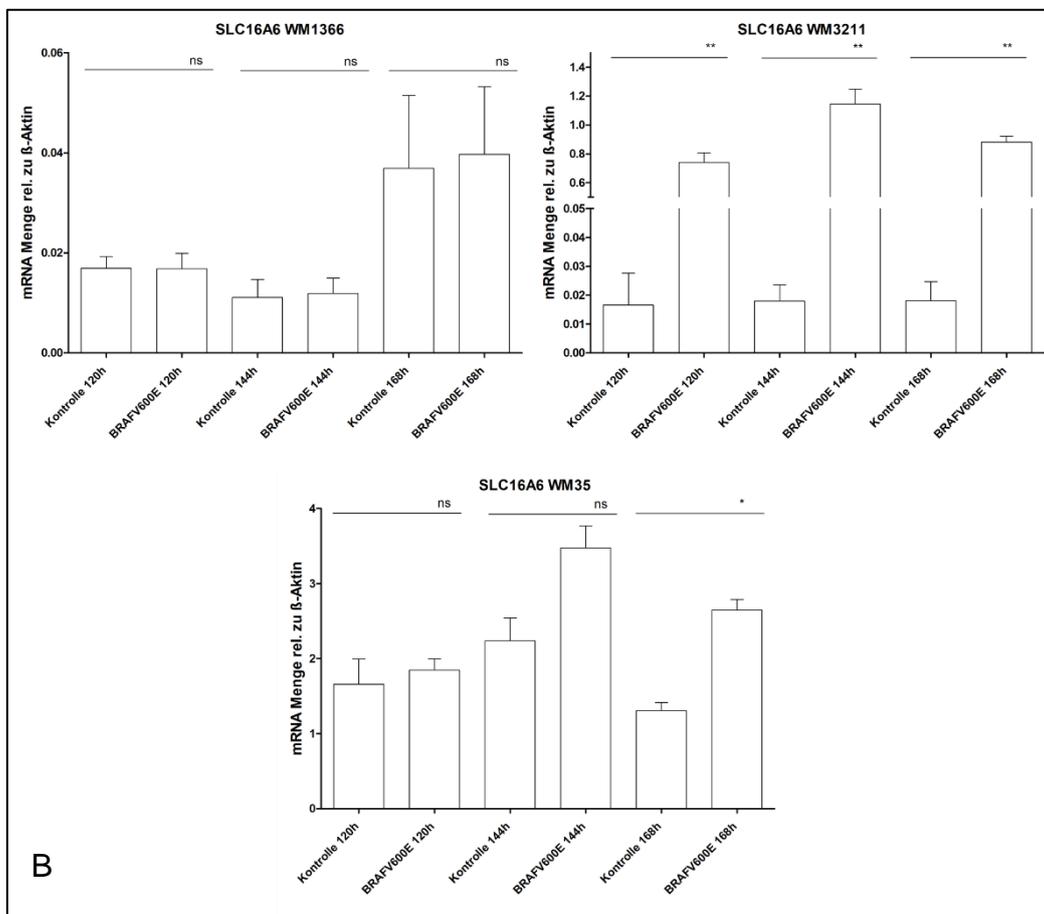
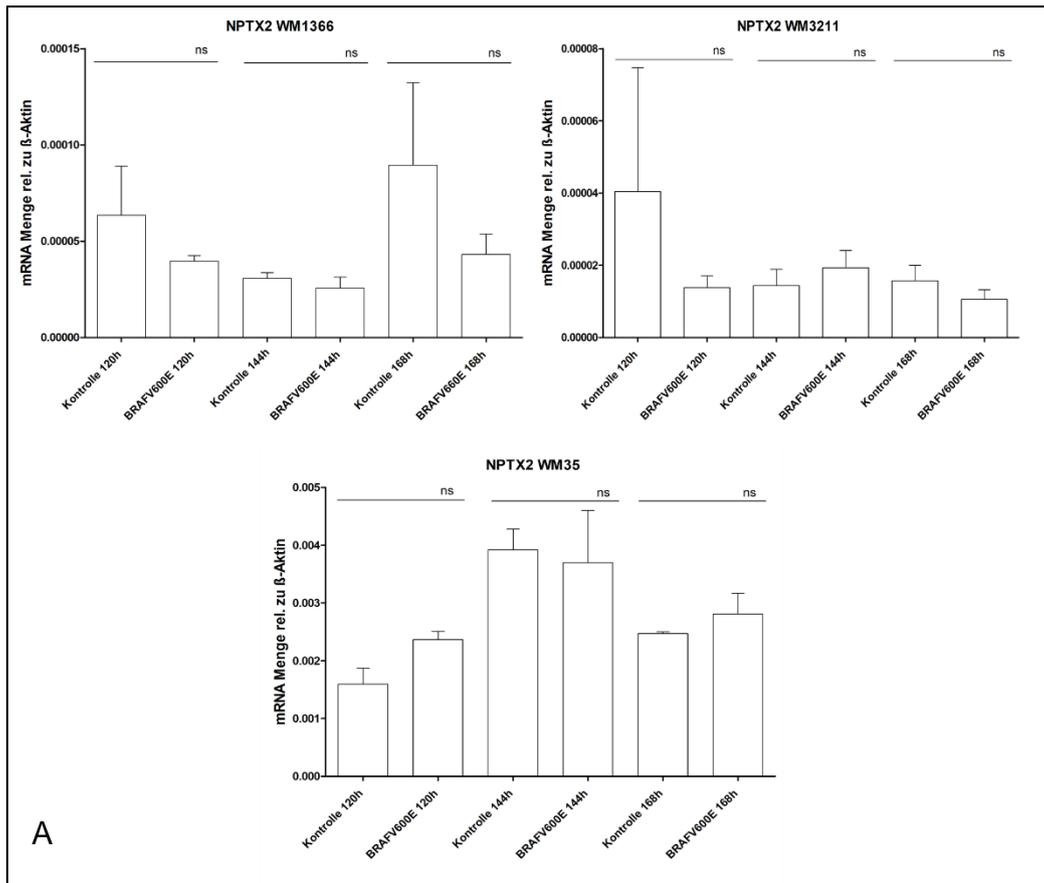


Abbildung 7: Nachweis der mRNA-Expression von *SULF1*, *CDCP1*, *DUSP6* und *CRABP2* mittels qRT-PCR nach lentiviraler BRAFV600E Überexpression in WM1366.

Die mit BRAFV600E transduzierte Melanomzelllinie WM1366 wurde auf veränderte Genexpression von *SULF1* (A), *CDCP1* (B), *DUSP6* (C) und *CRABP2* (D) mithilfe von qRT-PCR getestet. Hierfür wurde 168 h nach der Transduktion mit BRAFV600E RNA aus den Zellen isoliert und anschließend mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Aus der cDNA wurde in der qRT-PCR mithilfe spezifischer Primer DNA der Gene *SULF1* (A), *CDCP1* (B), *DUSP6* (C) und *CRABP2* (D) amplifiziert und durch die Integration von SYBR Green gemessen. Die mRNA Mengen der untersuchten Gene wurden relativ zur mRNA Menge des Haushaltsgenes β -Aktin aufgetragen.

Für die Gene *NPTX2*, *SLC16A6* und *SERPINB2* wurden sowohl die drei Melanomzelllinien WM1366, WM3211 und WM35 als auch die NHEMs auf veränderte mRNA- und Proteinexpression infolge der BRAFV600E Transduktion untersucht. Bei *NPTX2* ergab sich bei den Melanomzelllinien durch die BRAFV600E Transduktion auf mRNA-Ebene keine signifikante Veränderung im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abbildung 8). *SLC16A6* dagegen zeigte in den Zelllinien WM3211 und WM35 (Abbildung 8), *SERPINB2* in der Zelllinie WM3211, einen signifikanten Anstieg der mRNA-Expression bei den mit BRAFV600E transduzierten Zellen gegenüber Kontrollen (Abbildung 8).



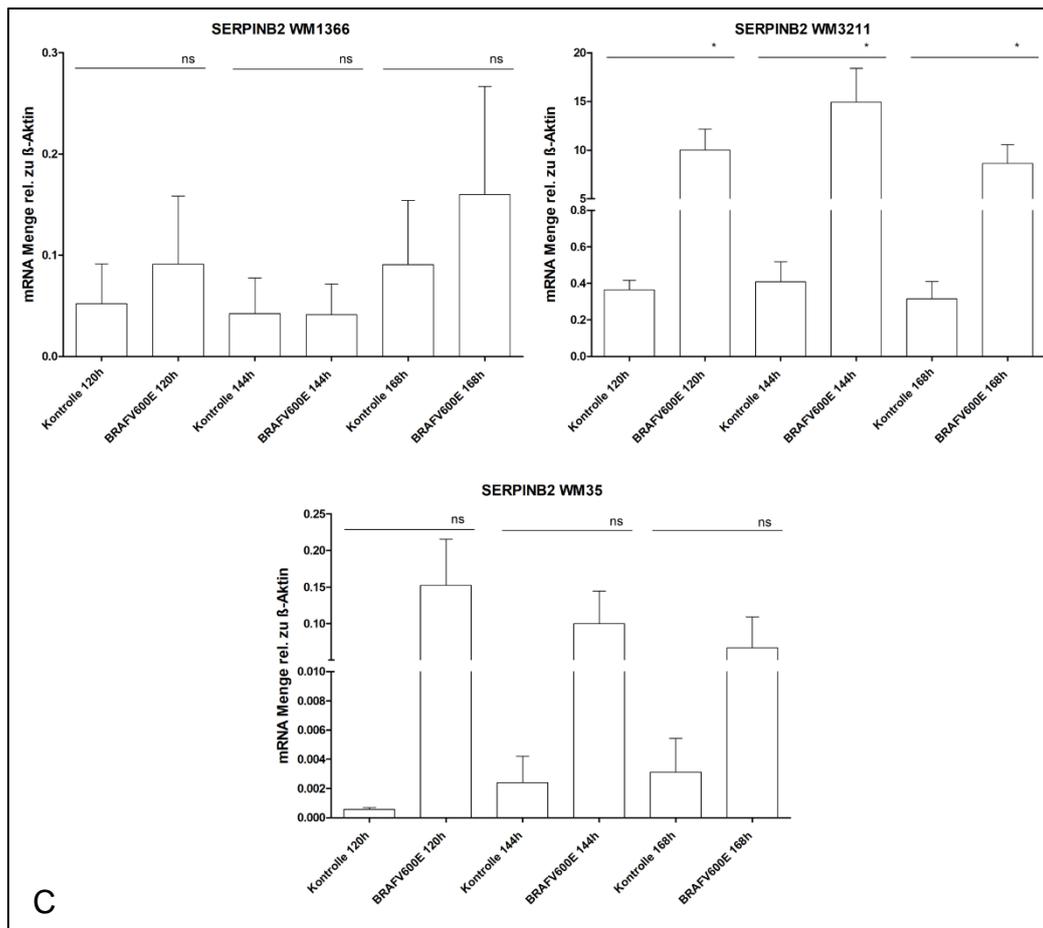


Abbildung 8: Nachweis der mRNA- und Proteinexpression von *NPTX2*, *SLC16A6* und *SERPINB2* nach lentiviraler BRAFV600E Überexpression.

Verschiedene Melanomzellen (WM1366, WM3211, WM35) wurden mit einem lentiviralen BRAFV600E und einem Kontrollvektor transduziert. Die Gene *NPTX2* (A), *SLC16A6* (B) und *SERPINB2* (C) wurden mithilfe von qRT-PCR auf veränderte Genexpression getestet. Hierfür wurde 168 h (WM1366), 144 h (WM3211) und 168 h (WM35) nach der Transduktion mit BRAFV600E RNA aus den Zellen isoliert und anschließend mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Aus der cDNA wurde in der qRT-PCR mithilfe spezifischer Primer DNA der Gene *NPTX2* (A), *SLC16A6* (B) und *SERPINB2* (C) amplifiziert und durch die Integration von SYBR Green gemessen. Die mRNA Mengen der untersuchten Gene wurden relativ zur mRNA Menge des Haushaltsgenes β -Aktin aufgetragen.

Zusätzlich wurden die Gene *SERPINB2* und *SLC16A6* aufgrund signifikanter Veränderungen bei den Tumorzelllinien auch in NHEMs, welche ebenso mit dem lentiviralen BRAFV600E Konstrukt transduziert wurden, mittels qRT-PCR auf ihre mRNA-Expression überprüft. Dabei zeigte sich auf mRNA-Ebene bei beiden Genen die Tendenz eines Anstiegs der Expression in den mit dem BRAFV600E Konstrukt behandelten Zellen, wobei nur bei *SERPINB2* Signifikanz erzielt werden konnte (Abbildung 9).

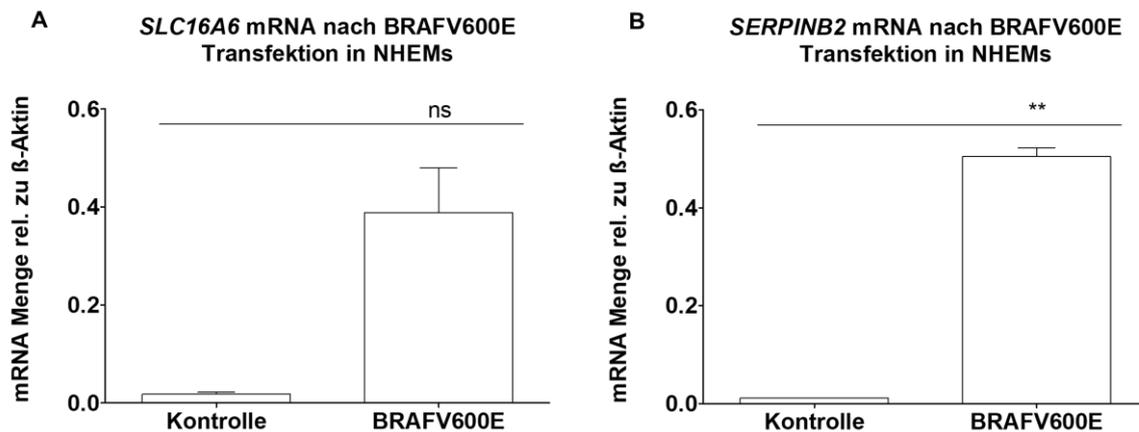


Abbildung 9: Nachweis der mRNA- Expression von *SLC16A6* und *SERPINB2* nach lentiviraler BRAFV600E Überexpression in NHEMs.

NHEMs wurden mit einem lentiviralen BRAFV600E und einem Kontrollvektor transduziert. Für *SLC16A6* (A) und *SERPINB2* (B) wurde die veränderte Expression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR überprüft. Hierfür wurde nach der Transduktion mit BRAFV600E RNA aus den Zellen isoliert und anschließend mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Aus der cDNA wurde in der qRT-PCR mithilfe spezifischer Primer DNA der *SLC16A6* (A) und *SERPINB2* (B) amplifiziert und durch die Integration von SYBR Green gemessen. Die mRNA Mengen der untersuchten Gene wurden relativ zur mRNA Menge des Haushaltsgenes β-Aktin aufgetragen.

5.4 Veränderung der Expressionslevel von AREG in den BRAFV600E transduzierten Tumorzelllinien und NHEMs

Für *AREG* wurden die mRNA- und Proteinexpressionslevel in den drei BRAFV600E transduzierten Zelllinien WM1366, WM3211 und WM35 mittels qRT-PCR und Western Blot überprüft. *Amphiregulin* zeigte in allen drei Melanomzelllinien eine signifikant erhöhte mRNA-Expression in den mit lentiviralem BRAFV600E Konstrukt behandelten Zellen gegenüber den Kontrollen (Abbildung 10 A, B, C). Auf Proteinebene dagegen zeigten sich je nach Zelllinie unterschiedliche Regulationen durch die BRAFV600E Transduktion. In der Zelllinie WM1366 und angedeutet auch in WM3211 Zellen bildete sich eine Erhöhung des AREG Expressionslevels ab (Abbildung 10 D und E). Dagegen war in den WM35 Zellen eine Verringerung der AREG Proteinexpression infolge der BRAFV600E Transduktion nachweisbar (Abbildung 10 F).

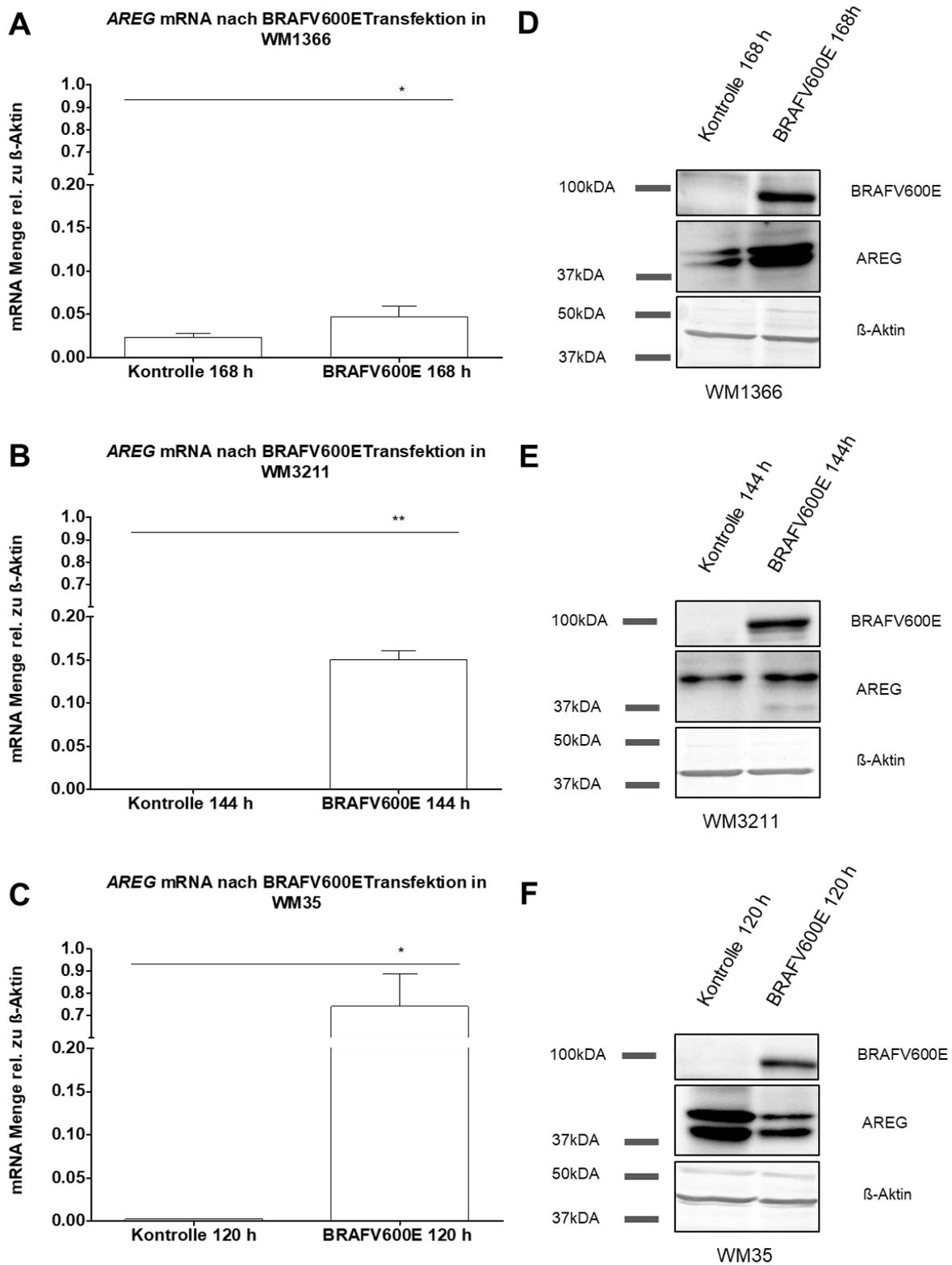


Abbildung 10: Nachweis der mRNA- und Proteinexpression von *AREG* nach lentiviraler BRAFV600E Überexpression in Melanomzelllinien.

Verschiedene Melanomzellen (WM1366 (A), WM3211 (B), WM35 (C)) wurden mit einem lentiviralen BRAFV600E und einem Kontrollvektor transduziert. Für *AREG* wurde die veränderte Expression auf mRNA-Ebene überprüft.

Hierfür wurde 168 h (WM1366), 144 h (WM3211) und 120 h (WM35) nach der Transduktion mit BRAFV600E RNA aus den Zellen isoliert und anschließend mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Aus der cDNA wurde in der qRT-PCR mithilfe spezifischer Primer DNA des Gens *AREG* amplifiziert und durch die Integration von SYBR Green gemessen. Die mRNA Mengen der untersuchten Gene wurden relativ zur mRNA Menge des Haushaltsgenes β -Aktin aufgetragen. Zusätzlich wurde die veränderte BRAFV600E Expression auf Proteinebene nachgewiesen. Nach der Transduktion gewonnene Proteinlysate wurden mittels Western Blot analysiert und *AREG*, BRAFV600E und als Ladekontrolle β -Aktin detektiert.

Zusätzlich wurden die BRAFV600E transduzierten NHEMs auf eine veränderte *AREG* mRNA-Expression getestet. Dabei konnte in den transduzierten Zellen eine tendenziell erhöhte Menge von *AREG* mRNA gegenüber den Kontrollen nachgewiesen werden (Abbildung 11).

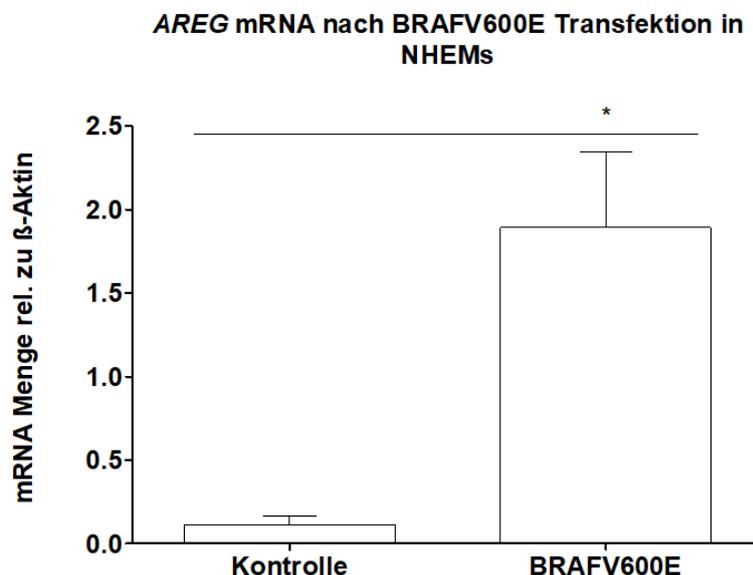


Abbildung 11: Nachweis der mRNA-Expression von *AREG* nach lentiviraler BRAFV600E Überexpression in NHEMs.

NHEMs wurden mit einem lentiviralen BRAFV600E und einem Kontrollvektor transduziert. Für *AREG* wurde die veränderte Expression auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR überprüft. Hierfür wurde nach der Transduktion mit BRAFV600E RNA aus den Zellen isoliert und anschließend mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Aus der cDNA wurde in der qRT-PCR mithilfe spezifischer Primer DNA des Gens *AREG* amplifiziert und durch die Integration von SYBR Green gemessen. Die mRNA Menge wurde relativ zur mRNA Menge des Haushaltsgenes β -Aktin aufgetragen.

Da *AREG* ein sezerniertes Protein ist, wurden neben der mRNA und Protein Level auch die *AREG* Mengen in den Zellkulturüberständen analysiert. Dabei wurden die Zellkulturüberstände der Melanomzelllinien WM1366 und WM35 nach BRAFV600E

Transduktion mittels Western Blot analysiert. Es ergaben sich keine Unterschiede in den sekretierten AREG Mengen BRAFV600E transduzierter Zellen zu den Kontrollen (Abbildung 12). Vermutlich aufgrund posttranslationaler Modifikation vor der Sekretion ist das sekretierte AREG bei ca. 55 kDa, im Gegensatz zum intrazellulären AREG, das nur 40 kDa groß ist, zu detektieren.

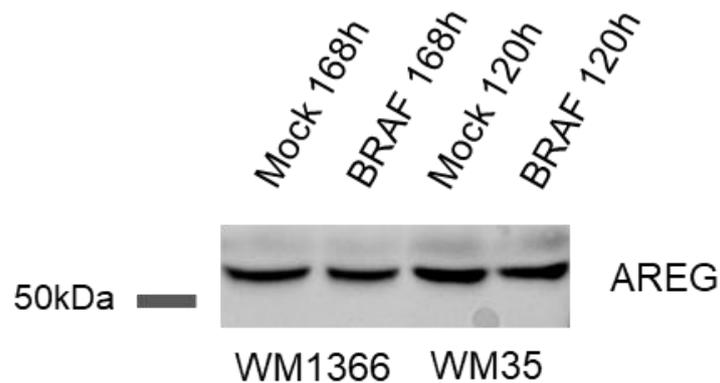


Abbildung 12 Nachweis der sekretierten AREG Proteinmengen in Zellkulturüberständen.

Verschiedene Melanomzellen (WM1366 und WM35) wurden mit einem lentiviralen BRAFV600E und einem Kontrollvektor transduziert. Zellkulturüberstände wurden nach 168 h (WM1366) und 120 h (WM35) mittels Western Blot auf die vorhandene AREG Proteinmenge analysiert.

5.5 Amphiregulin (AREG)

Aufgrund der bisher gesammelten Daten stellte sich *Amphiregulin* als das vielversprechendste Gen für eventuell BRAFV600E abhängige tumorregulatorische Eigenschaften im Melanom heraus, weshalb es im weiteren Verlauf der Arbeit durch zusätzliche Experimente analysiert wurde.

5.5.1 Variierende AREG Expression in verschiedenen Tumorzelllinien

Um die Regulation von *AREG* in nicht transfizierten Zelllinien besser beurteilen zu können, wurden auch die Expressionslevel von *AREG* in NHEMs und Zelllinien, welche aus Primärtumoren oder aus Metastasen generiert wurden, untersucht. Diese Untersuchungen wurden mittels qRT-PCR und Western Blot durchgeführt. Im Speziellen handelte es sich bei den Zelllinien aus Primärtumoren um je drei nicht

BRAFV600E mutierte Wistar-Zelllinien WM1366, WM3211 und SBCL2. Zusätzlich wurden drei BRAFV600E mutierte Wistar-Zelllinien, WM35, WM793 und WM278 analysiert. Als Zelllinien aus Metastasen wurde A375 für mRNA- und Protein-Analysen sowie Mel IM und SK Mel-28 nur für mRNA-Analysen verwendet. Das *AREG* Expressionsmuster in den verschiedenen Zelllinien zeigte sich sowohl auf mRNA-, als auch auf Proteinebene als sehr inhomogen. In den NHEMs, den mutierten Wistar-Zellen und den Zelllinien aus Metastasen zeigt sich eine generell niedrige *AREG* mRNA-Expression (Abbildung 13). Dagegen zeigt sich in den nicht mutierten Wistar-Zelllinien bei WM1366 und SBCL2 eine hohe und bei WM3211 auch eine niedrige *AREG* mRNA-Expression (Abbildung 13).

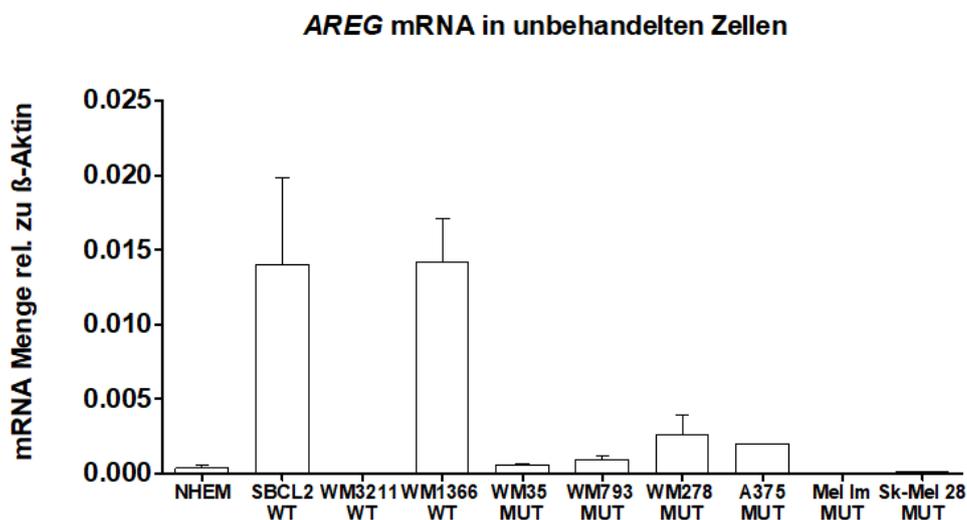


Abbildung 13: Nachweis der mRNA-Expression von *AREG* in unbehandelten Zellen.

Verschiedene unbehandelte Zellen (NHEMs, Zellen aus BRAF Wildtyp Melanom Primärtumoren (WT), Zellen aus BRAFV600E mutierten Melanom Primärtumoren (MUT) und Zellen aus Melanom Metastasen (Met)) wurden mittels qRT-PCR auf ihre *AREG*-Expression überprüft. Hierfür wurde RNA aus den Zellen isoliert und anschließend mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Aus der cDNA wurde in der qRT-PCR mithilfe spezifischer Primer DNA des Gens *AREG* amplifiziert und durch die Integration von SYBR Green gemessen. Die mRNA Menge wurde relativ zur mRNA Menge des Haushaltsgenes β -Aktin aufgetragen.

In den Western Blots zeigten sich zwei Banden, die vermutlich verschiedenen posttranslational veränderten *AREG* Formen zugeordnet werden konnten. Diese befanden sich auf Höhe von ~ 40 kDa und ~ 100 kDa (Abbildung 14). Auch hier konnte für die Zelllinien SBCL2 und WM1366 eine erhöhte *AREG* Proteinkonzentration festgestellt werden (Abbildung 14). Das Proteinmuster der 100 kDa Bande kann in

dieser Arbeit nicht weiter diskutiert werden, da nicht gänzlich geklärt werden konnte, ob es sich dabei um eine Modifikation oder eine Splice-Variante handelt. Im Laufe der Arbeit fokussierten wir uns daher auf das 40 kDa Protein, da dies in der Literatur als pro-AREG beschrieben wird.

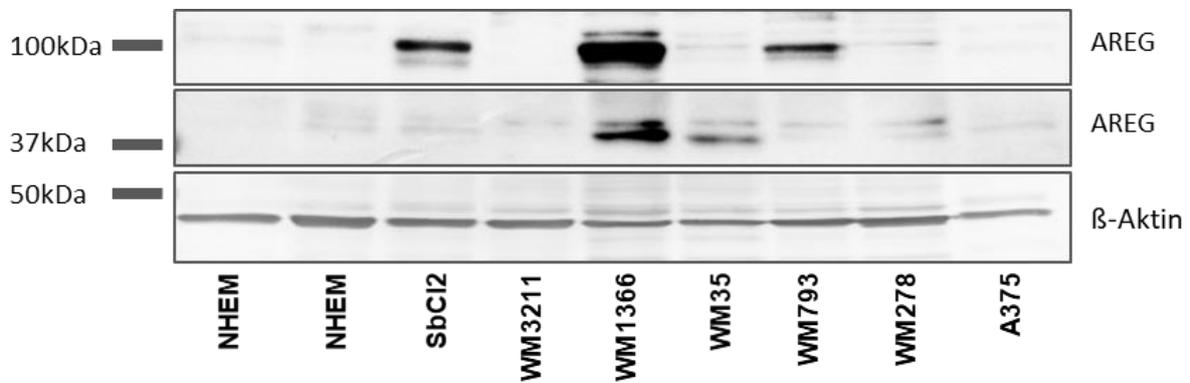


Abbildung 14: Nachweis der Proteinexpression von AREG in unbehandelten Zellen.

Aus verschiedenen unbehandelten Zellen (NHEMs, Zellen aus BRAF Wildtyp Melanom Primärtumoren (SbCl2, WM3211, WM1366), Zellen aus BRAFV600E mutierten Melanom Primärtumoren (WM35, WM793, WM278) und Zellen aus Melanom Metastasen (A375)) wurden Proteinlysate gewonnen, mittels Western Blot analysiert und AREG und als Ladekontrolle β -Aktin detektiert.

Eine weitere Western Blot Analyse sollte darüber Aufschluss geben, ob die AREG Expression vom jeweiligen Mutationsstatus der Zelllinie abhängt. Dafür wurden fünf Zelllinien mit nicht mutiertem BRAF Status, nämlich WM1366, SbCl2, MeWo, MV-3 und WM3208, sowie vier Zelllinien mit BRAFV600E Mutation, nämlich WM35, WM278, SK-Mel-28 und A375, analysiert. Zwei von den fünf nicht mutierten Zelllinien, WM1366 und SbCl2, weisen hingegen eine RAS Mutation auf. Dabei zeigte sich ein sehr heterogenes Bild der AREG Proteinmengen mit der Tendenz einer erhöhten AREG Proteinkonzentration in nicht BRAF mutierten Melanomzelllinien (Abbildung 15).

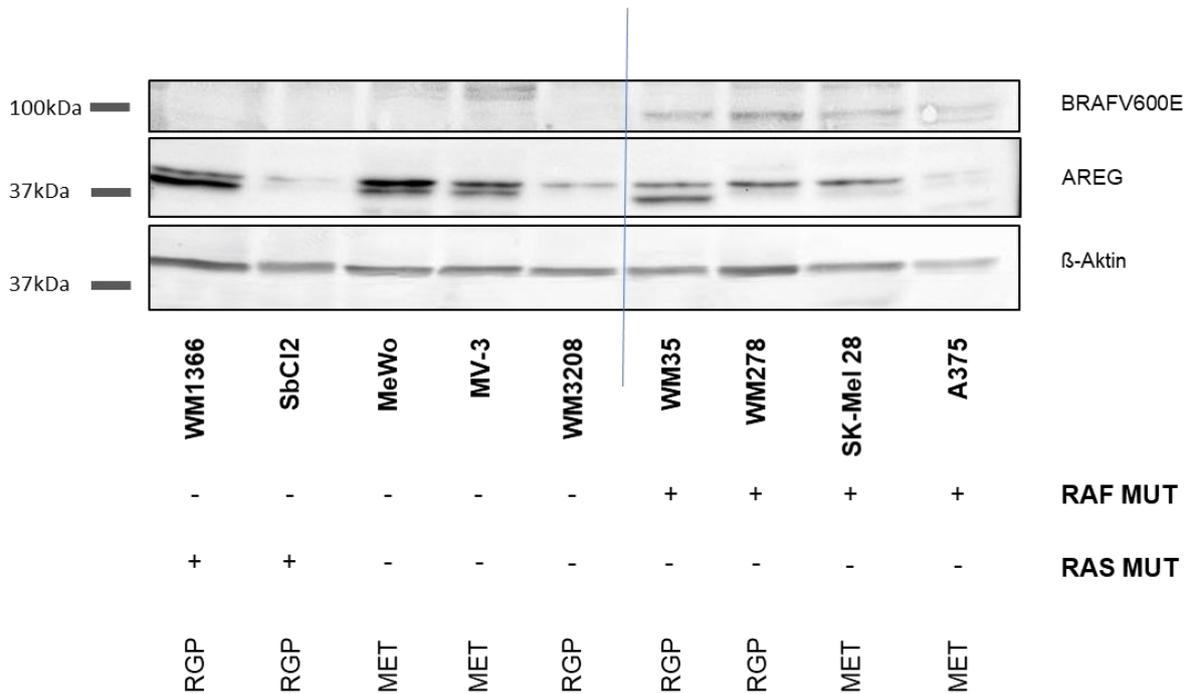


Abbildung 15: Nachweis der Proteinexpression von AREG und BRAFV600E in unbehandelten Zellen abhängig von verschiedenen Mutationsstatus.

Aus verschiedenen unbehandelten Zellen (mit einer RAS-Mutation (RAS Mut) (WM1366, SbCl2), mit einer BRAFV600E-Mutation (RAF Mut) (WM35, WM278, SK-Mel-28, A375) und ohne Mutation (MeWo, MV-3, WM3208)) wurden Proteinlysate gewonnen, mittels Western Blot analysiert und AREG, BRAFV600E und als Ladekontrolle β -Aktin detektiert.

5.5.2 Veränderte Zelleigenschaften bei modulierter AREG Expression

Um die Auswirkungen einer veränderten AREG Expression auf das jeweilige Zellverhalten beobachten zu können, wurde mithilfe von siRNA- und AREG-Expressionsvektor Transfektion die AREG Expression in Melanomzellen moduliert. Im Anschluss wurden diese Zellen dann auf ihre Eigenschaft zur Proliferation, Migration und Sphäroid-Bildung getestet.

5.5.2.1 Verringerung der AREG Expression durch siRNA-Knockdown

Damit die Effekte einer verringerten AREG Expression getestet werden konnten, wurden Zellen der Melanomzelllinie WM1366, welche im nicht behandelten Zustand eine hohe AREG Expression aufweist, mit einer AREG spezifischen siRNA für 72 h transfiziert. Dies sollte zu einer Verringerung der AREG Proteinexpression führen, da

durch die siRNA die Prozessierung der *AREG* mRNA und somit die Bildung des AREG Proteins gehemmt werden sollte (Abbildung 16). Die Zellen mit 72-stündiger siRNA Inkubation vor RNA- und Proteinextraktion wurden für nachfolgende Experimente verwendet.

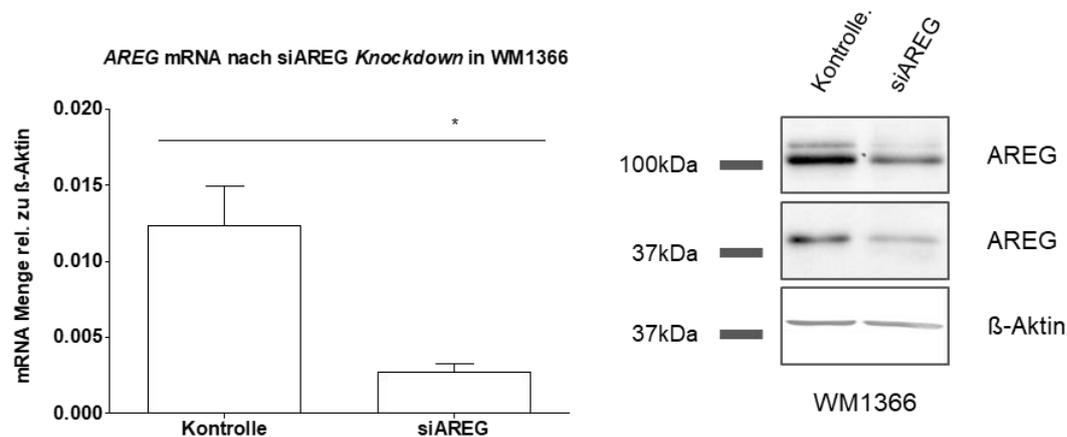


Abbildung 16: Nachweis einer verminderten *AREG* mRNA- und Proteinexpression mittels qRT-PCR und Western Blot nach siAREG Knockdown.

Die mit *AREG* spezifischer siRNA behandelte Melanomzelllinie WM1366 wurde auf ihre *AREG* mRNA- und Proteinexpression mithilfe von qRT-PCR und Western Blot überprüft. Die RNA-Isolation und Proteinlyse wurden 72 h nach Transfektion durchgeführt. Hierfür wurde die gewonnene RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Aus der cDNA wurde in der qRT-PCR mithilfe spezifischer Primer DNA des Gens *AREG* amplifiziert und durch die Integration von SYBR Green gemessen. Die mRNA Menge wurde relativ zur mRNA Menge des Haushaltsgenes β -Aktin aufgetragen. AREG und die Ladekontrolle β -Aktin wurden mittels spezifischer Antikörper im Western Blot nachgewiesen.

5.5.2.2 Erhöhte Proliferation und Migration durch verringerte *AREG* Expression

Mit den siRNA behandelten Zellen wurden verschiedene funktionelle Assays durchgeführt. Veränderte Proliferations- und Migrationseigenschaften wurden dabei mithilfe von *Real-Time-Cell-Analysis* (RTCA) analysiert. Dabei wurde für die Proliferationsmessung die Zellzahl über mehrere Tage hinweg aufgrund der elektrischen Impedanz bestimmt und damit die Proliferationsrate errechnet. Für die Bestimmung der Migrationsrate diente eine spezielle Vorrichtung mit zwei Kammern, wobei nur in einer der beiden Kammern Zellen ausgesät wurden. Die Kammern sind durch eine porige Membran voneinander getrennt, durch welche die Zellen migrieren müssen. Daraufhin wurden erneut über die elektrische Impedanz der Zellen diejenigen

gemessen, die in die untere Kammer migrierten, und daraus die Migrationsrate errechnet. In diesem Experiment zeigte sich eine signifikant erhöhte Fähigkeit der mit siRNA behandelten Zellen zur Proliferation und Migration gegenüber den Kontrollen (Abbildung 17).

In einer ersten Interpretation lässt sich AREG daher für das Melanom eventuell als Tumorsuppressor definieren.

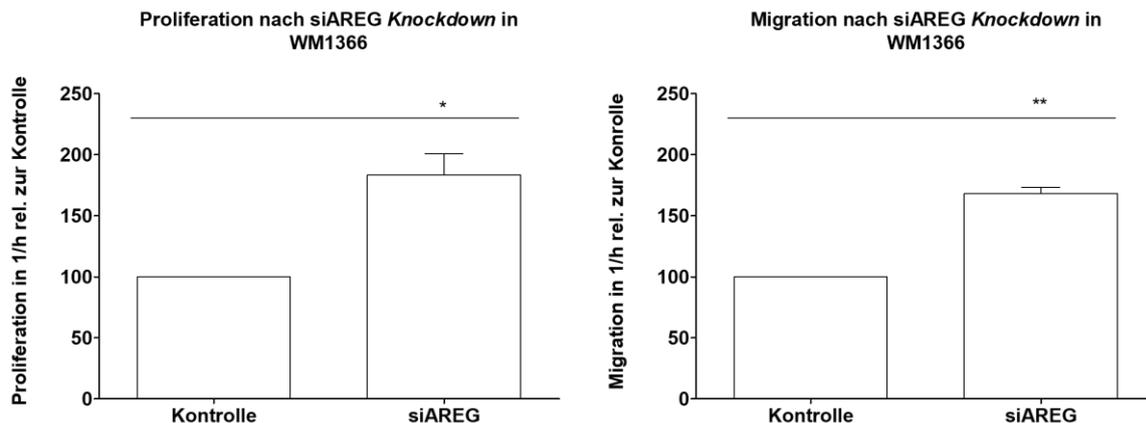


Abbildung 17: Messung von Proliferations- und Migrationseigenschaften in Melanomzellen nach siAREG Knockdown.

Die mit *AREG* spezifischer siRNA behandelte Melanomzelllinie WM1366 (siAREG) wurde auf ihre veränderte Eigenschaft zur Proliferation und Migration im Vergleich zu den Kontrollen mittels RTCA (Real-Time-Cell-Analyses) überprüft. Hierfür wurden die Zellen in spezifisch für RTCA geeignete Platten ausgesät und die Proliferation und Migration mithilfe der elektrischen Impedanz bestimmt.

5.5.2.3 Verbesserte Sphäroidbildung durch verringerte *AREG* Expression

Die erhöhte Proliferationseigenschaft zeigte sich auch in dem anschließend durchgeführten Sphäroid-Assay. Dabei wurden mit siRNA behandelte WM1366 Zellen in einer speziell für diesen Assay angefertigten 96-Well Platte ausgesät, um die Fähigkeit zur Sphäroid Bildung zu prüfen. Die Sphäroide wurden nach 24 h bzw. 48 h mithilfe eines Lichtmikroskops ausgemessen und die Durchmesser tabellarisch ausgewertet. Es konnten sowohl nach 24 h als auch nach 48 h signifikant größere Durchmesser bei den mit *AREG* siRNA behandelten Zellen gegenüber den Kontrollzellen gemessen werden (Abbildung 18).

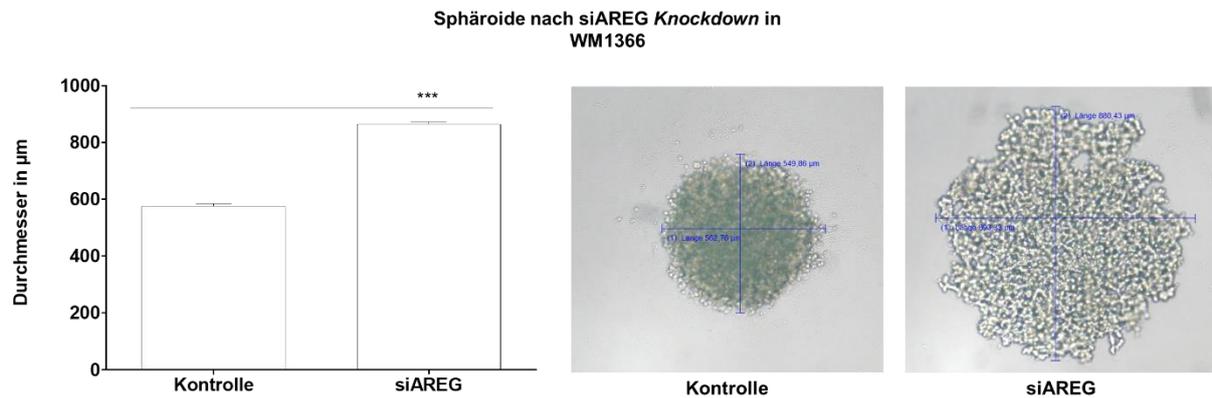


Abbildung 18: Sphäroidbildung nach siAREG *Knockdown*.

Die mit *AREG* spezifischer siRNA behandelte Melanomzelllinie WM1366 (siAREG) wurde auf ihre veränderte Eigenschaft zur Sphäroidbildung im Vergleich zu den Kontrollen untersucht. Hierfür wurden Zellen in eine speziell für Sphäroidbildung konstruierte Platte ausgesät. Die Durchmesser der gebildeten Sphäroide wurden nach dem *Knockdown* mithilfe eines Lichtmikroskops ausgemessen.

5.5.2.4 Erhöhte *AREG* Expression durch Transfektion eines *AREG* Expressionsvektors

Im Anschluss an den *Knockdown Versuch* wurde mithilfe eines *AREG* Vektor Konstrukts eine Überexpression durchgeführt. Wiederum wurden die Zellen WM1366 verwendet, welche bereits generell eine erhöhte *AREG* Expression aufweisen. Dennoch wurde eine um ein Vielfaches erhöhte Expression von *AREG* in den transfizierten Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit einem Vektor ohne *AREG* Konstrukt behandelt wurden, erzielt (Abbildung 19). Die höchsten Werte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ergaben sich nach 24 h. Es war aber auch nach 48 h weiterhin ein deutlich erhöhtes Expressionslevel zu sehen (Abbildung 19).

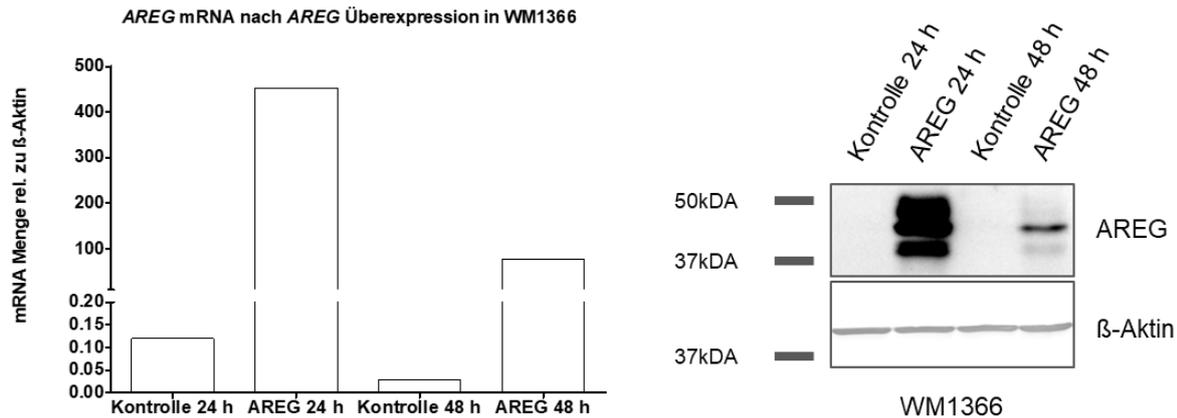


Abbildung 19: Nachweis einer erhöhten AREG mRNA- und Proteinexpression mittels qRT-PCR und Western Blot nach AREG Überexpression.

Die mit *AREG Expressionsvektor* (AREG) und Kontrollvektor behandelte Melanomzelllinie WM1366 wurde auf ihre AREG mRNA- und Proteinexpression mithilfe von qRT-PCR und Western Blot überprüft. Die RNA-Isolation und Proteinlyse wurden 24 h und 48 h nach Transfektion durchgeführt. Dann wurde die gewonnene RNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Aus der cDNA wurde in der qRT-PCR mithilfe spezifischer Primer DNA des Gens *AREG* amplifiziert und durch die Integration von SYBR Green gemessen. Die mRNA Menge wurde relativ zur mRNA Menge des Haushaltsgenes β -Aktin aufgetragen. AREG und die Ladekontrolle β -Aktin wurden mittels spezifischer Antikörper im Western Blot nachgewiesen.

5.5.2.5 Verringerte Proliferation bei erhöhter AREG Expression

Bei den mit dem *AREG* Vektor behandelten Zellen wurde ebenfalls eine Proliferationsanalyse mittels RTCA durchgeführt. Dabei wurde tendenziell ein leichter Rückgang der Proliferationsrate bei den mit *AREG* transfizierten Zellen gegenüber den Kontrollen gemessen (Abbildung 20). Es konnte dabei jedoch keine Signifikanz erreicht werden.

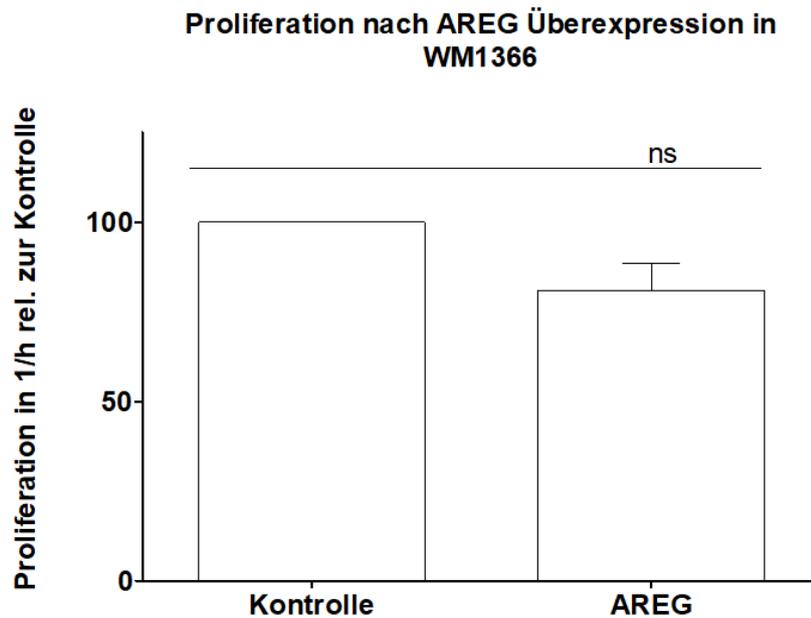


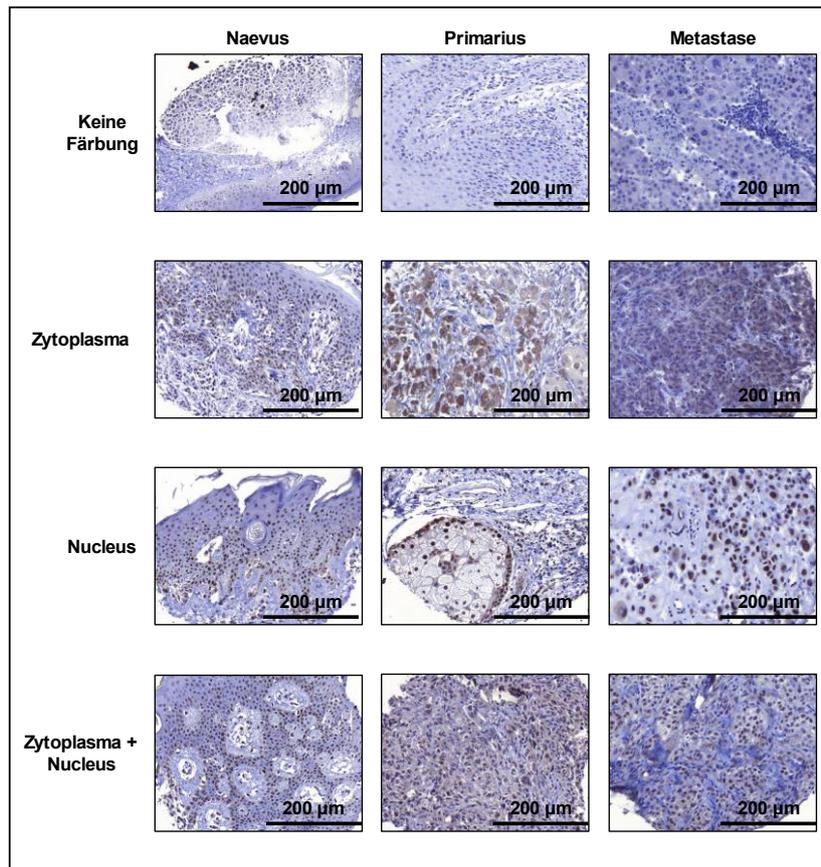
Abbildung 20: Messung von Proliferationseigenschaften in Melanomzellen nach AREG Überexpression. Die mit *AREG* Expressionsvektor (*AREG*) und Kontrollvektor behandelte Melanomzelllinie WM1366 wurde auf ihre veränderte Eigenschaft zur Proliferation mittels RTCA (Real-Time-Cell-Analyses) überprüft. Hierfür wurden die Zellen in spezifisch für RTCA geeignete Platten ausgesät und die Proliferation mithilfe der elektrischen Impedanz bestimmt.

5.5.3 Immunhistochemischer Nachweis der intrazellulären Lokalisation von *AREG* in Melanomstanzen

Da sich in den viralen Transduktionsexperimenten eine gewisse Korrelation von BRAFV600E und *AREG* Expression gezeigt hatte, wurde diese in einer immunhistologischen Färbung von Melanomgeweben untersucht. Es wurden jeweils Gewebeschnitte von verschiedenen Melanomstanzen mit einem BRAFV600E spezifischen Antikörper und einem *AREG* Antikörper gefärbt. Aufgrund nur kleiner und kostspieliger Mengen des BRAFV600E Antikörpers konnten keine ausreichenden Etablierungsexperimente für die Bestimmung der idealen Antikörperkonzentration für die Immunhistologie durchgeführt werden. Die Schnitte konnten deshalb hinsichtlich ihres BRAF-Mutationsstatus leider nicht vollständig beurteilt werden.

In einem weiteren Ansatz wurde ein anderes Set an Melanomstanzen mit dem *AREG* Antikörper gefärbt. Bei diesen Melanomstanzen waren im Gegensatz zu den im ersten

Ansatz verwendeten Stenzen Informationen über den jeweiligen Patienten und den BRAF Mutationsstatus vorhanden. Die 241 Schnitte wurden zuerst auf die jeweilige zelluläre Lokalisation von AREG untersucht und dabei in die Kategorien -positive Kern- und Cytoplasmafärbung- und -keine Antikörperdetektion vorhanden- eingeteilt (Abbildung 21). Im Weiteren wurden diese Daten mit dem Mutationsstatus und der Tumorprogression aus den Patientendaten verglichen (Abbildung 22). Dabei zeigte sich keine Assoziation der AREG Lokalisation in bestimmten Zellkompartimenten, abhängig von dem jeweiligen Mutationsstatus. Bei der Lokalisation abhängig von der Tumorprogression war eine vorwiegende Expression von AREG in den Kernen von Naevi Stenzen zu erkennen (Abbildung 21). Bei den Stenzen aus Primärtumoren und Metastasen konnte sowohl eine Lokalisation im Kern als auch im Zytoplasma beobachtet werden (Abbildung 21).



AREG Lokalisation in Melanomstanzen abhängig vom Tumorstadium

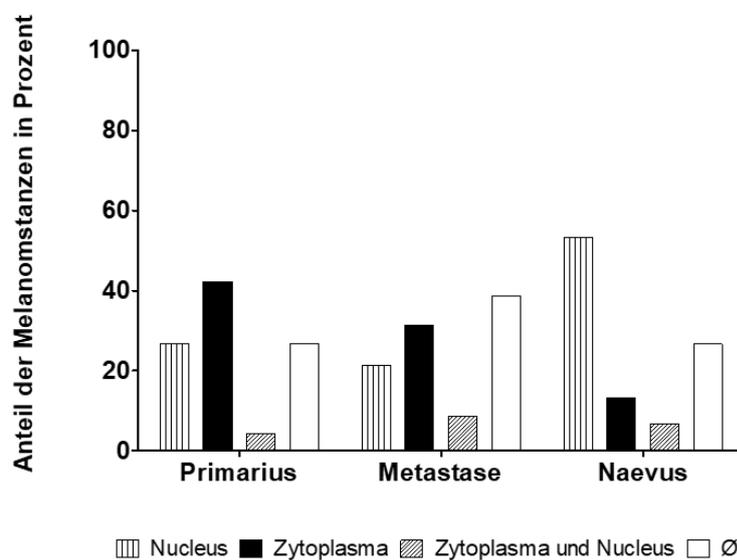
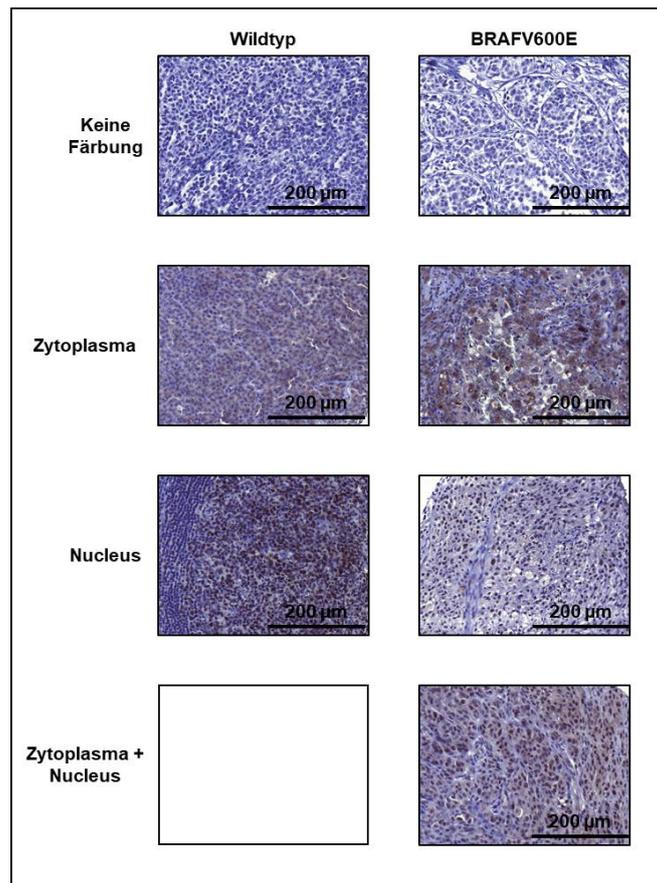


Abbildung 21: Immunhistochemischer Nachweis der intrazellulären Lokalisation von AREG.

Die Lokalisation von AREG wurde in Gewebestanzungen aus Naevi oder Melanomen in Zusammenhang mit dem Tumorstadium (Naevus, Primarius und Metastase) analysiert. Hierbei wurde die Lokalisation von AREG in die Kategorien Zytoplasma, Nucleus, Zytoplasma und Nucleus oder keine Färbung (Ø) eingeteilt. Die Färbung (braun) erfolgte mithilfe eines AREG Antikörpers.



AREG Lokalisation in Melanomstanzen abhängig vom Mutationsstatus

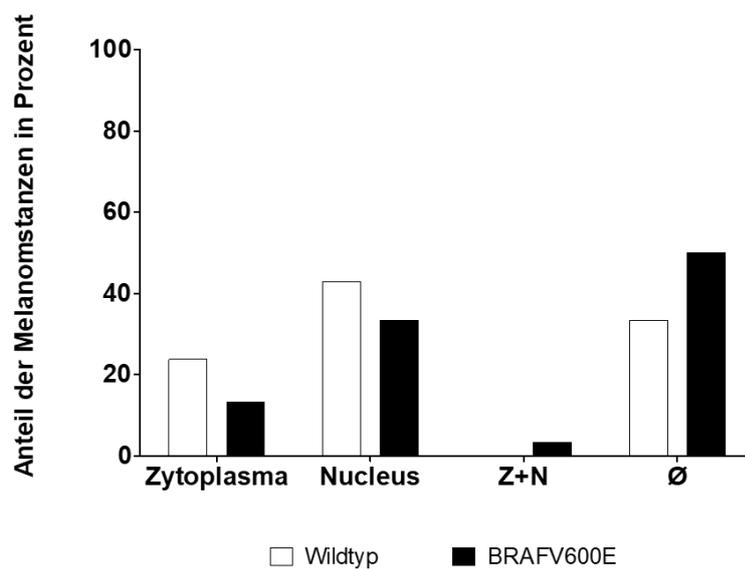


Abbildung 22: Immunhistochemischer Nachweis der intrazellulären Lokalisation von AREG.

Die Lokalisation von AREG wurde in Gewebestanzungen aus Naevi oder Melanomen in Zusammenhang mit dem Mutationsstatus (Wildtyp oder BRAFV600E mutiert) analysiert. Hierbei wurde die Lokalisation von AREG in die Kategorien Zytoplasma, Nucleus, Zytoplasma und Nucleus oder keine Färbung (\emptyset) eingeteilt. Die Färbung (braun) erfolgte mithilfe eines AREG Antikörpers.

5.5.4 Einfluss von Amphiregulin auf Seneszenz im Melanom

Um den Einfluss von AREG auf Seneszenz in Melanomzellen zu untersuchen, wurden WM1366 Melanomzellen mit einer siRNA spezifisch für AREG transfiziert. Diese Zellen wurden einerseits mit dem Seneszenzinduktor Etoposid und als Kontrolle mit DMSO behandelt.

Als Seneszenzmarker wurde die Seneszenz-assoziierte- β -Galactosidase (SA- β -Gal), als Goldstandard gefärbt. Zur Überprüfung der β -Galactosidase Färbung wurde die Zelllinie mit DMSO als Kontrolle bzw. Etoposid zur Seneszenzinduktion behandelt. Seneszente Zellen sind in Abbildung 23 in blau dargestellt.

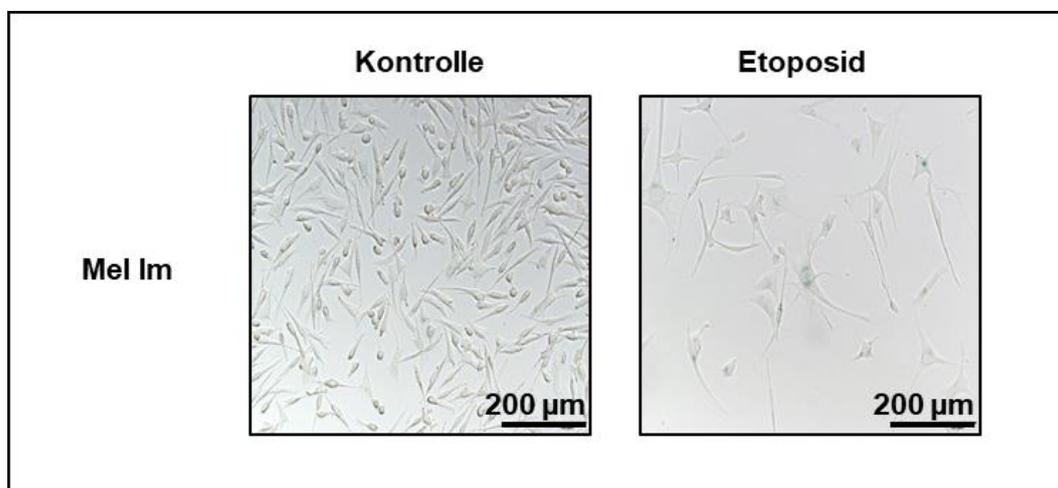


Abbildung 23: Validierung der SA- β -Galactosidase Färbung.

Die Melanomzelllinie Mel Im wurde zur Validierung der SA- β -Gal Färbung mit dem Seneszenzinduktor Etoposid behandelt. Seneszente Zellen zeigen eine Blaufärbung.

Um die Rolle von *AREG* in der Seneszenzentstehung in Melanomzellen zu analysieren, wurden den Melanomzelllinien Mel Im und Mel Wei rekombinantes AREG hinzugefügt. Daraufhin wurden die Zellen auf ihre SA β -Gal Aktivität geprüft (Abbildung 24). Dabei konnten keinerlei seneszente Zellen durch die SA β -Gal Färbung nachgewiesen werden.

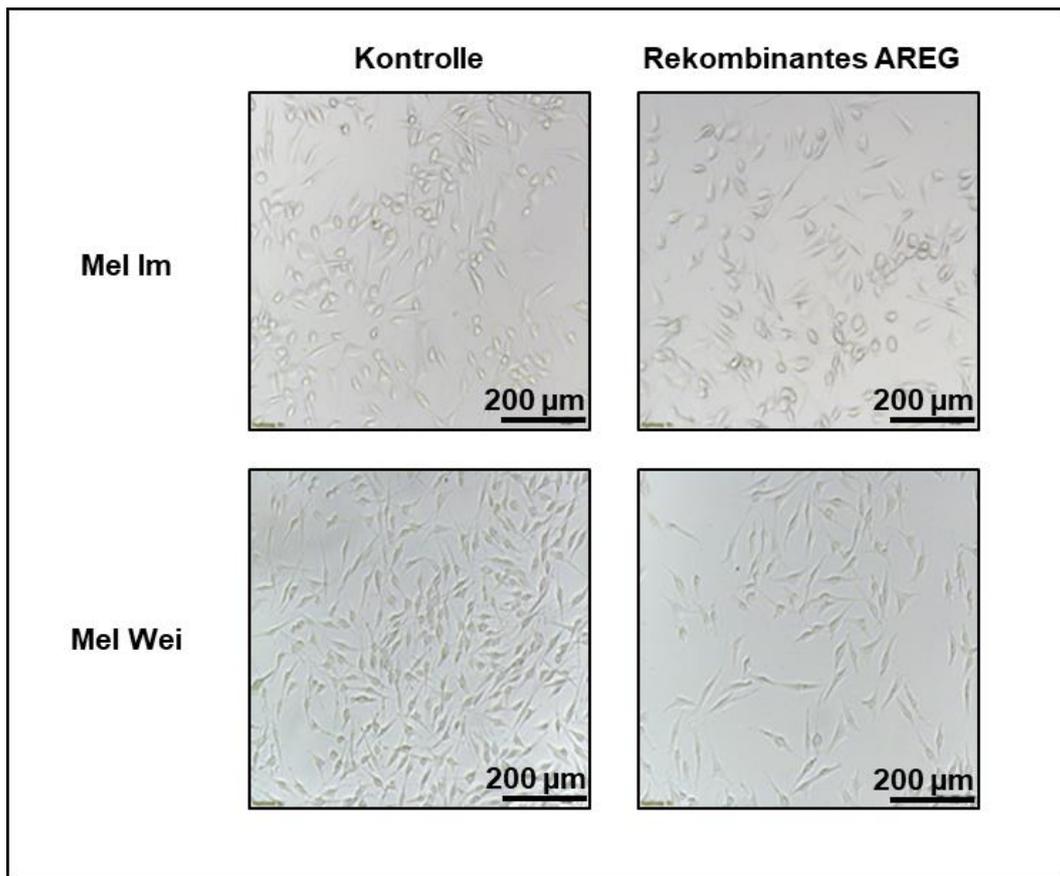


Abbildung 24: SA-β-Gal Färbung von Melanomzellen mit rekombinanten AREG.

Rekombinantes AREG wurde zu den Melanomzelllinien Mel Im und Mel Wei hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen mithilfe der SA-β-Gal Färbung auf Seneszenz getestet. Seneszenz Zellen weisen eine Blaufärbung auf.

6 Diskussion

Da das maligne Melanom zu den aggressivsten Tumorarten mit steigender Inzidenz und einem hohen Metastasierungspotenzial gehört, bedarf es intensiver Forschung, um mögliche neue therapeutische Ansätze oder Biomarker zu finden.

6.1 BRAF-Mutationen in Seneszenz und Tumorentstehung

Aktuelle Studien zeigen, dass ein Großteil der Melanome aus BRAFV600E mutierten Naevi entsteht (Damsky und Bosenberg 2017). Dennoch konnte gezeigt werden, dass eine alleinige Mutation des *BRAF* Gens nicht zur Entartung der Naevi führt, sondern betroffene Zellen in die Seneszenz übergehen (Damsky und Bosenberg 2017). Aufgrund dieser Erkenntnisse ist anzunehmen, dass weitere Mutationen oder epigenetische Veränderungen in anderen Genen letztendlich zur Entartung dieser in Seneszenz befindlichen Naevi führt. In dieser Arbeit wurden deshalb *BRAF* abhängig regulierte Gene untersucht, um tumorfördernde von seneszenzauslösenden Genen zu unterscheiden. Eine Auswahl potenzieller Gene wurde mithilfe zweier Datenbanken getroffen. Durch die Analyse dieser Datenbanken konnten elf Gene ausgewählt werden. Alle ausgewählten Gene zeigten eine signifikante Änderung ihrer Expression in beiden Datenbanken gegenüber den jeweiligen Kontrollen.

In bereits bekannten Experimenten konnte gezeigt werden, dass BRAFV600E transduzierte NHEMs *in vitro* bereits allein durch die Hochregulation von BRAFV600E in Seneszenz übergehen (Michaloglou et al. 2005). Dagegen sollten in dieser Arbeit Mechanismen betrachtet werden, die zur Entstehung von Primärtumoren führen. Dazu wurden im weiteren Verlauf Melanomzelllinien von Primärtumoren mit dem lentiviralen BRAFV600E Konstrukt transduziert. Durch mRNA- und Proteinanalysen dieser Zellen konnten Unterschiede in der Genexpression untersucht werden. Dabei wurden Melanozyten, die durch die BRAFV600E-Mutation in Seneszenz übergangen, mit Zellen von Melanom Primärtumoren, welche durch die Transduktion von BRAFV600E nicht in die Seneszenz eintraten, verglichen.

6.2 BRAFV600E abhängige Regulation von Genen

Die aus der in silico Analyse stammenden Gene SULF1, CRABP2, DUSP6, CDCP1 und NPTX2 konnten nicht mit Signifikanz in den Experimenten mit primären Melanozyten (NHEM) und Tumorzelllinien (WM1366, WM3211 und WM35) validiert und bestätigt werden. Das heißt, diese Gene sind nicht gleichermaßen in BRAFV600E transduzierten NHEMs und in BRAFV600E transduzierten oder positiven (WM35) Zellen induzierbar gewesen, wie es nach der Analyse im Venn Diagramm (Abbildung 4/Schnittmenge 1) verlangt gewesen wäre.

Sulfatase 1 (SULF1) ist ein Enzym, das zur Regulation verschiedener Signalwege von Zellen sekretiert wird. Es gehört zur Familie der Sulfatasen, einer evolutionär konservierten Gruppe von Enzymen, welche als Katalysator für die Hydrolyse des 6-O-Sulfates vom N-Acetyl Glucosamin der Heperanproteoglykan-Sulfate agiert. Neue Analysen weisen auf eine Beteiligung von SULF1 im wnt/BMP-Signalweg und am Wachstum von Fibroblasten hin (Zhao et al. 2006). SULF1 zeigte nach Transduktion von BRAFV600E in Melanomzellen keine signifikante Veränderung der mRNA Expression und gelangte daher nicht in den Fokus unserer Analysen, da wir BRAFV600E-abhängige Gene im Melanom suchten. Wäre SULF1 durch BRAFV600E hochreguliert worden, wie es unsere Tabelle 1 verlangt hätte, hätten wir in unserer Arbeit SULF1 wahrscheinlich zuerst als Onkogen eingestuft. Aktuelle Studien ergaben allerdings bei einer Überexpression von SULF1 in Melanomzellen eine Inhibierung der Proliferation mit Eintritt in einen Zell-Zyklus Arrest und Apoptose. Dabei verhindert die Überexpression von SULF1 die Phosphorylierung der Protein Kinase B (AKT) und begrenzt die Translokation von CDK4 in den Nucleus (Lou et al. 2016). SULF1 ist daher eher als ein Tumor hemmendes Gen zu betrachten.

Cellular retinoic acid binding protein 2 (CRABP2) ist ein sehr kleines Protein mit nur 15 kDa Proteinmasse, welches eine hohe Affinität zu Retinsäuren aufweist. Durch Bindung der CRABP Proteine an Retinsäure wirken diese aktivierend auf nachfolgende Signalwege, welche an Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt sind. Die Familie der CRABP Proteine ist vor allem in sich entwickelnden Geweben und Organen exprimiert und spielt bei deren Morphogenese eine wichtige Rolle. CRABP2 wurde im zentralen Nervensystem, in wachsenden Zellen der Retina und in der Epidermis nachgewiesen. Dabei ist es an der Entwicklung der Motorneurone

des Rückenmarkes und in molekularen Signalwegen zwischen epidermalen und mesenchymalen Zellen beteiligt (Yan et al. 2017). In Brustkrebs zeigt CRABP2 je nach Östrogen-Rezeptor Status unterschiedliche Auswirkungen. Bei positivem Östrogenstatus übt CRABP2 einen fördernden, bei negativem Status einen hemmenden Einfluss auf die Invasion und Metastasierung aus (Feng et al. 2019). In unseren Analysen fanden wir CRABP2 nicht durch BRAFV600E reguliert. Wir konnten in unseren Analysen die Hormonregulation auch gar nicht berücksichtigen, da wir zuerst mit Zelllinien gearbeitet haben. Es kristallisierte sich keine eindeutige Rolle von CRABP2 für uns heraus. Zusätzlich könnten die Abweichungen der Expression von CRABP2 bei den *in silico* Analysen gegenüber den durchgeführten Experimenten aufgrund der verschiedenen Zelllinien mit unterschiedlichen Mutations- und Rezeptor-Status bedingt sein.

Dual specificity phosphatase 6 (DUSP6) ist eine Protein-Phosphatase, welche eine entscheidende Rolle im MAP-Kinase Signalweg einnimmt. DUSP6 blockiert diesen Signalweg, indem es die Phosphorylierung und enzymatische Aktivierung von ERK2 durch Mitogene verhindert. Eine erhöhte Expression von DUSP6 zeigt sich in Herz, Lunge, Gehirn und Nieren (Muda et al. 1996). DUSP6 zeigt in BRAFV600E mutierten Melanomzellen aufgrund der erhöhten MEK Aktivierung eine kompensatorische Erhöhung der Expression. Dadurch wirkt DUSP6 durch die Dephosphorylierung und der damit einhergehenden Hemmung der ERK1/2 Aktivität als Tumorsuppressor (Wittig-Blaich et al. 2017). Die bei den Experimenten zur BRAFV600E Transduktion verwendete Zelllinie WM1366 besitzt allerdings bereits eine endogene Ras Mutation, welche selbst auch zu einer erhöhten MEK Aktivierung führt und dadurch auch zu einer erhöhten DUSP6 Expression führen könnte. Die BRAFV600E Transduktion könnte deshalb aufgrund einer bereits bestehenden erhöhten DUSP6 Expression keine weitere Erhöhung verursachen. Dazu müssten zunächst Zellen sowohl mit und ohne Mutation des Ras oder Raf Gens auf ihre endogene DUSP6 Expressionen getestet werden, um diese dann vergleichen zu können. Wir haben uns des Weiteren nicht weiter auf DUSP6 fokussiert, da es bereits als Tumorsuppressorgen im Melanom beschrieben wurde.

Cub domain containing protein 1 (CDCP1) ist ein Transmembranprotein, welches aus drei extrazellulären CUB Domänen besteht. Höchstwahrscheinlich ist das Protein an der Zell-Adhäsion, Kommunikation und Interaktion beteiligt. Untersuchungen zeigen

eine erhöhte Expression in Darm- und Lungenkrebs (Scherl-Mostageer et al. 2001). Aktuelle Studien zu Brustkrebs zeigen eine erhöhte Expression von CDCP1 in Abhängigkeit der ERK1/2 Aktivität. Dabei führt eine Erhöhung der ERK1/2 Aktivität zu einer gesteigerten CDCP1 Expression (Forte et al. 2018). Auch die tumorfördernden Mutationen von Ras und Raf führen zu einer Erhöhung der ERK1/2 Aktivität und könnten deshalb auch die Erhöhung von CDCP1 begünstigen. Daher könnte, wie im Fall von DUSP6, die endogene Ras-Mutation der Zelllinie WM1366 bereits eine erhöhte Expression von CDCP1 verursacht haben, welche im Anschluss nicht weiter durch die BRAFV600E Transduktion gesteigert werden konnte. Wie bereits vorher erwähnt, müssten für eine Analyse zunächst Zellen mit und ohne Ras bzw. Raf Mutation auf ihre Basisexpression von CDCP1 getestet werden.

Neuronal pentraxin 2 (NPTX2) gehört mit NPTX1 und dem NPTX-Rezeptor zur Familie der langen neuronalen Pentraxine. Diese formen verschiedenste, über Disulfid-Brücken verbundene Formationen, welche dann zur exzitatorischen Synapse wandern. An der Synapse translozieren diese Pentraxine auf die extrazelluläre Oberfläche und binden dort Glutamat sensitive AMPA-Rezeptoren. Dadurch unterstützen sie die neuronale Entwicklung und synaptische Plastizität im Erwachsenenalter. NPTX2 wird vor allem in den Pyramidenzellen exprimiert und von deren Axonenden sezerniert (Xiao et al. 2017). Studien zeigen einen hemmenden Einfluss von NPTX2 in Zellen von Pankreaskarzinomen auf die Proliferation und Invasion. Darüber hinaus konnte eine epigenetische Regulation als einer der entscheidenden Faktoren der Expression von NPTX2 festgestellt werden. Hier führt eine Demethylierung der Promoter Region zu einer erhöhten mRNA Expression (Zhang et al. 2011). Unterschiede in der Methylierung bei Melanozyten und Melanomzellen könnten der Grund für das unterschiedliche Ansprechen auf eine BRAFV600E Transduktion sein.

Für *SERPINB2* zeigte sich nach BRAFV600E Transduktion in der Melanomzelllinie WM3211 eine signifikant erhöhte mRNA-Expression. In den Melanomzelllinien WM1366 und WM35 ergab sich nach BRAFV600E Transduktion dagegen keinerlei Veränderung der *SERPINB2* Expression. WM3211 weist im Gegensatz zu den beiden anderen Zelllinien eine L576P *c-Kit* Mutation auf (Tokuhisa et al. 2014). Diese Mutation könnte eine erhöhte Expression von *SERPINB2* in WM3211 begünstigen, da sowohl die *c-Kit* Mutation als auch *SERPINB2* bekannte tumorfördernde Funktionen erfüllen. Die Arbeitsgruppe um M. Lobell zeigte in einem *gene expression profiling* ein

„typisches Tumorprofil“, in dem c-Kit und SERPINB2 neben 80 weiteren Genen gemeinsam reguliert vorliegen. Aktiviertes c-Kit fördert beispielsweise Tumorangiogenese, während SERPINB2 anti-apoptotische Eigenschaften aufweist (Mahadevan et al. 2006). Eine direkte Verbindung zwischen c-Kit Mutationen und Serpinen konnte in der Literatur aber bisher nicht nachgewiesen werden.

Bezüglich *SLC16A6* zeigte sich nach Transduktion von BRAFV600E in den Zelllinien WM35 und WM3211, nicht jedoch in WM1366, eine erhöhte Expression der mRNA. Durch die Transduktion von BRAFV600E, welche tumorfördernde Wirkung in den Zellen hat, wird vermutlich in den Zelllinien WM35 und WM3211 Proliferation gefördert. Bei erhöhter Proliferation wird in der Zelle vermehrt Energie benötigt. *SLC16A6* gehört zu der Familie der Monocarboxylattransporter, welche durch den Transport von beispielsweise Pyruvat und Ketonkörper in die Zelle zur Energieversorgung beitragen (Halestrap 2012). Die erhöhte Expression von *SLC16A6* infolge der BRAFV600E Transduktion könnte deshalb eine Folge des erhöhten Energieverbrauchs der Zellen sein. Die Zelllinie WM1366 besitzt im Gegensatz zu den beiden anderen Zelllinien eine Q61L *NRAS*-Mutation (Vogel et al. 2015). Wie bereits gezeigt, kann eine gleichzeitige Mutation von proliferationsfördernden RAS und RAF Proteinen, hier *NRAS* und *BRAF*, zu einem gegenteiligen Effekt, nämlich Seneszenz- oder Apoptose-Induktion führen (Cisowski et al. 2016). Dabei kommt es in den Zellen eben nicht zu einer erhöhten Proliferation und somit auch nicht zu einem erhöhten Energiebedarf der Zellen, was keine erhöhte Expression von *SLC16A6* zur Energieversorgung nötig macht. Diese möglichen Wechselwirkungen einer BRAFV600E Mutation und erhöhten Expressionen von *SERPINB2* und *SLC16A6* sollen in weiterführenden Projekten durch weitere Experimente detaillierter untersucht werden. Da allerdings nicht alle Zelllinien, die transduziert wurden, gleichermaßen signifikant auf die Transduktion reagierten, wurde der Fokus auf ein weiteres Molekül gelegt.

6.3 AREG in BRAFV600E Abhängigkeit

In den Analysen von mRNA-Level, der Stärke der Proteinexpression und Festlegung der Lokalisation von AREG durch Immunhistochemie in Melanomzelllinien und Melanomgeweben mit endogen unterschiedlichen *BRAF* Mutationsstatus konnte zunächst kein Zusammenhang zwischen mutiertem BRAFV600E und AREG

festgestellt werden. Lediglich die mRNA- und Proteinexpressionsanalysen (Abbildung 13, Abbildung 15) zeigten die Tendenz, dass Wildtyp BRAF Zelllinien eine leicht erhöhte AREG Expression aufweisen, was konträr zu der ursprünglich angelegten Expressionstabelle 1 ist. Allerdings sind die BRAF Wildtyp Zelllinien auch nicht als repräsentativ anzusehen. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass vor allem die ~240 Tumorstanzen *in vivo* keinen Zusammenhang zwischen dem endogenen BRAF Mutationsstatus und der AREG Proteinmenge zuließen. Ähnliche Beobachtungen werden auch von Yosef Levi et al. bei Untersuchungen im Kolon Karzinom beschrieben (Levi et al. 2013). Es wurde gezeigt, dass keine Korrelation zwischen AREG und einer K-Ras Mutation besteht, die ebenso wie die hier untersuchte BRAFV600E Mutation einen aktivierenden Einfluss auf den MAP-Kinase Signalweg ausübt.

Im Gegensatz dazu konnten in den hier durchgeführten Untersuchungen durch eine BRAFV600E Transduktion systematisch erhöhte AREG mRNA Level gezeigt werden. Die AREG mRNA war sowohl in NHEMs als auch in den drei getesteten Melanomzelllinien infolge einer BRAFV600E Transduktion signifikant erhöht. Auf Proteinebene zeigte sich jedoch in den Zelllinien WM3211 und WM1366 eine erhöhte und in WM35 eine erniedrigte AREG Expression im Vergleich zu den Kontrollen. Dass AREG mRNA durch BRAFV600E Transduktion eine Hochregulation erfährt, während eine endogene BRAFV600E Mutation keinen Einfluss auf die mRNA Level von AREG zu haben scheint, könnte durch die plötzliche Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs durch das Einbringen von BRAFV600E bedingt sein. In endogen BRAFV600E mutierten Zelllinien ist der MAP-Kinase Signalweg durch die BRAFV600E Mutation dauerhaft aktiv und die Zelle befindet sich zum Zeitpunkt der Analyse mehr oder weniger in einem *Steady-State*. Nach Transduktion von BRAFV600E hingegen wird der MAP-Kinase Signalweg sehr plötzlich aktiviert. Die Hochregulation der AREG mRNA könnte hier eine Art Akutreaktion auf die plötzliche Veränderung in den zellulären Mechanismen darstellen. Von besonderem Interesse hierbei ist allerdings, dass in der Zelllinie WM35 zwar die AREG mRNA infolge der BRAFV600E Transduktion erhöht wird, aber wie im Western Blot gezeigt, keine erhöhte Proteinexpression daraus resultiert. Dieses Phänomen könnte darauf hinweisen, dass nicht nur ein Zusammenhang zwischen plötzlich eingebrachtem BRAFV600E und der akuten Regulation von AREG besteht, sondern hierbei auch der ursprüngliche *BRAF* Mutationsstatus der Zelllinie einen Einfluss hat. Diese Vermutung begründet sich in

der Tatsache, dass WM35 als einzige getestete Melanomzelllinie bereits eine endogene BRAFV600E Mutation trägt (Smalley et al. 2008). Die zu Grunde liegenden genauen zellulären Mechanismen konnten in dieser Arbeit nicht weiter analysiert werden.

Da es sich bei AREG in der Regel um ein sezerniertes Protein handelt, wurden in Experimenten Zellkulturüberstände der Melanomzelllinien WM1366 und WM35 nach BRAFV600E Transduktion auf ihre AREG Sekretion untersucht. Dabei konnte keine erhöhte AREG Sekretion beobachtet werden. Wir haben bedauerlicherweise nicht untersuchen können, ob das bedeutet, dass extrazelluläres AREG im Melanom, agierend über den EGF-Rezeptor, im Vergleich zu anderen Tumorentitäten gar keine so große Rolle spielt. In den Melanomzellen WM1366 wurde jedoch eine erhöhte mRNA- und Proteinexpression von AREG nach BRAFV600E Transduktion gezeigt. Aus diesem Grund kann davon ausgegangen werden, dass sich AREG intrazellulär akkumuliert. Diese Beobachtungen stimmen mit Guerard *et al.* überein, welche eine intrazelluläre Akkumulation und Translokation von AREG in den Zellkernen von NSCLC Zellen nach Behandlung mit einem EGFR-TKI aufzeigten (Guerard et al. 2018). Letztendlich ist zu analysieren, wo sich AREG nach BRAFV600E Transduktion in den Zelllinien WM1366 und WM3211 anhäuft und ob dieses extrazelluläre und intrazelluläre *Signaling* Unterschiede in unseren Ergebnissen mit sich bringt.

Was wir in dieser Richtung aber beobachtet haben, ist die Lokalisation von AREG im Zellkern von Primärtumoren des Melanoms. Die durchgeführten immunhistochemischen Analysen zeigen dabei generell, dass das ursprünglich vor allem als sezerniert beschriebene Molekül AREG auch sehr häufig im Zellkern von Melanomzellen aufzufinden ist. Die auffällige Lokalisation von AREG im Zellkern wurde bereits im Ovarialkarzinom, im Brustkrebs und im Hepatozellulären Karzinom beschrieben (Johnson et al. 1991; Salomon et al. 1995; Berasain et al. 2007). Diese vermuten bereits eine unterschiedliche Rolle von sezerniertem extrazellulärem und intrazellulär im Kern befindlichen AREG. Auch im grundsätzlich sehr heterogenen Malignen Melanom könnten diese unterschiedlichen Rollen von extrazellulärem und intrazellulärem AREG eine große Bedeutung haben. Diese könnten sogar von Patient zu Patient variieren. Die große Heterogenität des Malignen Melanoms spiegelt sich auch in der hier gezeigten variierenden Lokalisation von AREG und seiner Rolle im

Melanom wider. Bisher sind dies Annahmen, die durch weitere Analysen genauer betrachtet werden müssen.

Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass die BRAFV600E-Mutation eine wichtige Rolle in der Induktion von Seneszenz spielt (Damsky und Bosenberg 2017). Welche Bedeutung dagegen der *AREG*-Expression bezüglich Seneszenz oder Tumorentstehung zukommt, ist bisher wenig bis gar nicht untersucht. Diese Fragestellung ist Teil einer weiteren Arbeit, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Bosserhoff auf der Grundlage der in dieser Arbeit angefertigten *in silico* Analysen durchgeführt wird.

6.3.1 AREG reguliert Proliferation und Migration in Melanomzellen

Es wurde in der Literatur bereits gezeigt, dass die *AREG* Expression in Krebszellen unterschiedlichen Einfluss auf die Proliferation, Migration, Invasion und das Überleben hat. Analysen des Mamma Karzinoms ergaben eine erhöhte Proliferations- und Migrationsfähigkeit bei gleichzeitig erhöhter *AREG* Expression (Schmucker et al. 2018). Eine andere Arbeitsgruppe beobachtete hingegen erhöhte Invasivität bei erniedrigter *AREG* Expression im Mamma Karzinom (Mao et al. 2018). Diese zwei Studien bilden den ambivalenten Charakter von Amphiregulin ab. Als Ligand des EGF-Rezeptors kann *AREG* vor allem durch die Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs proliferationsfördernde Eigenschaften aufweisen (Damsky und Bosenberg 2017). Neuere Studien hingegen belegen auch die proliferationshemmenden Eigenschaften von *AREG* durch die gemeinsame Translokation mit anderen Faktoren in den Zellkern, infolge dessen es zum Zell-Zyklus Arrest und Proliferationsstopp kommt (Guerard et al. 2018). Es scheint daher wichtig zu sein, die Lokalisation von *AREG* in und außerhalb der Zelle zu berücksichtigen. Um die Auswirkungen der *AREG*-Expression auf die Eigenschaften von Proliferation und Migration in Melanomzellen zu überprüfen, wurden Zellen mit artifiziiell veränderter *AREG* Konzentration generiert. Zunächst wurden mithilfe einer *AREG* spezifischen siRNA Zellen transfiziert, um deren *AREG*-Expression im Vergleich zu den Kontrollen um ein Vielfaches zu senken. Diese Zellen wurden im weiteren Verlauf auf ihre Eigenschaft zur Proliferation, Migration und Sphäroid-Bildung getestet. Dabei zeigte sich in den Zellen mit einer erniedrigten *AREG*-Expression eine erhöhte Proliferations- und Migrationsrate im Vergleich zu den

Kontrollen. Auch die Ausmaße der Sphäroide waren in den transfizierten Zellen vergrößert. Im Anschluss wurden Zellen mit einem *AREG*-Expressionsvektor transfiziert, um eine erhöhte *AREG*-Expression zu generieren. Diese Zellen wurden auf ihre Proliferationseigenschaften getestet, wobei die transfizierten Zellen eine tendenziell verminderte Proliferation gegenüber den Kontrollen zeigten. Diese Daten weisen auf eine inverse Korrelation von *AREG*-Expression und tumorigenen Eigenschaften in Melanomzellen hin. Das heißt, Zellen mit einer niedrigen *AREG*-Expression zeigen erhöhte Proliferationsraten, während Zellen mit einer erhöhten *AREG*-Expression niedrige Proliferationsraten aufweisen (Abbildung 25). *AREG* aktiviert als Ligand des EGF-Rezeptors unter anderem den MAP-Kinase Signalweg (Berasain et al. 2007). Dieser stellt einen wichtigen Signalweg der Zellproliferation und somit in der Tumorentstehung dar. Der MAP-Kinase Signalweg wird in Tumoren oft durch Mutationen wie z.B. von *KRAS* oder *BRAF* dauerhaft aktiviert. Aktuelle Studien zeigen jedoch, dass eine gleichzeitige aktivierende Mutation von *KRAS* und *BRAF* nicht, wie zuerst anzunehmen, zu einem additiven Effekt führt, sondern im Gegenteil sich negativ auf die Tumorentstehung auswirkt (Cisowski et al. 2016). Ein ähnlicher Effekt könnte sich dabei auch bei einer erhöhten Ligandenbindung von *AREG* an den EGF-Rezeptor mit einer gleichzeitig vorhandenen *KRAS*- oder *BRAF*-Mutation in der Zelle einstellen. Durch die doppelte Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs durch *AREG* und *KRAS* bzw. *BRAF* könnte es hier nicht wie zu erwarten, zu einer Verstärkung des Signals kommen, sondern zu einer Abschwächung und somit auch zu einer verminderten Proliferation. Dieser Mechanismus könnte die erhöhte Proliferations- und Migrationsrate der WM1366 Zellen, welche eine endogene *NRAS*-Mutation aufweisen, aber wie in den siRNA Experimenten verringerte *AREG* Expression erzeugten, erklären (Vogel et al. 2015). Weiterhin ergab eine Studie zum kolorektalen Karzinom einen Zusammenhang zwischen *AREG*-Expression und der Überlebenszeit von Patienten. Patienten mit einer niedrigen *AREG*-Expression in den Karzinomzellen wiesen verkürztes Überleben gegenüber Patienten mit erhöhter *AREG*-Expression auf (Stintzing et al. 2018). Sollten sich diese Daten in weiterführenden detaillierten Studien zu *AREG*-Expression im Melanom bestätigen lassen, könnte *AREG* eventuell als prognostischer Marker für die Tumorprogression von erkrankten Melanompatienten oder sogar als therapeutisches Target dienen.

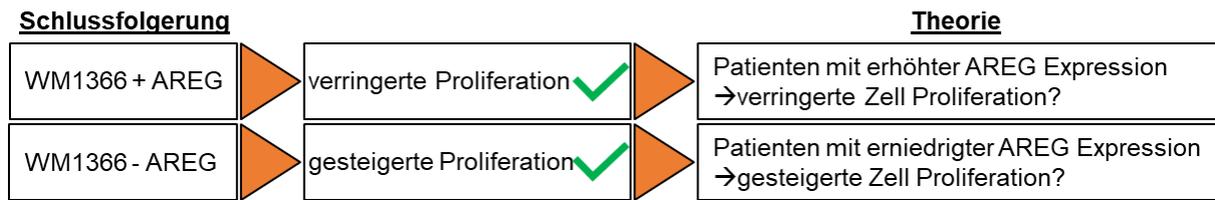


Abbildung 25: Schematische Darstellung einer möglichen Beteiligung AREGs in der Tumorentstehung.

Die gesammelten Daten dieser Arbeit weisen auf einen inversen Zusammenhang von AREG Expression und Zell Proliferation hin. In Melanomzellen (WM1366) mit erhöhter AREG Expression (+ AREG) war verringerte Zell Proliferation zu beobachten, wohingegen in Melanomzellen (WM1366) mit verringerter AREG Expression (- AREG) gesteigerte Proliferation gezeigt wurde.

6.3.2 AREG induziert Seneszenz in NHEMs

Frühere Studien zeigten bereits, dass mit BRAFV600E transduzierte NHEMs in Seneszenz übergehen (Damsky und Bosenberg 2017). Gleichzeitig führt die BRAFV600E Transduktion in NHEMs zu einer erhöhten AREG Expression. Ebenso konnte gezeigt werden, dass erhöhte AREG Expression mit geringeren Proliferationsraten einhergeht. Es kann daher von einem kombinatorischen Effekt von BRAFV600E und AREG in der Seneszenzinduktion in NHEMs ausgegangen werden.

6.3.3 AREG induziert keine Seneszenz in Melanomzellen

Die vorläufigen Ergebnisse der Seneszenzanalyse von Melanomzellen im Zusammenhang mit AREG zeigten keinen Einfluss des Vorhandenseins von AREG auf eine etwaige Seneszenzinduktion in den getesteten Melanomzelllinien. Die SA- β -Gal Färbung der Melanomzelllinien Mel Im und Mel Wei nach Zugabe von rekombinanten AREG konnte keine Korrelation von AREG mit zellulärer Seneszenz zeigen.

6.3.4 AREG als Tumorsuppressor im Melanom

Eine Studie zum Kolon Karzinom ergab bereits, dass niedrige AREG Konzentrationen mit verkürztem Überleben der Patienten assoziiert sind (Stintzing et al. 2018). Eine Analyse der Daten von Melanompatienten weisen auf denselben Effekt von AREG hin.

Patienten mit hoher bis mittlerer AREG Expression zeigten ein verbessertes Überleben gegenüber Patienten mit niedriger AREG Expression. Die in der folgenden Abbildung dargestellte Überlebenskurve (Abbildung 26) wurde mithilfe der online Prognose Datenbank „ProGeneV2“, welche Daten des US-Amerikanischen „National Cancer Institute“ analysiert, erstellt (PROGeneV2).

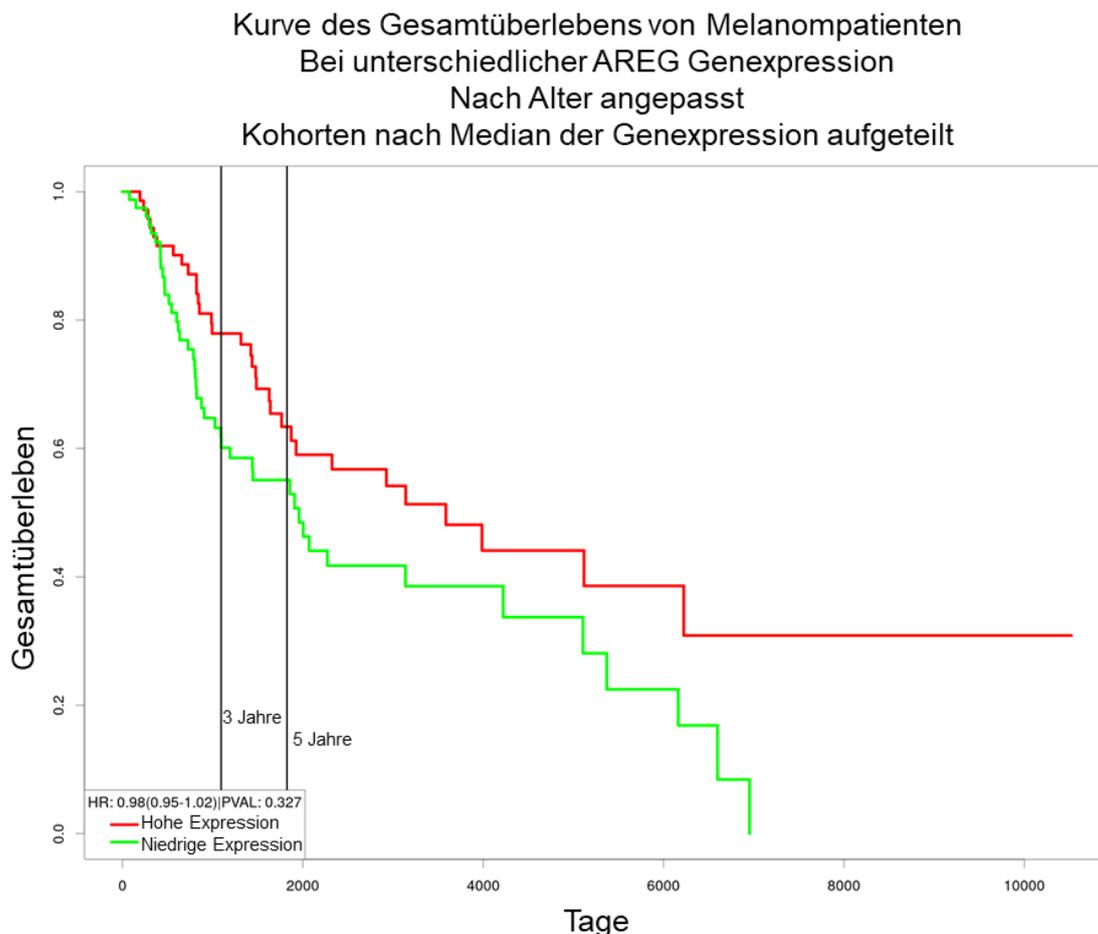


Abbildung 26: Gesamtüberlebenskurve bei niedriger und hoher AREG Genexpression von Melanompatienten.

Analyse von Daten des US-Amerikanischen „National Cancer Institut“ durch die „ProGeneV2“ online Prognose Datenbank. Darstellung von Gesamtüberlebenskurven bei niedriger und hoher AREG Genexpression von Melanompatienten. Die Kurven wurden an das Alter der Patienten angepasst und die Kohorten nach dem Median der AREG Expression aufgeteilt. Grafik modifiziert nach (PROGeneV2).

6.4 Fazit

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von AREG durch BRAFV600E in NHEM mit Wildtyp *BRAF* und in zwei Melanomzelllinien

mit Wildtyp *BRAF* induziert wird. Im Gegensatz dazu wird *AREG* in einer Melanomzelllinie mit bereits endogen mutiertem *BRAF* nicht durch die Transduktion von *BRAFV600E* induziert, sondern im Gegenteil eher reprimiert. Des Weiteren besteht lediglich eine Tendenz, dass Melanomzelllinien mit *BRAFV600E* mutiertem endogenem *BRAF* eher niedrige Mengen an *AREG* aufweisen. Die durchgeführten siRNA Experimente, in denen ein *AREG* Knockdown erzeugt wurde, weisen auf eine tumorsuppressive Eigenschaft von *AREG* hin. Diese Beobachtung wird durch *in silico* Analysen anhand von Patientendaten unterstützt. Abschließend konnte keine Seneszenzinduktion durch *AREG* in Melanomzellen gezeigt werden.

Nach Validierung der Daten und weiteren Forschungsarbeiten ist eine Veröffentlichung der Daten durch Frau Prof. Silke Kuphal geplant.

7 Material

7.1 Verbrauchsmaterial

| Material | Hersteller |
|--|---|
| 15 ml und 50 ml Reaktionsröhrchen (verschließbar) | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland Corning Incorporated, Corning, NY, USA Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| 6-Well-Platten, 96-Well-Platten | Corning Incorporated, Corning, NY, USA Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| 96-Well-Platten (BCA-Assay) | TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Schweiz |
| Cell Strainer, 40 µm Nylon | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Combitips advanced® 1,0 ml und 10,0 ml | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Cryo Tubes, CRYO.S™ | Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland |
| Deckgläschen | R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland |
| Einbettkassetten | KABE LABORTECHNIK GmbH, Nümbrecht-Elsenroth, Deutschland |
| Einmal-Filterhalter 0,45 µm und 0,2 µm | Sartorius, Göttingen, Deutschland |
| Entsorgungsbeutel | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| E-Plate | Acea Biosciences, San Diego, CA, USA |
| M-Plate | Acea Biosciences, San Diego, CA, USA |
| Glaspipetten (5 ml, 10 ml, 20 ml) | Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland |
| Homogenizer Mini Columns | Omega Bio-tek, Norcross, GA, USA |

| | |
|--|---|
| LightCycler® 480 Multiwell Plate 96, white | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland |
| LightCycler® 480 Sealing Foil | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland |
| Nuclon Sphera | Thermo Scientific, Massachusetts USA |
| Objektträger | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Pasteur-Pipetten Glas 150 mm | VWR, Radnor, PA, USA |
| Petrischale 60 x 15 mm Easy Grip | Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA |
| Pipettenspitzen 20 µl, 200 µl, 1000 µl | Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland |
| Polycarbonate Filters | Neuro Probe, Gaithersburg, MD, USA |
| Puderfreie Einmal-Untersuchungshandschuhe aus Nitril | Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland |
| PVDF-Membran 0,2 µm (Amersham™ Hybond™) | GE Healthcare, Chicago, IL, USA |
| Reaktionsgefäße 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Rundbodenröhrchen, Polystyrol, 5 ml (FACS Tubes) (Falcon®) | Corning Incorporated, Corning, NY, USA |
| T25, T75, T175 Zellkulturflaschen | Corning Incorporated, Corning, NY, USA |
| Whatman® 3MM Filterpapier | Whatman International Ltd., Maidstone, UK |
| Rotilabo®-Blottingpapier, Dicke 1,5 mm | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Zellschaber | TPP Techno |

7.2 Reagenzien

| Substanz | Hersteller |
|---|--|
| 1kb DNA Ladder | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA Invitrogen, Carlsbad, CA, USA |
| 1-Thioglycerol (C ₃ H ₈ O ₂ S) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| 2-Propanol (Isopropanol) (C ₃ H ₈ O) | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Acrylamid 4K solution (40 %) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Agarose | Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf, Deutschland |
| alle nicht aufgeführten Chemikalien in Pulverform in p.a. Qualität | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Ammoniumchlorid (NH ₄ CL) | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Ammoniumpersulfat (NH ₄) ₂ SO ₈ | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Aqua ad iniectabilia | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland |
| Bromphenolblau (C ₁₉ H ₁₀ Br ₄ O ₅ S) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Bovine serum albumin (BSA) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| CaCL ₂ | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| D-(+)-Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTPs) | Genaxxon bioscience GmbH, Ulm, Deutschland |
| Dimethyl sulfoxide (DMSO) (C ₂ H ₆ OS) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |

| | |
|---|--|
| Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| dN6 Primer | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland |
| Ethanol (C ₂ H ₆ O) | VWR, Radnor, PA, USA |
| Fetal Bovine Serum (FKS) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Formaldehydlösung 37 % | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Glutaraldehyd (C ₅ H ₈ O ₂) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Glycin (C ₂ H ₅ NO ₂) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Histamin Dihydrochlorid 98 % | EGA-Chemie KG, Steinheim/Albuch, Deutschland |
| Isotone Natriumchloridlösung 0,9 % | B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland |
| Insulin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Kaliumchlorid (KCl) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |
| Kaliumhydrogencarbonat (KHCO ₃) | Merck, Darmstadt, Deutschland |
| Kristallviolett (C ₂₅ H ₃₀ ClN ₃) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| LightCycler® 480 SYBR Green I Master | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland |
| Lipofectamine® RNAiMAX | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA |
| L-Glutamin | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland |
| Methanol (CH ₄ O) | Merck, Darmstadt, Deutschland |

| | |
|---|--|
| MidoriGreen Advance | NIPPON Genetics Europe, Düren, Deutschland |
| Milchpulver | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| N, N, N', N'-tetramethyl- ethylenediamine (TEMED) (C ₆ H ₁₆ N ₂) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Natriumchlorid (NaCl) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Natriumdesoxycholat | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Natriumdodecylsulfat (SDS) (C ₁₂ H ₂₅ NaO ₄ S) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Nonidet® P40 | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Penicillin/Streptomycin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Precision Plus Protein™ Dual Color Standards | Bio-Rad, Hercules, CA, USA |
| Protease-Inhibitoren | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland |
| RNase A | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland |
| RNase Away® | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Roti® Load1 4x denaturierend | Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland |
| Sodium bicarbonate solution (NaHCO ₃) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Sulfosalicylsäure | Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz |
| Taq DNA Polymerase | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland |
| Trichloressigsäure (C ₂ HCl ₃ O ₂) | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland |

| | |
|----------------------------|--|
| Trypsin | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Tween® 20 (C58H114O26) | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| β-Mercaptoethanol (C2H6OS) | Carl Roth GmbH + |

7.3 Medien und Puffer für Zellkultur

| Medium | Zelltyp | Hersteller |
|---|--------------------|---|
| DMEM w/o Phenolred (Transfektionsmedium) | HEK293T | PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland |
| Dulbecco's Modified Eagle's Medium – low glucose (DMEM) | Für alle Zelltypen | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS) | Für alle Zelltypen | Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland |
| MCDB | Wistar Zellen | Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland |
| Leibowitz | Wistar Zellen | Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland |

7.4 Kits

| Kit | Hersteller |
|-------------------------------|--|
| BCIP/NBT Kit | Life Technologies, Carlsbad, CA, USA |
| E.Z.N.A.® Total RNA Kit I | Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA VWR, Radnor, PA, USA |
| Pierce™ BCA Protein Assay Kit | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |

| | |
|---|---|
| Precellys Lysing Kit, Tissue homogenizing CKMix | Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, Frankreich |
| QIAamp® DNA Mini Kit | Qiagen, Hilden, Deutschland |
| SuperScript® II Reverse Transcriptase | Invitrogen, Carlsbad, CA, USA |
| XTRA Midi Plus NucleoBond® | Machery-Nagel Düren, Germany |
| Senescence β -Galactosidase Staining Kit | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |

7.5 Antikörper

7.5.1 Primäre Antikörper

| Antigen | Host / Isotype | Reaktivität | Verwendung | Verdünnung | Hersteller |
|---|---------------------------|--------------------------|-------------------|-------------------|-------------------------------------|
| Amphi- regulin (AREG) TA590091 | Rabbit monoclonal | Human, Dog, Monkey | WB, IHC | 1:2500 | OriGene Technologi es, Inc. |
| BRAF (V600E) 31-1042-00 | Rabbit monoclonal | | WB, IHC | 1:1000 | RevMAb Bioscience s USA, Inc. |
| Amphi- regulin (AREG) 66433-1-Ig | Mouse monoclonal | Human, Rat, | WB, | 1:2000 | Proteintech |
| β-aktin | Mouse monoclonal | | WB | 1:5000 | Sigma Aldrich |

7.5.2 Sekundäre Antikörper

Die Abkürzung „AP“ steht für Alkalische Phosphatase, „HRP“ für Horseradish Peroxidase.

| Reaktivität | Verwendung | Verdünnung | Hersteller |
|--------------------|-------------------|-------------------|---|
| Anti-Rabbit-AP | WB | 1:2000 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| Anti-Rabbit-HRP | WB | 1:2000 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |

| | | | |
|----------------|----|--------|---|
| Anti-mouse-AP | WB | 1:2000 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |
| Anti-mouse-HRP | WB | 1:2000 | Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA |

7.6 Puffer und Lösungen

| Medium/Puffer/Lösung | Herstellung |
|--------------------------|--|
| ACK-Puffer (10-fach) | 1,55 M NH ₄ Cl 100 mM KHCO ₃ 0,1 mM Na ₂ EDTA pH 7,4 steril filtriert, 4 °C |
| Agarosegel (1,5 - 3,0 %) | 1,5 - 3,0 g Agarose in 100 ml 1x TAE 5 µl <i>MidoriGreen Advance</i> auf 100 ml |
| APS-Lösung (10 %) | 1 g Ammoniumpersulfat in 10 ml ddH ₂ O |
| Blockingreagenzien | 5 % BSA / TBS-Tween® 20 (0,1 %) 5 % Milchpulver / TBS-Tween® 20 (0,1 %) |
| Blotpuffer | 1,5 g Tris / HCl pH 8,5 7,1 g Glycin 50 ml Methanol ddH ₂ O ad 500 ml |
| DNA-Loading Puffer | 40 % Saccharose 0,25 % Xylencyanol 0,25 % Bromphenolblau in ddH ₂ O |
| Elektrodenpuffer | 3 g Tris / HCl pH 8,5 1 g SDS (10 ml 10 % SDS) 14,4 g Glycin ddH ₂ O ad 1 l |
| Ethidiumbromidlösung | 0,04 % (w/v) Ethidiumbromid in ddH ₂ O |
| Kristallviolett-Lösung | 23,8 ml Glutaraldehyd 36,2 ml Kristallviolett 10 ml 10-fach PBS 30 ml ddH ₂ O |
| PBS (10-fach) | 80 g / l NaCl (1370 mM) 2,0 g / l KCl (27 mM) |

| | |
|------------------------|---|
| | <p>14,4 g / l Na₂HPO₄ (80 mM) 2,4 g / l KH₂PO₄ (18 mM) ddH₂O ad 1 l auf pH 7,4 eingestellt und autoklaviert</p> |
| RIPA-Puffer | <p>150 mM NaCl 0,5 % Natriumdesoxycholat 1 % Nonidet® P40 10 ml Proteaseinhibitoren 0,1 % SDS 50 mM Tris / HCl pH 7,5</p> |
| RNase A Lösung | <p>10 mM Tris / HCl pH 7,0 10 mg / ml RNase A 15 min Inkubation bei 100 °C</p> |
| Sammelgel | <p>375 µl Acrylamid (40 %) 450 µl 1 M Tris 6,8 2,85 ml ddH₂O 37,5 µl SDS (10 %) 25 µl APS (10 %) 3,5 µl TEMED</p> |
| SDS-PAGE-Laufpuffer | <p>25 mM Tris / HCl pH 8,5 200 mM Glycin 0,1 % SDS</p> |
| TAE-Puffer (50-fach) | <p>2 M Tris / Acetat 50 mM EDTA</p> |
| TBS (10-fach) | <p>50 mM Tris / HCl pH 7,6 150 mM NaCl</p> |
| TBS-T (1-fach) (0,1 %) | <p>100 ml TBS (10-fach) 900 ml ddH₂O 1 ml (0,1 %) Tween® 20</p> |
| Trenngel (12,75 %) | <p>3,125 ml Acrylamid (40 %) 3,75 ml 1 M Tris pH 8,8 2,97 ml ddH₂O 100 µl SDS (10 %)</p> |

| |
|------------------|
| 50 µl APS (10 %) |
| 10 µl TEMED |

7.7 siRNAs

| Zielgen | siRNA | Zielsequenz [5' - 3'] | Transfektion |
|---------|-----------|---------------------------|---------------------------|
| AREG | Hs_AREG_2 | CTGCCAAGTCATA GCCATAAA | Lipofectamine® RNAiMAX |
| AREG | Hs_AREG_3 | ATGGATTTGAGGTT ACCTCAA | Lipofectamine® RNAiMAX |

7.8 Oligonukleotide für quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

| Gen | Spezies | Sequenz [5' - 3'] <i>forward und reverse</i> | Annealing- / Messtemperatur |
|---------|---------|--|--------------------------------|
| CDCP1 | Human | For: CGGGGCAGAAG CTTTTGAGA Rev: AACGATGTCGA GGGCTGAAG | 62 °C / 86 °C |
| AREG | Human | For: ATGCTGGATTG GACCTC Rev: AGCCAGGTATT TGTGGTTCGT | 60 °C/86 °C |
| AREG | Human | For: ACGAACCACAA ATACCTGGCT Rev: ACTTTTCCCCAC ACCGTTCA | 60 °C/86 °C |
| SERPIN2 | Human | For: CAGAACCCAG GCAGTAGAC | 60 °C/86 °C |

| | | | |
|---------|-------|--|-------------|
| | | Rev: GCCAGTTTACA CGGAAAGG | |
| CRABP2 | Human | For: CTGGGGGTGAA TGTGATGCT Rev: GTTCCCCATCG TTGGTCAGT | 60 °C/86 °C |
| EDIL3 | Human | For: GAACCAACTTC AGCAGGTCCC Rev: CAATTCCCAGT GGCCTGAG | 60 °C/86 °C |
| NPTX2 | Human | For: CAAACGTGTCC AATGCTGGG Rev: GTAGTTTGTGC GGAGTGGGA | 60 °C/86 °C |
| SLC16A6 | Human | For: CCAAGCGAAAA GAAAGCCCC Rev: GAGGACAAAAC CAGCTCCGA | 60 °C/86 °C |
| SULF1 | Human | For: ACACCTACTGG TGTTTGCCT Rev: AGGGTACCAGG AACAGCAAC | 60 °C/86 °C |
| SULF1 | Human | For: TCTGTCTTGCA CGAGTTCT Rev: GCTTCCTCCAT CTTTATTTCCAACA | 60 °C/86 °C |
| TFPI2 | Human | For: CTGTCTCCTGC CCCTAGACT Rev: TGGTCGTCCAC ACTCACTTG | 60 °C/86 °C |
| BRAF | Human | For: GGGCTCCAGCT TGTATCAC | 60 °C/79 °C |

| | | | |
|----------------|-------|---|---------------|
| | | Rev: GCATTCTGATG CTTCTGGTG | |
| β -Aktin | Human | For: CTACGTCGCCC TGGACTTCGAGC Rev: GATGGAGCCGC CGATCCACACGG | 60 °C / 86 °C |

7.9 Geräte

| Apparatur | Gerätetyp | Hersteller |
|-----------------------------------|---|---|
| Autoklaven | VE-120 | Systemec GmbH, Linden, Deutschland |
| Blotapparaturen | Trans-Blot SD Semi-dry Transfer Cell | Bio-Rad, Hercules, CA, USA |
| Brutschränke | CO2 Inkubator innova® CO-48 | New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA |
| Brutschränke | CO2 Inkubator Hera Cell 240 | Heraeus, Hanau, Deutschland |
| ELISA-Reader | CLARIOstar | BMG Labtech, Ortenberg, Deutschland |
| Farbkamera DP 80 | DP 80 | Olympus, Tokio, Japan |
| Geldokumentations- anlage | BioDoc Analyze | Analytik Jena AG, Jena, Deutschland |
| | Gel Print 2000i | MWG Biotech, Ebersberg, Deutschland |
| | Transilluminator IL-200-K | H. Saur Laborbedarf, Reutlingen, Deutschland |
| Gelelektrophorese- apparaturen | Wide Mini-Sub® Cell GT | Bio-Rad, Hercules, CA, USA |
| Heiz- und Kühlblöcke | Thermomixer 5436 | Eppendorf, Hamburg, Deutschland |
| Homogenisator | Precellys 24 | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland |
| Magnetrührer | MR 2002, MR 3001 | Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland |
| Mikroskope | AE2000 | Motic, Hong Kong, China |
| | IX83 Fluoreszenzmikroskop | Olympus, Tokio, Japan |

| | | |
|-----------------|--|---|
| | CX31 | Olympus, Tokio, Japan |
| Nanodrop | Nanodrop® ND-1000-UV/Vis Spektralphotometer | Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland |
| pH-Meter | pH 1000 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 |
| | Finnpipette® F2 (2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl) | Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA |
| Pipettierhilfe | accu-jet® pro | Brand GmbH + Co. KG, Wertheim, Deutschland |
| Schwenker | Duomax 2030 | Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland |
| | MR1 | Biosan, Riga, Lettland |
| 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, CA, USA |
| Sterilwerkbänke | HeraSafe KS18 | Heraeus, Hanau, Deutschland |

| | | |
|--------------|----------------------------------|---|
| Thermocycler | Light Cycler® 480 II | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland |
| | Light Cycler® II | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland |
| Vortexer | VortexGenie2 | Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA |
| Waagen | PB3000, AT201 | Mettler Toledo, Greifensee, Schweiz |
| Wasserbad | Julabo TW20 | Julabo, Seelbach, Deutschland |
| xCELLigence | 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 |

7.10 Software

| Software | Herausgeber |
|------------------------------------|---|
| 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 |

7.11 Zelllinien

| Zelllinie | Beschreibung |
|------------------|--|
| NHEM | Normale humane epidermale Melanozyten (NHEM) von PromoCell, (Heidelberg, Deutschland) und Lonza (Basel, Schweiz) |
| SBCL2 | Humane Melanomzelllinie Ursprung: Primärtumor |
| WM1366 | Humane Melanomzelllinie Ursprung: Primärtumor |
| WM3211 | Humane Melanomzelllinie Ursprung: Primärtumor |
| WM793 | Humane Melanomzelllinie Ursprung: Primärtumor |
| WM278 | Humane Melanomzelllinie Ursprung: Primärtumor |

| | |
|-----------|--|
| | |
| WM35 | Humane Melanomzelllinie Ursprung: Primärtumor |
| WM3208 | Humane Melanomzelllinie Ursprung: Primärtumor |
| MeWO | Humane Melanomzelllinie Ursprung: Metastase |
| A375 | Humane Melanomzelllinie Ursprung: Metastase |
| SK-Mel 28 | Humane Melanomzelllinie Ursprung: Metastase |
| Mel IM | Humane Melanomzelllinie Ursprung: Metastase |
| Mel WEI | Humane Melanomzelllinie Ursprung: Metastase |
| HEK-293T | Humane embryonale Nierenzelllinie (Prof. Dr. Stephan Hahn, Abteilung für molekulare Gastroenterologie, Ruhr-Universität Bochum). (ATCC-Nr.: CRL3216) |

8 Methoden

8.1 Bestimmung von Zellzahl

Die Zellzahl einer Zellsuspension wurde bestimmt, indem 10 µl der Zellsuspension unter das Deckglas einer Neubauer-Zählkammer pipettiert wurden und im Anschluss die Zellzahl mithilfe der vier Großquadranten bestimmt wurde. Die Gesamtzahl der jeweiligen Zellsuspension wurde durch die folgende Formel errechnet:

Gesamtzellzahl = Mittelwert Zellzahl pro Großquadrat * Kammerfaktor (=10) * Volumen (* evtl. Verdünnungsfaktor)

8.2 Kultivierung humaner Tumorzelllinien

Die in dieser Arbeit verwendeten Melanomzelllinien wurden in TU 2 % (400 ml MCDB, 100 ml Leibowitz, 10 ml FKS, 250 µl Insulin, 2 M CaCl₂ 420 µl, 10 ml L-Glutamin, 1 % Penicillin / Streptomycin) kultiviert und bei 37 °C und 5 % CO₂ in liegenden T75 Zellkulturflaschen inkubiert. Pro T75 Zellkulturflasche wurden 10 ml Medium benutzt. Die Zellen wurden pro Woche dreimal passagiert, nachdem diese mit DPBS gewaschen und im Anschluss mit 0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA von der Zellkulturflasche abgelöst wurden. Die abgelösten Zellen wurden in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) erneut aufgenommen und bei 300 g für 4 min bei RT zentrifugiert. Nach dem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in TU 2 % resuspendiert und in der gewünschten Verdünnung von 1:2 bis 1:10 in die Zellkulturflasche pipettiert.

8.3 Generierung von Zellpellets

Adhärente Zellen wurden zur Herstellung von Zellpellets mit 10 ml DPBS gewaschen und im Anschluss mit 0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden in 10 ml Zellkulturmedium aufgenommen und bei 300 g für 4 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in 1 ml DPBS resuspendiert

und erneut bei 300 g für 4 min bei RT pelletiert. Nach erneutem Entfernen des Überstandes wurden die Zellpellets bei -20 °C eingefroren oder direkt weiterverarbeitet.

8.4 Transfektion von humanen Zellen

8.4.1 Vektor Transfektion

Für die Transfektion von Melanomzellen mit DNA-Vektoren wurde das Lipofectamine® LTX Transfektionsreagenz (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Dazu wurden Zellen am Tag vor der Transfektion in der gewünschten Konzentration in 6-Well-Platten mit 1,5 ml TU 2 % ausgesät. Pro Doppelwell Transfektionsansatz wurde 1 µg DNA verwendet. Die Reagenzien des Transfektionsansatzes wurden nach Herstellerangaben vorbereitet und nach einem Mediumwechsel auf die bereits an der Platte angehefteten Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurden die Zellen zur Isolierung von RNA, Gesamtproteinlysate oder für funktionelle Assays verwendet.

8.4.2 siRNA Transfektion

Für die Transfektion von Melanomzellen mit siRNA wurde das Lipofectamine® RNAiMAX Transfektionsreagenz (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet. Dazu wurden Zellen am gleichen Tag in der gewünschten Konzentration in 6-Well-Platten mit 2,5 ml TU 2 % ausgesät. Pro Doppelwell Transfektionsansatz wurden 100 pM siRNA verwendet. Die Reagenzien des Transfektionsansatzes wurden nach Herstellerangaben vorbereitet und bei schwenkender Platte auf die noch flotierenden Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 24 h – 72 h wurden die Zellen zur Isolierung von RNA, Gesamtproteinlysate oder für funktionelle Assays verwendet.

8.4.3 Lentivirale Transduktion

Zu Beginn der lentiviralen Transduktion der Melanomzellen wurden die Verpackungszellen vorbereitet. Dazu wurden 2×10^6 Hek293T-Zellen auf 10 cm Schalen ausgesät und 24 h in 10 ml *DMEM high glucose* mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin inkubiert. Nach der Inkubation wurden mithilfe einer Lipofectamin LTX- Transduktion drei verschiedene Vektoren in die Zellen eingebracht. Dies waren ein Hilfsvektor (pCMV Δ R8.2), ein VSV-G Mantelvektor (pHit-G) und der Zielvektor mit der gewünschten DNA (pCDH-CMV-MCS-EF1 α -copGFP). Der Zielvektor enthielt das Onkogen BRAFV600E oder eine GFP gekoppelte ITGA5 Sequenz. Als Kontrolle wurde der Zielvektor ohne zusätzliche DNA transduziert. Für den Transduktionsansatz wurden 6 μ l Mantelvektor mit je 12 μ l Hilfs- und Zielvektor gemischt, dazu 136 μ l DMEM ohne Phenolrot und 24 μ l Lipofectamin Plus Reagenz hinzugegeben. Des Weiteren wurden pro Ansatz 20 μ l Lipofectamin LTX in 140 μ l DMEM ohne Phenolrot vorbereitet. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei RT wurde der Lipofectamin LTX Ansatz zu dem Transduktionsansatz gegeben und für weitere 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der komplette Ansatz in das Medium der Hek293T-Zellen pipettiert. Ab diesem Zeitpunkt galten diese Zellen als potenziell infektiös, weshalb weitere Schritte in einem Labor der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt wurden. Die gewünschte Anzahl an Melanomzellen wurde in einer 6-Well-Platte ausgesät. Nach 17 h Inkubation der Hek293T-Zellen bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium entfernt, 7 ml neues Medium hinzugegeben und bei gleichen Bedingungen erneut inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde der Virusüberstand entnommen und durch einen Sterilfilter (Porengröße 0,45 μ m) filtriert. Von den Zielzellen wurde das Medium abgesaugt und diese in einem weiteren Schritt mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurde der Virusüberstand inklusive Polybrene (1 μ l/ml) zu den Zielzellen, in diesem Fall die Melanomzelllinie WM1366, hinzugegeben und weiter bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach weiteren 24 h wurde sämtlicher Virusüberstand entfernt, die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und neues Medium hinzugegeben. Die Zellen wurden daraufhin weitere 72 h inkubiert, bevor der Überstand erneut von den Zellen genommen und diese zweimal mit PBS gewaschen wurden. Eine erfolgreiche Transduktion wurde mittels eines Mikroskops (Olympus IX83 invertiertes Mikroskop, Olympus CellSens Dimension Software) und einem mit dem Zielvektor

gekoppelten GFP-Konstrukt überprüft. Die nun von Viruspartikel freien Zellen konnten wieder in ein Labor der Sicherheitsstufe 1 überführt und weiter prozessiert werden.

8.5 Plasmid Herstellung

8.5.1 Transformation

Für die Transformation wurde 1 µl Plasmid DNA zu 50 µl DH 10 Betakompetenten E-Coli Bakterien hinzugegeben. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis wurde für 30 s ein Heat Shock bei 42 °C durchgeführt. Nach weiteren 5 Minuten auf Eis wurden dem Ansatz 950 µl SOC Medium hinzugefügt. Dieser wurde anschließend bei leichtem Schütteln (300 rpm) bei 37 °C für 60 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde der Ansatz bei 400 rpm für 5 Minuten zentrifugiert und 800 µl Überstand dekantiert. Die übrigen 200 µl wurden resuspendiert und je 100 µl pro Vektor auf eine mit Ampicillin beschichtete LB-Agar Platte aufgetragen. Der Ansatz wurde über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

8.5.2 Plasmid Isolation (Mini/Midi)

Einzelne Bakterienkolonien wurden von der LB-Agar Platte genommen und in 3 ml LB-Medium mit 6 µl Ampicillin über Nacht bei 37 °C im BakterienSchüttler inkubiert. Aus diesem Ansatz wurden im Anschluss 50 µl entnommen und in 50 ml LB-Medium mit 100 µl Ampicillin erneut über Nacht bei 37 °C im BakterienSchüttler inkubiert. Anschließend wurde die Kultur bei 4000 rpm 15 min lang bei einer Temperatur von 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das gewonnene Pellet wurde entweder bei -20 °C weggefroren oder direkt zur DNA Isolation weiterverwendet.

Die Plasmid Isolation wurde nach Anleitung des „NucleoBond® XTRA Midi Plus“ Kit (Machery-Nagel Düren, Germany) durchgeführt. Mit Ausnahme des letzten Schritts. Hier wurde die DNA mit DNase freiem Wasser statt mit dem enthaltenem Eluationspuffer eluiert. Zur Kontrolle der isolierten DNA wurden ein Restriktionsverdau mit anschließender Auftrennung durch ein Agarose Gel durchgeführt.

8.5.3 Restriktionsverdau

Um hergestellte DNA zu kontrollieren, wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Dabei wurden je 1 µl des hergestellten Plasmids und des benötigten Puffers mit je 0,5 µl der jeweiligen Restriktionsenzyme zusammen pipettiert und mit autoklaviertem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde 1 h bei 37 °C inkubiert und die Enzyme anschließend bei 70 °C für 15 min inaktiviert. Das Produkt wurde zur Kontrolle auf ein Agarose Gel aufgetragen.

8.6 Sphäroid Assay

Mithilfe eines Sphäroid Assays können Zellen auf mögliche Stammzeleigenschaften, wie sie bei Tumorzellen vorkommen, getestet werden und Auswirkungen veränderter Genexpression beobachtet werden.

Dabei wurden pro Kondition 4000 Zellen pro Well in 100 µl Medium auf einer 96-Well-Platte speziell für Sphäroid Bildung, (Nuclon Sphera, Thermo Scientific, Massachusetts USA) ausgesät und anschließend 24 h – 72 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Im Anschluss fand die Auswertung des Assays am Mikroskop (Inversmikroskop IX83 Olympus) statt.

8.7 xCELLigence/RTCA

Das xCELLigence/RTCA-System (engl. Real Time Cell Analyzer) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) ist ein System, mithilfe dessen eine kontinuierliche Überwachung adhärenter Zellen und mögliche Veränderungen des zellulären Verhaltens durch die Messung der Impedanz ermöglicht wird. Durch Änderungen in der Impedanz, ausgelöst durch veränderte Wechselwirkung zwischen den elektrischen Sensoren und den Zellen, lassen sich Rückschlüsse auf Zellmigration, Proliferation, Morphologie und Viabilität der Zellen schließen. Wesentlicher Vorteil dieser Technik ist die Möglichkeit adhärente Zellen markierungsfrei zu untersuchen. In diesem Fall wurde das xCELLigence/RTCA-System benutzt, um den Einfluss einer veränderten *AREG* Expression auf die Proliferations- und Migrationseigenschaften von

Melanomzellen zu beobachten. Dafür wurden für dieses System konzipierte *E-Plates* (Acea Biosciences, San Diego, USA), geeignet zur Proliferationsmessung, und *CIM-Plates* (Acea Biosciences, San Diego, USA), geeignet zur Migrationsmessung, verwendet. Diese messen über Mikroelektroden den elektrischen Widerstand und liefern somit eine Aussage über Wachstums- und Migrationsverhalten der Zellen. Bei beiden Platten wurden die Wells zunächst mit 100 µl Medium befüllt und für 30 min bei 37 °C und 5 % CO₂ equilibriert. In dem unteren Kompartiment der CIM-Platten für die Migrationsmessung befindet sich konditioniertes Medium von Fibroblasten als Chemoattraktant. Die porige Membran ist mit einer Matrix beschichtet, damit die Zellen zuerst an die Membran binden, um in Anschluss durch die Poren zu migrieren. In die Zwischenräume wurde eine definierte Menge autoklaviertes Wasser hinein pipettiert und nach Ablauf der Inkubationszeit wurde eine Hintergrundmessung durchgeführt. Im Anschluss wurden 3000 oder 4000 vorher behandelte Melanomzellen in 50 µl Medium pro Well in die *E-Plates* und 10000 bis 40000 vorher behandelte Melanomzellen in 50 µl Medium pro Well in die *CIM-Plates* hinzugefügt. Die Messung erfolgte über einen Zeitraum von 5 Tagen nach folgendem Zeitschema:

100 Messwerte im Intervall von 5 min

600 Messwerte im Intervall von 15 min

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit der zugehörigen RTCA-Software.

8.8 RNA Isolation aus Zellen

Zur Isolation von RNA aus Zellen wurde das E.Z.N.A.® Total RNA Kit I der Firma Omega Bio-Tek (VWR, Radnor, PA, USA) verwendet. Zunächst wurden die wachsenden Zellen mit DPBS gewaschen und danach durch Behandlung mit 0,05 % Trypsin / 0,02 % EDTA abgelöst. Nach der Wiederaufnahme in 10 ml DPBS und anschließender Zentrifugation bei 1200 rpm für 4 min wurde der Überstand entnommen und das übrige Pellet zur RNA Isolation verwendet. Für die Isolation wurden pro Zellpellet 350 µl 2 % β-Mercaptoethanol zugegeben und homogenisiert. Anschließend wurden 350 µl Ethanol (70 %) zugegeben und vermengt. Diese Probe wurde auf ein im Kit enthaltenes *spin column* aufgetragen und für 60 s bei 10000 rpm zentrifugiert. Der Unterstand wurde verworfen. Auf das weiter verwendete *spin column*

wurden 500 µl *RNA Wash-Buffer I* aufgetragen, wie zuvor zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Es folgten zwei weitere Waschschrte nach oben beschriebenem Muster mit zuerst 500 µl und dann 350 µl *RNA Wash-Buffer II*. Das leere *spin column* wurde bei 13000 rpm für 2 min zentrifugiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt, indem die RNA mit 40 µl RNase freiem Wasser eluiert und bei 10000 rpm für 1 min zentrifugiert wurde. Die gewonnene RNA wurde mithilfe eines Nano-Drop vermessen und bei -20 °C weggefroren.

Nach Überexpression mittels DNA-Vektoren wurde ein DNase-Verdau durchgeführt, um Verunreinigungen durch die verwendete DNA-Vektoren in der gewonnenen RNA zu vermeiden. Dabei wich das Protokoll zur RNA-Isolation ab dem ersten Waschschrte mit *RNA Wash-Buffer I* ab, indem nur die Hälfte des Volumens (250 µl) verwendet wurde. Im Anschluss daran wurden pro Reaktionsgefäß 75 µl eines DNase Mix, bestehend aus 73,5 µl E.Z.N.A. *DNase I Digestion Buffer* und 1,5 µl *RNase free DNase I*, hinzugegeben und für 15 min inkubiert. Daraufhin wurden 250 µl *Wash Buffer I* hinzu pipettiert, 2 min inkubiert und die Probe bei 10000 rpm für 1 min zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das RNA-Isolations-Protokoll bei den Waschschrten mit *RNA Wash Buffer II* fortgesetzt.

8.9 Messung der RNA- und DNA-Konzentration

Mithilfe eines Nanodrop® 2000 UV/Vis Spektralphotometers (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) wurde die Konzentration und Reinheit von RNA und DNA Proben bestimmt. Mittels der Messung der Extinktion E (optische Dichte; engl. absorbance) bei 260 nm konnte die Konzentration der Proben bestimmt werden. Zur Messung des Hintergrundes diente RNase und elektrolytfreies Wasser.

8.10 Reverse Transkription

Zur Durchführung der reversen Transkription einer mRNA (engl. Messenger RNA) in die komplementäre cDNA (engl. complementary DNA) wurden 500 ng der hergestellten RNA eingesetzt und zu folgendem Reaktionsansatz gegeben:

Allgemeiner Reaktionsansatz:

| | |
|--------------------------|------------|
| First Strand Buffer (5x) | 4 μ l |
| DTT (0,1 M) | 2 μ l |
| dNTPs (jeweils 10 mM) | 1 μ l |
| dN6 Primer (2 mg/ml) | 1 μ l |
| RNA + ddH ₂ O | 11 μ l |

Um die Anlagerung der dN6 Primer (Hexanukleotide aller Sequenzkombinationen) zu ermöglichen, wurde der Ansatz bei 70 °C für 5 min erwärmt, um dadurch die RNA Sekundärstrukturen aufzuschmelzen. Nachdem der Ansatz auf RT abkühlen konnte, wurde je 1 μ l (200 Units) Superscript II Reverse Transkriptase hinzugegeben. Die reverse Transkription wurde bei 37 °C für 60 min durchgeführt und im Anschluss bei 70 °C für 10 min die Reverse Transkriptase inaktiviert. Um verbleibende RNA zu degradieren, wurde dem Ansatz je 1 μ l RNase A Lösung hinzugegeben und bei 37 °C für 25 min inkubiert. Die hergestellte einzelsträngige cDNA wurde bei -20 °C weggefroren.

8.11 Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Um die relative Genexpression analysieren zu können, wurde das Verfahren der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR, engl. quantitative real-time PCR) unter Verwendung des LightCycler® 480 Systems (Roche Diagnostics GmbH) herangezogen. Dabei kann die Menge eines cDNA-Fragments, welches während der PCR mittels spezifischer Primer vermehrt wird, durch ein Fluoreszenzsignal, ausgelöst durch den in die doppelsträngige DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffs SYBR® Green, gemessen werden. Das Fluoreszenzsignal steigt hierbei proportional mit dem amplifizierten PCR-Produkt an. Die Expression des Zielgenes wurde auf die Expression des Haushaltsgens (β -Aktin) normalisiert.

Allgemeiner Reaktionsansatz:

| | |
|--------------------------------------|-------------|
| cDNA | 1 μ l |
| LightCycler® 480 SYBR Green I Master | 10 μ l |
| Primer forward (20 mM) | 0,5 μ l |
| Primer reverse (20 mM) | 0,5 μ l |
| ddH ₂ O | 8 μ l |

Temperaturprofil:

| | | |
|------------------------|---------------------|----------------|
| Initiale Denaturierung | 4,4 °C/s auf 95 °C | 10 min |
| Denaturierung | 4,4 °C/s auf 95 °C | 10 s 44 Zyklen |
| Annealing | 2,2 °C/s auf 60 °C | 10 s |
| Amplifikation | 4,4 °C/s auf 72 °C | 20 s |
| Messung | 4,4 °C/s auf X °C | 1 s |
| Schmelzpunktanalyse | 4,4 °C/s auf 95 °C | 5 s |
| | 2,2 °C/s auf 60 °C | 1 min |
| | 0,11 °C/s auf 97 °C | |
| Ende | 2,2 °C/s auf 40 °C | 30 s |

Nach der qRT-PCR wurde zur Überprüfung der spezifischen Amplifikation der cDNA eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt.

8.12 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von DNA-Fragmenten ihrer Größe nach verwendet. Negativ geladene DNA wandert im elektrischen Feld zur Anode. Die einzelnen Fragmente werden dabei proportional zu ihrer Größe im Agarosegel unterschiedlich stark zurückgehalten.

Für die Gele wurden 1,5 g Agarose in 100 ml Acetat-EDTA (TAE) -Puffer aufgekocht und nach kurzem Abkühlen 5 µl MidoriGreen Advance hinzugegeben. Im Anschluss wurde die Lösung in eine entsprechende Gelkammer gegossen und ein Gelkamm hinzugefügt. Um die Laufmittelfront mittels anionischer Farbstoffe zu markieren, wurden den Proben *DNA-Loading* Puffer hinzugefügt. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde der Gelkamm entfernt und die DNA Proben in die jeweiligen Taschen pipettiert. Die Auftrennung der einzelnen Fragmente erfolgte durch das Anlegen einer Spannung von 10 V/cm. Das mithilfe eines UV-Illuminators zur Fluoreszenz angeregte MidoriGreen, welches in die DNA Doppelhelix interkaliert, diente zur Detektion der DNA. Der zusätzlich aufgetragene DNA-Größenstandard wurde zur Fragmentgrößen-Bestimmung benutzt.

8.13 Proteinextraktion

Frisch gewonnene Zellpellets wurden unmittelbar zur Proteinextraktion mit 200 µl RIPA (engl. *Radioimmunoprecipitation Assay*) -Puffer resuspendiert und im Anschluss bei 4 °C für 15 min geschüttelt. Anschließend wurde der Ansatz bei 13000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Die im Überstand gelösten Proteine wurden in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

8.14 Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Konzentration eines Protein-Lysates wurde das BCA-Protein-Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) verwendet. Durch die Biuret-Reaktion, in welcher Cu^{2+} in Anwesenheit von Peptidbindungen zu Cu^+ reduziert wird, wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Durch das Cu^+ und die zugegebene Bicinchoninsäure (BCA) entsteht ein violetter Farbkomplex, dessen Wellenlänge bei 562 nm gemessen wurde. Die unbekannte Proteinkonzentration wurde durch eine BCA-Standardreihe mit bekannten Konzentrationen bestimmt. Der Assay wurde nach den Protokollangaben des Herstellers durchgeführt.

8.15 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung verschiedener Proteine nach ihrem Molekulargewicht verwendet. Dafür wurden zu 30 µg – 40 µg des gewonnenen Proteinlysates reduzierender Lämmli-Puffer hinzugegeben und bei 70 °C für 1 min inkubiert. Dies diente einerseits zur Linearisierung der gefalteten Proteine, andererseits wurden diese durch Natriumdodecylsulfat (SDS, engl. *sodium dodecyl sulfate*), welches sich in dem Puffer befindet, einheitlich negativ geladen. Die Proteine, nun in ihrer Primärstruktur vorliegend und negativ geladen, wurden in die Geltaschen eines 4 %igen Sammelgels pipettiert und mittels Strom von 0,8 mA/cm² in einem 10 % - 15 %igem Trenngel nach molekularem Gewicht aufgetrennt. Ein zusätzlich aufgetragener und ebenfalls aufgetrennter Protein-Größenstandard diente zur späteren Einordnung der detektierten Proteinbanden.

8.16 Proteindetektion mittels Western Blot

Nach der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden die Proteine mittels Western Blot auf eine PVDF-Membran übertragen. Zunächst wurde dafür die Membran für 10 min in Methanol inkubiert, damit deren Hydrophilie reduziert wurde. Das Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) wurde auf die PVDF-Membran gelegt und anschließend auf beiden Seiten mit Transferpuffer getränkten Whatman-Papieren umschlossen. Das entstandene Sandwich wurde in richtiger Orientierung (PAA-Gel über der PVDF-Membran) auf die positive Elektrode der Elektroblotapparatur gelegt. Die Proteine wurden bei 15 - 25 Volt für 55 min von dem PAA Gel elektrophoretisch auf die Membran übertragen. Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die PVDF-Membran 1 h in *Blockingreagenzien* geschwenkt und im Anschluss bei 4 °C über Nacht mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran, welche 3-mal für 10 min mit TBS-T gewaschen wurde, mit einem zum Primärantikörper passenden AP- oder HRP- konjugiertem Sekundärantikörper für 1 h bei RT schwenkend behandelt. Nachdem die Membran erneut 3-mal für 10 min in TBS-T gewaschen wurde, konnte ein Substrat für die alkalische Phosphatase oder für die HRP auftragen werden. Durch die Enzymreaktion wurden die Antikörper gebundenen Proteine visulisiert.

8.17 Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen, welche im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurden und gezeigt werden, wurden von Rudolf Jung (Pathologie, Universitätsklinikum Erlangen) unter Zuhilfenahme des EnvisionTM Systems (Dako, Hamburg, Deutschland) angefertigt.

Um in immunhistochemischen Färbungen Antigen-Expressionen nachzuweisen, wurden die angefertigten Gewebeschnitte für 30 min bei 72 °C inkubiert, um daraufhin in Xylol entparaffiniert zu werden. Die anschließende Rehydrierung der Proben erfolgte durch eine absteigende Alkoholreihe (2x 100 % Propanol, 2x 96 % Ethanol, 1x 70 % Ethanol), woraufhin das Antigen in Tris-EDTA-Puffer für 5 min bei 120 °C demaskiert und mit destilliertem Wasser gewaschen wurde. Mittels der Zugabe von Peroxidase-

Blockpuffer wurde die endogene Peroxidase blockiert. Dadurch wurden unspezifische Färbereaktionen vermieden. Nach der Zugabe von Waschpuffer erfolgte eine 30-minütige Inkubation der Proben mit dem primären Antikörper. Daraufhin folgte ein weiterer Waschschrift mit anschließender 30-minütiger Inkubation der HRP- oder AP-konjugierten Sekundärantikörper. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert mittels Zugaben von DAB+Substrat-Chromogen-Lösung (Dako) die Reduktion von Wasserstoffperoxid, wodurch das zu Beginn fast farblose Chromogen in sein farbiges Endprodukt oxidiert wird. Diese 10-minütige Reaktion ermöglichte somit das farbige Hervorheben des gesuchten Antigens im Gewebeschnitt. Nach einer anschließenden Kontrastfärbung mit Hämatoxylin zur Visualisierung der Zellkerne wurden die Schnitte in eine aufsteigende Alkoholreihe getaucht und mit einem Deckglas versehen.

8.18 SA- β -Galaktosidase-Färbung zum Nachweis seneszenter Zellen

Zum Nachweis seneszenter Zellen wurde das Senescence β -Galactosidase Staining Kit von Cell Signaling Technology gemäß Herstellerangaben verwendet, welches die Aktivität Seneszenz-assoziierte- β -Galactosidase nachweist. Nach 2 - 3 Waschsritten mit PBS wurden die Zellen bei Raumtemperatur für 10 min mit *Fixative Solution* inkubiert und damit fixiert. Für eine 6-Well-Platte wurde folgender Ansatz 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) |

Die Zellen wurden über Nacht bei 37 °C in 1 ml Staining Solution pro 6-Well inkubiert, bevor sie am nächsten Tag dreimalig mit PBS gewaschen wurden. Seneszente Zellen zeigten am Mikroskop eine blaue Färbung. Diese Zellen wurde mikroskopisch in Relation zur Gesamtzellzahl ausgezählt.

8.19 Seneszenzinduktion mittels Etoposid

Die Melanomzellen für die Etoposidbehandlung wurden am Tag zuvor in der Konzentration 200000 Zellen/Well (6-Well-Platte) mit 2,5 ml TU 2 % ausgesät. Für den Behandlungsansatz wurden 2 µl Etoposid / DMSO pro 1 ml Medium gemischt (Konzentration Etoposid / DMSO = 100 nM). Am nächsten Tag wurden dann je 2 ml des Behandlungsansatzes gleichmäßig auf die sitzenden Zellen gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurden die Zellen zur Isolierung von RNA, Gesamtproteinlysate oder für funktionelle Assays verwendet.

9 Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---------------------------------------|
| °C | Grad Celsius |
| μ | mikro- |
| A | Ampere |
| Abb. | Abbildung |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| ds | doppelsträngig |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| <i>et al.</i> | und andere |
| FKS | Fötale Kälberserum |
| g | Gramm |
| GmbH | Gesellschaft mit beschränkter Haftung |
| h | Stunde(n) |
| HRP | <i>horseradish peroxidase</i> |
| kDa | Kilodalton |
| m | milli-; Meter |
| M | Molar |
| mA | Milliampere |
| MAb | monoklonaler Antikörper |
| min | Minute(n) |
| ml | Milliliter |
| n- | nano |
| PAGE | Polyacrylamid Gelelektrophorese |
| pM | Pico Molar |
| rpm | <i>rotations per minute</i> |
| RT | Raumtemperatur |
| siRNA | small interfering RNA |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |

| | |
|-------|------------------------------|
| sec | Sekunde(n) |
| ss | <i>single stranded</i> |
| TEMED | Tetramethylethylendiamin |
| Tris | Trishydroxymehtylaminomethan |
| V | Volt |
| z.B. | zum Beispiel |
| z.T. | zum Teil |

10 Literaturverzeichnis

Arumi-Uria, Montserrat; McNutt, N. Scott; Finnerty, Bridget (2003): Grading of atypia in nevi: correlation with melanoma risk. In: *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 16 (8), S. 764–771. DOI: 10.1097/01.MP.0000082394.91761.E5.

Berasain, C.; Castillo, J.; Perugorría, M. J.; Prieto, J.; Avila, M. A. (2007): Amphiregulin: a new growth factor in hepatocarcinogenesis. In: *Cancer letters* 254 (1), S. 30–41. DOI: 10.1016/j.canlet.2007.01.015.

Berasain, Carmen; Avila, Matías A. (2014): Amphiregulin. In: *Seminars in cell & developmental biology* 28, S. 31–41. DOI: 10.1016/j.semcd.2014.01.005.

Billings, Steven D.; Southall, Michael D.; Li, Tao; Cook, Paul W.; Baldrige, LeeAnn; Moores, William B. et al. (2003): Amphiregulin Overexpression Results in Rapidly Growing Keratinocytic Tumors. In: *The American journal of pathology* 163 (6), S. 2451–2458. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63600-0.

C. Garbe 2019: S3 Leitlinie Melanom Epidemiologie. Unter Mitarbeit von U. Leiter T. Eigntler. Hg. v. Leitlinienprogramm Onkologie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V. (AWMF), Deutschen Krebsgesellschaft e.V. (DKG) und.

Campisi, Judith (2005): Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. In: *Cell* 120 (4), S. 513–522. DOI: 10.1016/j.cell.2005.02.003.

Cisowski, J.; Sayin, V. I.; Liu, M.; Karlsson, C.; Bergo, M. O. (2016): Oncogene-induced senescence underlies the mutual exclusive nature of oncogenic KRAS and BRAF. In: *Oncogene* 35 (10), S. 1328–1333. DOI: 10.1038/onc.2015.186.

Coppé, Jean-Philippe; Patil, Christopher K.; Rodier, Francis; Sun, Yu; Muñoz, Denise P.; Goldstein, Joshua et al. (2008): Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor

suppressor. In: *PLoS biology* 6 (12), S. 2853–2868. DOI: 10.1371/journal.pbio.0060301.

Damsky, W. E.; Bosenberg, M. (2017): Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship. In: *Oncogene* 36 (42), S. 5771–5792. DOI: 10.1038/onc.2017.189.

Davis, Elizabeth J.; Johnson, Douglas B.; Sosman, Jeffrey A.; Chandra, Sunandana (2018): Melanoma: What do all the mutations mean? In: *Cancer* 124 (17), S. 3490–3499. DOI: 10.1002/cncr.31345.

Dong, Jianli; Phelps, Robert G.; Qiao, Rui; Yao, Shen; Benard, Outhiriaradjou; Ronai, Zeev; Aaronson, Stuart A. (2003): BRAF oncogenic mutations correlate with progression rather than initiation of human melanoma. In: *Cancer Res* 63 (14), S. 3883–3885.

Duncan, Lyn McDivitt (2009): The classification of cutaneous melanoma. In: *Hematology/oncology clinics of North America* 23 (3), 501-13, ix. DOI: 10.1016/j.hoc.2009.03.013.

Elder, David E. (2016): Melanoma progression. In: *Pathology* 48 (2), S. 147–154. DOI: 10.1016/j.pathol.2015.12.002.

Erickson, C. A.; Goins, T. L. (1995): Avian neural crest cells can migrate in the dorsolateral path only if they are specified as melanocytes. In: *Development (Cambridge, England)* 121 (3), S. 915–924.

Eroglu, Zeynep; Ribas, Antoni (2016): Combination therapy with BRAF and MEK inhibitors for melanoma: latest evidence and place in therapy. In: *Therapeutic advances in medical oncology* 8 (1), S. 48–56. DOI: 10.1177/1758834015616934.

Feng, Xuefei; Zhang, Miao; Wang, Bo; Zhou, Can; Mu, Yudong; Li, Juan et al. (2019): CRABP2 regulates invasion and metastasis of breast cancer through hippo pathway dependent on ER status. In: *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* 38 (1), S. 361. DOI: 10.1186/s13046-019-1345-2.

Feuerer, Lena; Lamm, Susanne; Henz, Ingmar; Kappelmann-Fenzl, Melanie; Haferkamp, Sebastian; Meierjohann, Svenja et al. (2019): Role of melanoma inhibitory activity in melanocyte senescence. In: *Pigment cell & melanoma research* 32 (6), S. 777–791. DOI: 10.1111/pcmr.12801.

Forte, Luca; Turdo, Federica; Ghirelli, Cristina; Aiello, Piera; Casalini, Patrizia; Iorio, Marilena Valeria et al. (2018): The PDGFR β /ERK1/2 pathway regulates CDCP1 expression in triple-negative breast cancer. In: *BMC cancer* 18 (1), S. 586. DOI: 10.1186/s12885-018-4500-9.

Franziska Walz (2017): ABCDE-Regel bei Hautkrebsvorsorge. Unter Mitarbeit von Henrie. Hg. v. Derma Experten. Online verfügbar unter <https://derma-experten.de/lexikon/abcde-regel/hautkrebs-melanom/>, zuletzt geprüft am 16.08.2020.

Genomic Classification of Cutaneous Melanoma (2015). In: *Cell* 161 (7), S. 1681–1696.

Gimotty, Phyllis A.; van Belle, Patricia; Elder, David E.; Murry, Todd; Montone, Kathleen T.; Xu, Xiaowei et al. (2005): Biologic and prognostic significance of dermal Ki67 expression, mitoses, and tumorigenicity in thin invasive cutaneous melanoma. In: *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23 (31), S. 8048–8056. DOI: 10.1200/JCO.2005.02.0735.

Globocan 2018: Melanoma of skin fact sheet. Unter Mitarbeit von The Global Cancer Observatory. Hg. v. World Health Organisation. Online verfügbar unter <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/cancers/16-Melanoma-of-skin-fact-sheet.pdf>.

Goldstein, Alisa M.; Chan, May; Harland, Mark; Hayward, Nicholas K.; Demenais, Florence; Bishop, D. Timothy et al. (2007): Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents. In: *Journal of medical genetics* 44 (2), S. 99–106. DOI: 10.1136/jmg.2006.043802.

Guerard, Marie; Robin, Thomas; Perron, Pascal; Hatat, Anne-Sophie; David-Boudet, Laurence; Vanwonterghem, Laetitia et al. (2018): Nuclear translocation of IGF1R by intracellular amphiregulin contributes to the resistance of lung tumour cells to EGFR-TKI. In: *Cancer letters* 420, S. 146–155. DOI: 10.1016/j.canlet.2018.01.080.

Halestrap, Andrew P. (2012): The monocarboxylate transporter family--Structure and functional characterization. In: *IUBMB life* 64 (1), S. 1–9. DOI: 10.1002/iub.573.

HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. (1961): The serial cultivation of human diploid cell strains. In: *Experimental cell research* 25 (3), S. 585–621. DOI: 10.1016/0014-4827(61)90192-6.

Hernandez-Segura, Alejandra; Nehme, Jamil; Demaria, Marco (2018): Hallmarks of Cellular Senescence. In: *Trends in cell biology* 28 (6), S. 436–453. DOI: 10.1016/j.tcb.2018.02.001.

Höhn, Annika; Weber, Daniela; Jung, Tobias; Ott, Christiane; Hugo, Martin; Kochlik, Bastian et al. (2017): Happily (n)ever after: Aging in the context of oxidative stress, proteostasis loss and cellular senescence. In: *Redox biology* 11, S. 482–501. DOI: 10.1016/j.redox.2016.12.001.

Itahana, Koji; Campisi, Judith; Dimri, Goberdhan P. (2007): Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 371, S. 21–31. DOI: 10.1007/978-1-59745-361-5_3.

Ito, Shosuke; Wakamatsu, Kazumasa; Sarna, Tadeusz (2018): Photodegradation of Eumelanin and Pheomelanin and Its Pathophysiological Implications. In: *Photochemistry and photobiology* 94 (3), S. 409–420. DOI: 10.1111/php.12837.

Johnson, Gibbes R.; Saeki, Toshiaki; Auersperg, Nelly; Gordon, Alfred W.; Shoyab, Mohammed; Salomon, David S.; Stromberg, Kurt (1991): Response to and expression of amphiregulin by ovarian carcinoma and normal ovarian surface epithelial cells: Nuclear localization of endogenous amphiregulin. In: *Biochemical and biophysical research communications* 180 (2), S. 481–488. DOI: 10.1016/s0006-291x(05)81090-3.

Kanitakis, Jean (2002): Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. In: *European journal of dermatology : EJD* 12 (4), 390-9; quiz 400-1.

Kanzler, M. H.; Mraz-Gernhard, S. (2001): Primary cutaneous malignant melanoma and its precursor lesions: diagnostic and therapeutic overview. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 45 (2), S. 260–276. DOI: 10.1067/mjd.2001.116239.

Kappelmann-Fenzl, Melanie; Gebhard, Claudia; Matthies, Alexander O.; Kuphal, Silke; Rehli, Michael; Bosserhoff, Anja Katrin (2019): C-Jun drives melanoma progression in PTEN wild type melanoma cells. In: *Cell death & disease* 10 (8), S. 584. DOI: 10.1038/s41419-019-1821-9.

Kondo, Taisuke; Hearing, Vincent J. (2011): Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. In: *Expert review of dermatology* 6 (1), S. 97–108. DOI: 10.1586/edm.10.70.

Larkin, James; Chiarion-Sileni, Vanna; Gonzalez, Rene; Grob, Jean Jacques; Cowey, C. Lance; Lao, Christopher D. et al. (2015): Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. In: *The New England journal of medicine* 373 (1), S. 23–34. DOI: 10.1056/NEJMoa1504030.

Lee, Bo Yun; Han, Jung A.; Im, Jun Sub; Morrone, Amelia; Johung, Kimberly; Goodwin, Edward C. et al. (2006): Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. In: *Aging cell* 5 (2), S. 187–195. DOI: 10.1111/j.1474-9726.2006.00199.x.

Lena Feuerer (2019): Die Rolle von MIA (Melanoma Inhibitory Activity) in der melanozytären Seneszenz. Hg. v. Lena Feuerer. Regensburg. Online verfügbar unter <https://docplayer.org/184928423-Die-rolle-von-mia-melanoma-inhibitory-activity-in-der-melanozytaeren-seneszenz.html>.

Levi, Yosef; Barshack, Iris; Avivi, Kamila; Bar-ILan, Dalia; Gutman, Mordechai; Aderka, Dan et al. (2013): Correlation between the presence of Kras mutation and the presence of the proteins epiregulin and amphiregulin in colon cancer tissue. In: *Harefuah* 152 (6), 326-9, 369.

Lou, Xiaoli; Sun, Bin; Song, Jianxing; Wang, Yicun; Jiang, Junhao; Xu, Yang et al. (2016): Human sulfatase 1 exerts anti-tumor activity by inhibiting the AKT/ CDK4 signaling pathway in melanoma. In: *Oncotarget* 7 (51), S. 84486–84495. DOI: 10.18632/oncotarget.12996.

Mahadevan, Daruka; DiMento, Johanna; Della Croce, Kimiko; Riley, Christopher; George, Benjamin; Fuchs, Deborah et al. (2006): Transcriptosome and serum cytokine profiling of an atypical case of myelodysplastic syndrome with progression to acute myelogenous leukemia. In: *American journal of hematology* 81 (10), S. 779–786. DOI: 10.1002/ajh.20690.

Mao, Serena P. H.; Park, Minji; Cabrera, Ramon M.; Christin, John R.; Karagiannis, George S.; Oktay, Maja H. et al. (2018): Loss of amphiregulin reduces myoepithelial

cell coverage of mammary ducts and alters breast tumor growth. In: *Breast cancer research : BCR* 20 (1), S. 131. DOI: 10.1186/s13058-018-1057-0.

Markovic, Svetomir N.; Erickson, Lori A.; Rao, Ravi D.; Weenig, Roger H.; Pockaj, Barbara A.; Bardia, Aditya et al. (2007): Malignant melanoma in the 21st century, part 1: epidemiology, risk factors, screening, prevention, and diagnosis. In: *Mayo Clinic proceedings* 82 (3), S. 364–380. DOI: 10.4065/82.3.364.

Michaloglou, Chrysiis; Vredeveld, Liesbeth C. W.; Soengas, Maria S.; Denoyelle, Christophe; Kuilman, Thomas; van der Horst, Chantal M. A. M. et al. (2005): BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. In: *Nature* 436 (7051), S. 720–724. DOI: 10.1038/nature03890.

Muda, M.; Boschert, U.; Dickinson, R.; Martinou, J. C.; Martinou, I.; Camps, M. et al. (1996): MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase. In: *The Journal of biological chemistry* 271 (8), S. 4319–4326. DOI: 10.1074/jbc.271.8.4319.

Newell, G. R.; Sider, J. G.; Bergfelt, L.; Kripke, M. L. (1988): Incidence of cutaneous melanoma in the United States by histology with special reference to the face. In: *Cancer research* 48 (17), S. 5036–5041.

Onkologie, Leitlinienprogramm (2019): S3-Leitlinie Melanom. Hg. v. AWMF (032/024OL).

Peeper, Daniel S. (2011): Oncogene-induced senescence and melanoma: where do we stand? In: *Pigment cell & melanoma research* 24 (6), S. 1107–1111. DOI: 10.1111/j.1755-148X.2011.00933.x.

Piscioli, Francesco; Pusiol, Teresa; Roncati, Luca (2016): Histopathological determination of thin melanomas at risk for metastasis. In: *Melanoma research* 26 (6), S. 635. DOI: 10.1097/CMR.000000000000288.

Plonka, P. M.; Passeron, T.; Brenner, M.; Tobin, D. J.; Shibahara, S.; Thomas, A. et al. (2009): What are melanocytes really doing all day long...? In: *Experimental dermatology* 18 (9), S. 799–819. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2009.00912.x.

Pollock, Pamela M.; Harper, Ursula L.; Hansen, Katherine S.; Yudt, Laura M.; Stark, Mitchell; Robbins, Christiane M. et al. (2003): High frequency of BRAF mutations in nevi. In: *Nature genetics* 33 (1), S. 19–20. DOI: 10.1038/ng1054.

PROGgeneV2: TCGA SKIN CUTANEOUS MELANOMA DATA. Hg. v. Jefferson.

Robert Koch Institut 2016: Malignes Melanom der Haut. Hg. v. Zentrum für Krebsregisterdaten.

Roncati, L.; Piscioli, F. (2018): AJCC 8th Edition (2017) versus AJCC 7th Edition (2010) in thin melanoma staging. In: *Neoplasma* 65 (5), S. 651–655. DOI: 10.4149/neo_2018_170701N452.

Salomon, D. S.; Normanno, N.; Ciardiello, F.; Brandt, R.; Shoyab, M.; Todaro, G. J. (1995): The role of amphiregulin in breast cancer. In: *Breast cancer research and treatment* 33 (2), S. 103–114. DOI: 10.1007/BF00682718.

Scherl-Mostageer, M.; Sommergruber, W.; Abseher, R.; Hauptmann, R.; Ambros, P.; Schweifer, N. (2001): Identification of a novel gene, CDCP1, overexpressed in human colorectal cancer. In: *Oncogene* 20 (32), S. 4402–4408. DOI: 10.1038/sj.onc.1204566.

Schmucker, Hannah; Blanding, Walker M.; Mook, Julia M.; Wade, Jessica F.; Park, Jang Pyo; Kwist, Kerri et al. (2018): Amphiregulin regulates proliferation and migration of HER2-positive breast cancer cells. In: *Cellular oncology (Dordrecht)* 41 (2), S. 159–168. DOI: 10.1007/s13402-017-0363-3.

Shain, A. Hunter; Yeh, Iwei; Kovalyshyn, Ivanka; Sriharan, Aravindhan; Talevich, Eric; Gagnon, Alexander et al. (2015): The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. In: *The New England journal of medicine* 373 (20), S. 1926–1936. DOI: 10.1056/NEJMoa1502583.

Sharma, Arati; Trivedi, Nishit R.; Zimmerman, Melissa A.; Tuveson, David A.; Smith, Charles D.; Robertson, Gavin P. (2005): Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors. In: *Cancer Res* 65 (6), S. 2412–2421. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-2423.

Shoyab, M.; McDonald, V. L.; Bradley, J. G.; Todaro, G. J. (1988): Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (17), S. 6528–6532. DOI: 10.1073/pnas.85.17.6528.

Singh, Davinder; Attri, Bhupinder Kumar; Gill, Rupinder Kaur; Bariwal, Jitender (2016): Review on EGFR Inhibitors: Critical Updates. In: *Mini reviews in medicinal chemistry* 16 (14), S. 1134–1166. DOI: 10.2174/1389557516666160321114917.

Smalley, Keiran S. M.; Contractor, Rooha; Nguyen, Thiennga K.; Xiao, Min; Edwards, Robin; Muthusamy, Viswanathan et al. (2008): Identification of a novel subgroup of melanomas with KIT/cyclin-dependent kinase-4 overexpression. In: *Cancer research* 68 (14), S. 5743–5752. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0235.

Smolle, J.; Smolle-Juettner, F. M.; Stettner, H.; Kerl, H. (1992): Relationship of tumor cell motility and morphologic patterns. Part 1. Melanocytic skin tumors. In: *The American Journal of dermatopathology* 14 (3), S. 231–237. DOI: 10.1097/00000372-199206000-00009.

Sterry, Wolfram (Hg.) (2018): Kurzlehrbuch Dermatologie. Unter Mitarbeit von Viktor Alexander Czaika, Ulrike Drecoll, Ina Hadshiew, Felix Kiecker, Dimitrios Papakostas, Sandra Philipp et al. 2., aktualisierte Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

Stintzing, Sebastian; Ivanova, Boryana; Ricard, Ingrid; Jung, Andreas; Kirchner, Thomas; Tannapfel, Andrea et al. (2018): Amphiregulin (AREG) and Epiregulin (EREG) Gene Expression as Predictor for Overall Survival (OS) in Oxaliplatin/Fluoropyrimidine Plus Bevacizumab Treated mCRC Patients-Analysis of the Phase III AIO KRK-0207 Trial. In: *Frontiers in oncology* 8, S. 474. DOI: 10.3389/fonc.2018.00474.

Sun, Chong; Wang, Liqin; Huang, Sidong; Heynen, Guus J. J. E.; Prahallad, Anirudh; Robert, Caroline et al. (2014): Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. In: *Nature* 508 (7494), S. 118–122. DOI: 10.1038/nature13121.

Swetter, Susan M.; Tsao, Hensin; Bichakjian, Christopher K.; Curiel-Lewandrowski, Clara; Elder, David E.; Gershenwald, Jeffrey E. et al. (2019): Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. In: *Journal of the American Academy of Dermatology* 80 (1), S. 208–250. DOI: 10.1016/j.jaad.2018.08.055.

Thody, A. J.; Higgins, E. M.; Wakamatsu, K.; Ito, S.; Burchill, S. A.; Marks, J. M. (1991): Pheomelanin as well as eumelanin is present in human epidermis. In: *The*

Journal of investigative dermatology 97 (2), S. 340–344. DOI: 10.1111/1523-1747.ep12480680.

Tokuhisa, Yoshihiro; Lidsky, Michael E.; Toshimitsu, Hiroaki; Turley, Ryan S.; Beasley, Georgia M.; Ueno, Tomio et al. (2014): SRC family kinase inhibition as a novel strategy to augment melphalan-based regional chemotherapy of advanced extremity melanoma. In: *Annals of surgical oncology* 21 (3), S. 1024–1030. DOI: 10.1245/s10434-013-3387-6.

Tran, Sieu; Rizos, Helen (2013): Human nevi lack distinguishing senescence traits. In: *Aging* 5 (2), S. 98–99. DOI: 10.18632/aging.100537.

Tucker, M. A.; Halpern, A.; Holly, E. A.; Hartge, P.; Elder, D. E.; Sagebiel, R. W. et al. (1997): Clinically recognized dysplastic nevi. A central risk factor for cutaneous melanoma. In: *JAMA* 277 (18), S. 1439–1444.

Vogel, Celia J.; Smit, Marjon A.; Maddalo, Gianluca; Possik, Patricia A.; Sparidans, Rolf W.; van der Burg, Sjoerd H. et al. (2015): Cooperative induction of apoptosis in NRAS mutant melanoma by inhibition of MEK and ROCK. In: *Pigment cell & melanoma research* 28 (3), S. 307–317. DOI: 10.1111/pcmr.12364.

Wittig-Blaich, Stephanie; Wittig, Rainer; Schmidt, Steffen; Lyer, Stefan; Bewerunge-Hudler, Melanie; Gronert-Sum, Sabine et al. (2017): Systematic screening of isogenic cancer cells identifies DUSP6 as context-specific synthetic lethal target in melanoma. In: *Oncotarget* 8 (14), S. 23760–23774. DOI: 10.18632/oncotarget.15863.

Xiao, Mei-Fang; Xu, Desheng; Craig, Michael T.; Pelkey, Kenneth A.; Chien, Chun-Che; Shi, Yang et al. (2017): NPTX2 and cognitive dysfunction in Alzheimer's Disease. In: *eLife* 6. DOI: 10.7554/eLife.23798.

Yan, Yanhong; Qi, Shengcai; Gong, Shi-Qiang; Shang, Guangwei; Zhao, Yumei (2017): Effect of CRABP2 on the proliferation and odontoblastic differentiation of hDPSCs. In: *Brazilian oral research* 31, e112. DOI: 10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0112.

Zalaudek, Iris; Schmid, Karin; Marghoob, Ashfaq A.; Scope, Alon; Manzo, Manuela; Moscarella, Elvira et al. (2011): Frequency of dermoscopic nevus subtypes by age and body site: a cross-sectional study. In: *Archives of dermatology* 147 (6), S. 663–670. DOI: 10.1001/archdermatol.2011.149.

Zhang, Ling; Gao, Jun; Li, Lei; Li, Zhaoshen; Du, Yiqi; Gong, Yanfang (2011): The neuronal pentraxin II gene (NPTX2) inhibit proliferation and invasion of pancreatic cancer cells in vitro. In: *Molecular biology reports* 38 (8), S. 4903–4911. DOI: 10.1007/s11033-010-0632-y.

Zhao, Wanfeng; Sala-Newby, Graciela B.; Dhoot, Gurtej K. (2006): Sulf1 expression pattern and its role in cartilage and joint development. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 235 (12), S. 3327–3335. DOI: 10.1002/dvdy.20987.

Zuo, L.; Weger, J.; Yang, Q.; Goldstein, A. M.; Tucker, M. A.; Walker, G. J. et al. (1996): Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. In: *Nature genetics* 12 (1), S. 97–99. DOI: 10.1038/ng0196-97.

11 Danksagung

An dieser Stellen möchte ich allen danken, die mich bei der Durchführung und Vollendung dieser Promotion und bei allen damit zusammenhängenden Aufgaben unterstützt haben.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner Doktormutter Prof. Silke Kuphal, die mir erst die Möglichkeit für diese Promotion zu diesem interessanten Thema gab und durch ihre stete Unterstützung und Führung half, diese auch zu vollenden.

Natürlich gilt mein Dank auch der Institutsleiterin Frau Prof. Bosserhoff, welche mir ihre Mittel und ihr Institut zu Verfügung stellte und mir dadurch die Forschung an meinem Thema ermöglichte.

Der Deutschen Krebshilfe danke ich für die finanzielle Unterstützung meiner Arbeit im Rahmen des Mildred Scheel Doktorandenprogramms.

Mein aufrichtiger Dank gilt Nadja Schneider, die mir mit viel Geduld das Vorgehen und technische Arbeiten im Labor erklärt und beigebracht hat. Darüber hinaus will ich Ihr aber auch für die großartige Unterstützung während meiner Arbeit im Labor danken.

Nicht zuletzt will ich auch meiner Arbeitsgruppe für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die vielen anregenden Diskussionen danken.

Mein ausdrücklicher Dank gilt natürlich auch meiner Familie, die mir das Studium und diese Promotion erst ermöglichte. Insbesondere möchte ich meiner Freundin Lena Mautner danken, die mir nicht nur durch ihre Geduld, sondern auch durch ihre ausdauernde Unterstützung half diese Promotion fertigzustellen.

12 Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich

- die eingereichte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt habe,
- außer den im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen und Hilfsmitteln keine weiteren benutzt und alle Stellen, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd entnommen sind, als solche kenntlich gemacht und einzeln nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), des Bandes und der Seite des benützten Werkes in der Dissertation nachgewiesen habe,
- die Dissertation noch keiner anderen Stelle zur Prüfung vorgelegt habe und dass dieselbe noch nicht anderen Zwecken - auch nicht teilweise - gedient hat.

Erlangen, den

.....

Felix Seefried