

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Thomas Ruzicka

**Der neuronale Transkriptionsfaktor Brn3a ist essentiell für
die Proliferation und das Überleben von humanen
Melanomzellen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Tobias Hohenauer

aus

München

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Carola Berking
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Heiko Hermeking
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. Simon Rothenfuß Priv. Doz. Dr. Robert Blum
Betreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	PD Dr. rer. biol. hum. Robert Besch
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian Reiser FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	17.06.2010

**Der neuronale Transkriptionsfaktor Brn3a ist essentiell für
die Proliferation und das Überleben von humanen
Melanomzellen**

Teile dieser Arbeit sind Bestandteil folgender Publikationen:

Abstracts:

Hohenauer T, Berking C und Besch R

Increased expression of Brn3a promotes survival of melanoma cells.

Pigment Cell Res 2007; 20 (6):457-593.

Hohenauer T, Berking C, Brenner M, Irmeler M, Beckers J und Besch R

Brn3a, a new marker for human melanoma, promotes cell survival via inactivation of p53.

Pigment Cell Res 2008; 21 (2):109-336.

Hohenauer T, Berking C, Irmeler M, Beckers J, Hoebel S, Aigner A, Hoffmann F, Schmidt A, Rothenfusser S und Besch R

The neuronal transcription factor Brn3a is essential for human melanoma cell proliferation and survival.

Pigment Cell Melanoma Res 2009; 22 (6): 860-906.

Originalarbeit:

Hohenauer T, Senft D, Berking C, Irmeler M, Beckers J, Hoebel S, Aigner A, Hoffmann F, Schmidt A, Rothenfusser S und Besch R

The neuronal transcription factor Brn3a is essential for human melanoma cell proliferation and survival.

In Revision.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Das maligne Melanom	6
1.1.1	Entstehung des Melanoms	7
1.1.2	Parallelen zwischen Embryogenese und Tumorwachstum	10
1.2	Der Transkriptionsfaktor Brn3a (POU4F1)	12
1.2.1	POU-Transkriptionsfaktoren	12
1.2.2	Brn3a (POU4F1)	13
1.2.2.1	Expression von Brn3a	15
1.2.2.2	Funktion von Brn3a	15
1.2.2.3	Expression und Funktion von Brn3a in Tumoren	18
1.3	Umfang dieser Arbeit	18
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Antikörper	20
2.1.1.1	Primäre Antikörper	20
2.1.1.2	Sekundäre Antikörper	21
2.1.2	Apparative Ausstattung	21
2.1.3	Kommerziell erhältliche Komplettsysteme	22
2.1.4	Oligonukleotide	22
2.1.4.1	Primer	23
2.1.4.2	<i>Small Interfering RNAs</i> (siRNAs)	23
2.1.4.3	Oligonukleotide zur Herstellung von Genreporterplasmiden	24
2.1.5	Plasmide	24
2.1.6	Puffer und Lösungen	25
2.1.7	Transfektionsreagenzien	28
2.1.8	Verbrauchsmaterialien	28
2.1.9	Zellkulturmedien	29

2.2	Methoden	30
2.2.1	Zellkultur	30
2.2.1.1	Kultivierung von primären Zellen der menschlichen Haut.....	30
2.2.1.2	Melanomzellkultur.....	30
2.2.2	Zellyse und Proteinpräparation	30
2.2.2.1	Gesamtzellprotein.....	30
2.2.2.2	Präparation von nukleären Proteinen	31
2.2.2.3	Präparation von zytosolischen Proteinen.....	31
2.2.3	Präparation von Nukleinsäuren	32
2.2.3.1	Präparation der genomischen Desoxyribonukleinsäure (DNA)	32
2.2.3.2	Präparation von Ribonukleinsäuren (RNA).....	32
2.2.3.3	Präparation von RNA für Microarrayanalysen	33
2.2.4	Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) 33	
2.2.4.1	Reverse Transkription von RNA zur Verwendung in qRT-PCR.....	33
2.2.4.2	qRT-PCR	34
2.2.4.3	SYBR Green 1-basierte qRT-PCR.....	35
2.2.4.4	qRT-PCR mit spezifischen Hybridisierungssonden	36
2.2.5	Microarrayanalysen	38
2.2.6	Photometrische Konzentrationsbestimmungen	38
2.2.6.1	Nukleinsäuren.....	38
2.2.6.2	Proteine.....	38
2.2.7	Proteinbiochemische Verfahren.....	39
2.2.7.1	Bestimmung der p53-Aktivität im ELISA.....	39
2.2.7.2	Bestimmung der ATM-Phosphorylierung im ELISA.....	39
2.2.7.3	Immunoblot nach Lämmli.....	40
2.2.7.4	Brn3a-Immunoblot	40
2.2.7.5	Immunhistochemie.....	41
2.2.7.6	Immunzytochemie.....	41
2.2.8	Cell Titer Blue®: Messung der Zell-Vitalität.....	42
2.2.9	Durchflusszytometrie (FACS)	43
2.2.9.1	Propidiumiodid-FACS zur Analyse des Zellzyklus	43
2.2.9.2	Quantifizierung apoptotischer Zellen	44

2.2.10	Inhibition der Genexpression durch RNA-Interferenz	44
2.2.10.1	Entwicklung von spezifischen siRNAs	44
2.2.10.2	Transfektion von siRNAs	45
2.2.11	Inhibition der Proteinsynthese durch Cycloheximid	45
2.2.12	Reporteranalysen	45
2.2.12.1	Nachweis der transkriptionellen Aktivität von Brn3a	46
2.2.12.2	Hemmung der transkriptionellen Aktivität von Brn3a	47
2.2.12.3	Nachweis der Regulation des KIF11-Gens durch Brn3a	47
2.2.13	Ektopische Expression von Brn3a-Protein	47
2.2.14	Stabile Expression von Brn3a in primären Zellen der Haut	48
2.2.14.1	Virenproduktion.....	48
2.2.14.2	Infektion primärer Zellen der Haut	48
2.2.14.3	<i>Soft-agar</i> -Assay	49
2.2.15	Statistische Analysen.....	49
3	Ergebnisse	50
3.1	Expressionsanalyse von Brn3a in Zellen des malignen Melanoms	50
3.1.1	Untersuchung der Brn3a-mRNA.....	50
3.1.2	Untersuchung des Brn3a-Proteins.....	50
3.1.3	Immunhistochemische Untersuchung von Brn3a	52
3.2	Funktionelle Charakterisierung von Brn3a beim malignen Melanom	53
3.2.1	Design und Evaluierung von Brn3a-spezifischen siRNAs	53
3.2.2	Hemmung von Brn3a verringert die Vitalität von Melanomzellen <i>in vitro</i> und reduziert das Tumorwachstum <i>in vivo</i>	55
3.2.2.1	Untersuchungen an Melanomzelllinien <i>in vitro</i>	55
3.2.2.2	Untersuchungen im Mausmodell <i>in vivo</i>	55
3.2.3	Brn3a fördert die Proliferation und das Überleben von Melanomzellen.....	58
3.2.3.1	Hemmung von Brn3a induziert einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase	58
3.2.3.2	Ektopische Expression von mutiertem Brn3a-Protein verhindert den Zellzyklusarrest nach Brn3a-Hemmung.....	61
3.2.4	Hemmung von Brn3a führt zu mitochondrialer Apoptose	63

3.2.4.1	Intrinsische, mitochondriale Apoptose	63
3.2.4.2	Nachweis apoptotischer Zellen nach Hemmung von Brn3a	65
3.2.4.3	Darstellung des apoptotischen Mechanismus	67
3.2.5	Hemmung von Brn3a aktiviert den Tumorsuppressor p53 in Melanomzellen	69
3.2.5.1	Der Tumorsuppressor p53	69
3.2.5.2	p53 vermittelt den G1-Arrest nach Brn3a-Hemmung.....	71
3.2.5.3	p53 wird nach Hemmung von Brn3a auf Proteinebene stabilisiert	73
3.2.5.4	p53 wird durch ein DNA-Schaden-Signal aktiviert.....	74
3.2.6	Identifizierung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors Brn3a	78
3.2.6.1	Nachweis der transkriptionellen Aktivität von Brn3a	78
3.2.6.2	Identifizierung von Brn3a-regulierten Genen durch Microarrayanalyse	78
3.2.6.3	Promotoranalyse der deregulierten Gene.....	80
3.2.7	Untersuchungen zum transkriptionellen Brn3a-Zielgen KIF11	82
3.2.7.1	Das Spindelmotorprotein Kif11 (Eg5)	82
3.2.7.2	Untersuchung der transkriptionellen Regulation von Kif11 durch Brn3a	84
3.2.7.3	Funktionelle Parallelen nach Hemmung von Brn3a oder Kif11	85
3.3	Untersuchung des transformierenden Potentials von Brn3a.....	89
4	Diskussion	92
4.1	Expressionsanalyse von Brn3a beim malignen Melanom.....	93
4.2	Funktionelle Charakterisierung von Brn3a in Melanomzellen	94
4.2.1	Hemmung von Brn3a aktiviert den Tumorsuppressors p53.....	94
4.2.2	Identifikation von transkriptionellen Brn3a-Zielgenen in Melanomzellen	95
4.2.2.1	Transkriptionelle Aktivität von Brn3a und Microarrayanalyse	95
4.2.2.2	Identifizierung des Brn3a-Zielgens KIF11 in Melanomzellen.....	96
4.3	Transformierende Eigenschaften von Brn3a	98
4.4	Klinisches Potential von Brn3a	99
4.4.1	Brn3a als möglicher Biomarker für das maligne Melanom	99
4.4.2	Bedeutung der tumorspezifischen Expression von Brn3a für neue therapeutische Ansätze.....	101
4.4.3	Bewertung des therapeutischen Effekts der Brn3a-Hemmung.....	101

4.4.4	Verwendung von siRNAs für funktionelle Untersuchungen und die Entwicklung therapeutischer Ansätze	102
4.4.5	Therapeutischer Aspekt der p53-Aktivierung.....	104
4.5	Ausblick.....	105
4.5.1	Expression von Brn3a beim malignen Melanom	105
4.5.2	Funktion von Brn3a beim malignen Melanom	106
4.5.3	Synergismen zwischen proliferativen Stimuli und Brn3a-Expression bei der Bildung von Tumoren	106
	Zusammenfassung	107
	Literaturverzeichnis	111
	Anhang	123
	Ergänzende Abbildungen	123
	Abkürzungen	124
	Danksagung	126

1 Einleitung

Die Entstehung von Krebserkrankungen ist das Ergebnis eines mehrstufigen Prozesses genetischer Veränderungen der gesunden Körperzelle, die als maligne Transformation bezeichnet wird. Jede dieser Veränderungen bedeutet für die Zelle den Verlust eines Kontrollmechanismus, der ihr einen Wachstumsvorteil gegenüber unveränderten Körperzellen verleiht. Krebs kann aus jeder normalen Körperzelle entstehen und es sind derzeit etwa dreihundert unterschiedliche Arten von Tumoren beschrieben. Trotz dieser Vielfalt unterscheiden sich Tumorzellen von gesunden Körperzellen lediglich durch sechs distinkte Veränderungen in der Zellphysiologie, die es ihnen erlauben Tumoren zu bilden [1]. Zu diesen gehören eine von äußeren Wachstumssignalen unabhängige Proliferation der Zelle sowie eine Unempfindlichkeit gegenüber Signalen, die das Wachstum negativ beeinflussen. Gesteigertes proliferatives Potential, und die Möglichkeit, den programmierten Zelltod, genannt Apoptose, zu umgehen tragen außerdem zum Tumorwachstum bei. Weitere Eigenschaften, wie das Eindringen in fremdes Gewebe, die Nähr- und Sauerstoffversorgung von neuem Tumorgewebe durch Angiogenese, und die Bildung von Metastasen abseits des Primärtumors sind allen Tumorzellen gemein und werden im Zuge der malignen Transformation angeeignet. Jeder dieser Wachstumsvorteile wird durch genetische oder epigenetische Veränderungen und fehlgeleitete Signalwege in der Zelle verursacht. Diese tumorspezifischen Veränderungen erlauben es uns einerseits, zwischen gesunden und bösartig transformierten Zellen zu unterscheiden. Zum anderen gehen Tumorzellen ein enges Abhängigkeitsverhältnis mit diesen Veränderungen ein, dessen Störung massiven Einfluss auf ihre Teilung und ihr Überleben haben kann. Genaue Kenntnis der molekularen Grundlagen und Auswirkungen solcher Veränderungen in der Zelle bieten daher definierte Angriffspunkte für die Entwicklung von tumorspezifischen therapeutischen Ansätzen.

1.1 Das maligne Melanom

Der schwarze Hautkrebs, das maligne Melanom, ist ein solider Hauttumor, der sich aus den pigmentbildenden Zellen der Haut, den Melanozyten, entwickeln kann. Derzeit erkranken pro Jahr in Deutschland etwa 6000 Männer und mehr als 8000 Frauen neu an dieser Tumorart, rund 2000 Menschen sterben jährlich daran (Robert Koch-Institut, 2008). Die Neigung dieses Tumors zur frühen Metastasierung und seine hohe Resistenz gegen Chemotherapeutika und Strahlenbehandlung machen das Melanom bei später Diagnose zu einer der am schwersten behandelbaren und damit meist tödlichen Krebserkrankungen des Menschen. Während bei der Erkennung des primären Tumors im radiären, nicht invasiven Wachstumsstadium und einer Tumordicke von weniger als 1 mm nach Breslow eine operative Entfernung 90-95%

Heilungschance verspricht, sinkt diese drastisch bei tieferem Eindringen [2]. Der Befall regionärer Lymphknoten verschlechtert die Prognose deutlich, allerdings ist durch eine operative Entfernung und adjuvante Therapie eine Heilung noch möglich. Sind allerdings nach Metastasierung des Primärtumors andere Organe des Körpers betroffen, haben die derzeit üblichen Therapiemaßnahmen lediglich palliativen Charakter.

Da das maligne Melanom in fortgeschrittenen Stadien für seine schlechten Ansprechraten bei der alleinigen Behandlung mit Chemotherapeutika bekannt ist und auch Kombinationen von Chemotherapeutika mit Immuntherapeutika, wie die Gabe von Interferon- α und Interleukin-2 zur Stimulation des Immunsystems, nur sehr begrenzt erfolgreich sind, müssen neue Wege der Behandlung gefunden werden [3, 4]. Die Entwicklung von spezifischen Kinaseinhibitoren oder Wirkstoffen auf Oligonukleotid- oder Antikörperbasis hat längst die präklinische Phase verlassen. Vom Angriff spezifischer Signaturen der Tumorzelle erhofft man sich neben einer ausreichenden Wirksamkeit eine deutliche Reduktion der bei der Chemotherapie häufig stark auftretenden Nebenwirkungen. Um aber neue Zielstrukturen für die Melanomtherapie zu finden, ist ein eingehendes Studium seiner Entstehung und seiner molekularen Charakteristika unerlässlich. Bei genauer Kenntnis fehlgeleiteter Signalwege in der Tumorzelle kann eine für den Patienten verträgliche, für die jeweilige Erkrankung spezifische Behandlung entwickelt werden.

1.1.1 Entstehung des Melanoms

Melanozyten sind die pigmentbildenden Zellen der Haut. Sie sitzen in der Basalschicht der Epidermis oder an den Haarwurzeln, von wo aus sie das von ihnen produzierte Pigment Melanin an umliegende Zellen abgeben. Benachbarte Keratinozyten nehmen das Pigment auf und nutzen es ähnlich einem Sonnenschirm, um ihren Zellkern und damit ihre DNA vor schädlicher ultravioletter (UV-) Strahlung zu schützen. Sie kann die maligne Transformation dieser Zellen fördern, und zur Entstehung des Melanoms führen. Charakteristisch für diesen Tumor, und für viele andere Krebserkrankungen ist der Verlust des differenzierten Status der Zelle und damit der Verlust der natürlichen Aufgaben des zugrunde liegenden Zelltyps. Im Falle von Melanozyten kann dies oft anhand des Verlusts der Pigmentproduktion beobachtet werden. Durch seine neuronienähnliche Zellform mit ihren charakteristischen Dendriten ist es einem Melanozyten möglich, bis zu 30 benachbarte Keratinozyten mit Melanin zu versorgen und damit vor schädlicher UV-Strahlung zu schützen. Neben dem Fehlen der Pigmentproduktion bilden Melanomzellen auch in den meisten Fällen ihre Dendriten zurück. Diese mikroskopisch und oft auch makroskopisch erkennbaren Veränderungen werden begleitet von einer Vielzahl von Veränderungen auf molekularer Ebene.

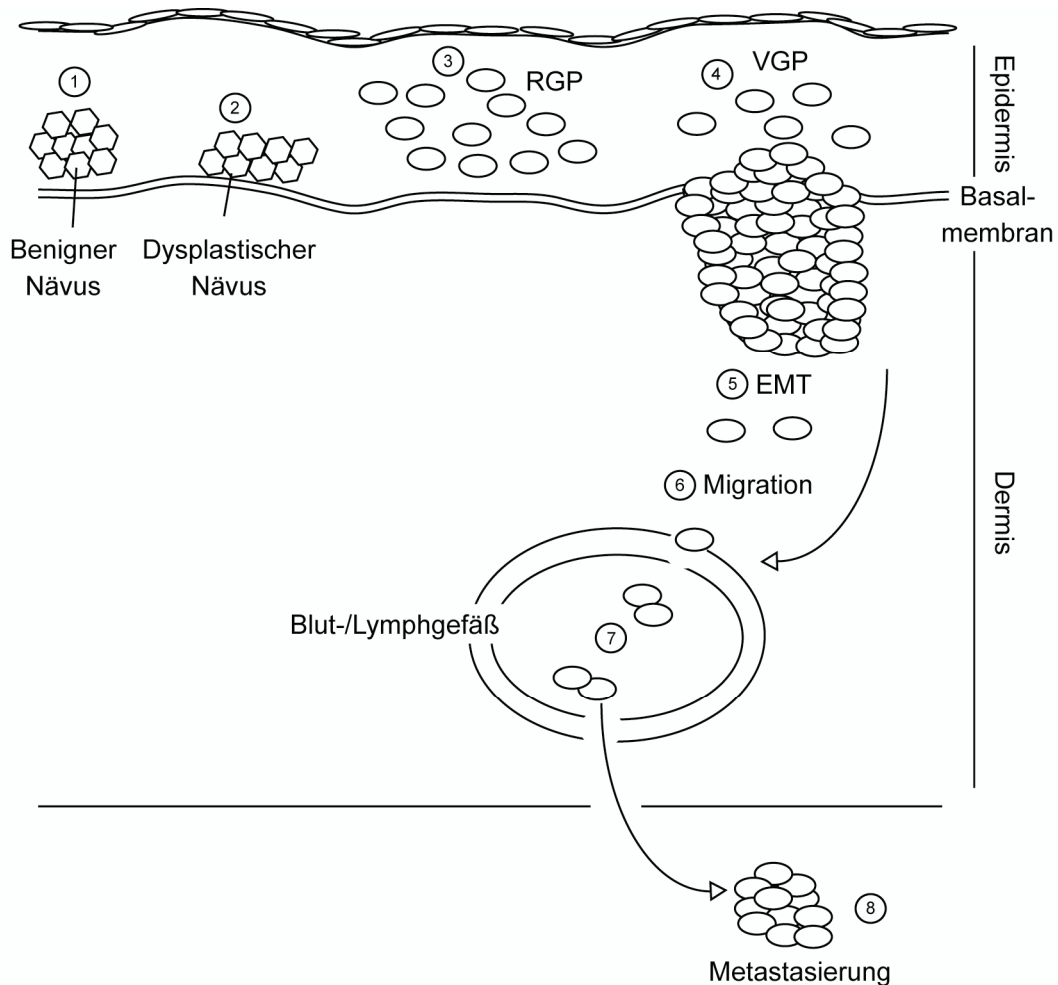


Abbildung 1: Entstehung des malignen Melanoms

Das humane Melanom entsteht über distinkte Progressionsstufen. Aus gutartigen Läsionen (benigne Nävi ①) entstehen dysplastische, oder Clark'sche melanozytäre Nävi ②, aus denen sich maligne Melanome bilden können. In der radiären Wachstumsphase (RGP ③) breitet sich der Tumor flächig in der Epidermis aus. In der vertikalen Wachstumsphase (VGP ④) durchdringen Tumorzellen die Basalmembran um in der Dermis zu wachsen. Nach einem epithelial-mesenchymalen Übergang (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT ⑤) können Tumorzellen vom Primärtumor abwandern ⑥ und sich über Blut- und Lymphstrom im Körper verteilen ⑦. Bei einer Ansammlung von Tumorzellen in anderen Organen spricht man von Metastasierung ⑧ des Primärtumors.

Abbildung modifiziert nach Miller et al., 2006

Die maligne Transformation (siehe Abbildung 1) beginnt nach Clark mit einer Veränderung der proliferativen Eigenschaften der Zelle [5, 6]. Dies fördert zunächst die Entstehung eines benignen Nävus, der jedoch früh in einen Ruhezustand, die sogenannte Seneszenz eintritt, und daher nur begrenzte Wachstumseigenschaften aufweist [7, 8]. Veränderungen in Farbe und Form des Nävus, wie etwa die Bildung von unterschiedlich pigmentierten Regionen und einer unregelmäßigen oder unscharfen Begrenzung der Läsion kennzeichnen den Übergang vom benignen Nävus zum dysplastischen Nävus und können erste Anzeichen dafür sein, dass die Zellen ihren seneszenten Zustand überwunden haben [9]. Diese atypischen Veränderungen der Haut können jedoch auch über Jahrzehnte stabil bleiben und müssen sich nicht zwangsläufig zum Melanom weiterentwickeln. Der Übergang vom melanozytären

Nävus zum Melanom in der radiären Wachstumsphase (radial growth phase, RGP, siehe Abbildung 1) geschieht im Sinne des bereits in den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts begründeten und beim Retinoblastom eingehend studierten *Two-hit*-Modells der Entstehung von Tumoren [10]. Dieses besagt, dass durch nur zwei unabhängige Veränderungen des Erbguts aus einer gesunden Zelle eine Krebszelle entstehen kann. Im Falle des malignen Melanoms wurden vor allem Mutationen in den Genen N-RAS oder BRAF als typische erste genetische Veränderung der Zelle beschrieben [11, 12]. Diese aktivierenden Mutationen, die sowohl in melanozytären Nävi als auch in primären Melanomen gefunden wurden, fördern zunächst das Wachstum der Zelle über die konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalwegs (*mitogen-activated protein kinase*), auch genannt ERK-Signalweg (*extracellular-related kinase*) [13-15]. Im Falle der aktivierenden BRAF V600E-Mutation (gefunden in mehr als 60% aller untersuchten melanozytären Nävi und Melanome [11]) kommt es in Melanozyten jedoch schnell zum oben erwähnten Zustand der Seneszenz. Dieser wird vom mutierten BRAF-Onkogen selbst ausgelöst, erfolgt über die verstärkte Expression des Gens CDKN2A, welches für den zellzyklusinhibierenden Faktor p16^{INK4A} kodiert, und wird deshalb als onkogenvermittelte Seneszenz bezeichnet [16]. Zur Überwindung dieses Ruhezustands und zur endgültigen malignen Transformation muss nun der zweite *hit* des *Two-hit* Modells, die zweite Veränderung des Erbguts erfolgen. Dies kann Mutationen in Genen betreffen, die für DNA-Reparatur-Mechanismen oder das Überleben der Zelle (sogenannte *Survival*-Faktoren) verantwortlich sind. Häufiger kommt allerdings die Inaktivierung von Faktoren vor, die für die Zellzykluskontrolle zuständig sind. Das oben erwähnte CDKN2A kodiert in einem Gen für die beiden Tumorsuppressor-Proteine p16^{INK4A} und p19^{ARF}, die bei nicht-familiären malignen Melanomen in 20-50% der Fälle mutiert sind und aufgrund ihrer zellzyklusregulierenden Eigenschaften seneszente Zellen in proliferierende Zellen verwandeln können [17, 18].

In der radiären Wachstumsphase wächst der Tumor intraepidermal, zellzyklusaktivierende Moleküle wie Cyclin D1 werden verstärkt produziert und der Tumor breitet sich flächig aus. Zu diesem Zeitpunkt ist ein ankerunabhängiges Wachstum der Zellen jedoch noch nicht möglich, das heißt, sie sind auf den Kontakt zu Zellen der Epidermis angewiesen. Der erste Schritt der malignen Transformation der Zelle, vom Verlust der typischen Aufgaben einer Pigmentzelle hin zu ständiger Zellteilung, ist jedoch bereits erreicht.

Im nächsten Schritt der Tumorentwicklung kommt es über die veränderte Expression von Zelladhäsionsmolekülen und die Produktion von Faktoren, die die extrazelluläre Matrix verändern, zum Übergang in die vertikale Wachstumsphase (vertical growth phase, VGP) des Tumors. Dieser Übergang von epithelialeem zu mesenchymalem Wachstum (EMT, *epithelial-mesenchymal transition*) wird unter anderem gesteuert durch den Transkriptionsfaktor Snail, der die Transkription des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin reprimiert. Der Verlust von E-Cadherin sowie die nun auftretende Produktion von neuralem

Cadherin (N-Cadherin) ermöglichen eine Veränderung der Zell-Zell-Kontakte von den Keratinozyten der Epidermis zu den Fibroblasten der Dermis, sowie zum dort verlaufenden vaskulären Endothel [19, 20]. Um aber in die Dermis zu gelangen, muss zunächst die Basalmembran der Haut überwunden werden. Dies wird ermöglicht durch die Expression von Integrinen, insbesondere von $\alpha V\beta 3$ -Integrin beim Übergang vom RGP- zum VGP-Melanom. $\alpha V\beta 3$ -Integrin induziert die Expression der Metalloproteinase 2 (MMP2), einem Enzym, das das Kollagen der Basalmembran degradiert und diese so für Melanomzellen permeabel macht [21, 22]. Weiterhin kommt es zu Veränderungen in der Expression von *Survival*-Faktoren über den β -Catenin-Signalweg [23]. Hierzu zählt eine Aktivierung des antiapoptotischen Faktors Bcl-2 und damit eine gesteigerte Apoptoseresistenz der Tumorzellen [24]. Ausgehend vom nodulären, intradermalen Wachstum der vertikalen Wachstumsphase können sich einzelne Zellen vom Primärtumor lösen, über Blut- und Lymphsystem im Körper ausbreiten, und in anderen Organen Tochtergeschwülste, genannt Metastasen, bilden. Die von Hanahan und Weinberg beschriebenen typischen Eigenschaften der Tumorzelle finden sich also auch in der Melanomentwicklung wieder, sind aber keinesfalls als exklusiv für die Tumorentwicklung zu sehen [1]. Vielmehr kann es im Laufe der malignen Transformation zu einer Aktivierung von molekularen Programmen kommen, die während der Embryogenese des Menschen aktiv sind. Im nächsten Teil dieser Arbeit soll daher auf die embryonale Entwicklung von Melanozyten, den Vorläuferzellen des Melanoms, eingegangen werden.

1.1.2 Parallelen zwischen Embryogenese und Tumorwachstum

Das maligne Melanom gehört zur Gruppe der neuroektodermalen Tumoren. Melanozyten entstehen wie Neuronen aus einer vom äußeren Keimblatt abgeleiteten Struktur, dem Neuroektoderm, genauer aus der Neuralleiste [25]. Neuralleistenzellen (NCC, *neural crest cells*) sind unter anderem Vorläufer von Neuronen und Gliazellen des peripheren Nervensystems, aber auch von Pigmentzellen der Haut, den Melanozyten [26].

Am Anfang ihrer Entwicklung steht die sogenannte Induktion der Neuralleiste, einer schon während der Gastrulation des Embryos entstehenden Struktur zwischen dem Ektoderm und der Neuralplatte. Bei diesem aktivierenden Vorgang kommt es zu einem epithelial-mesenchymalen Übergang (EMT) der pluripotenten Neuralleistenzellen, reguliert durch die Transkriptionsfaktoren Snail und Slug [27]. Diese Umwandlung von Epithelzellen zu migrierenden mesenchymalen Zellen wird begleitet von einer Reduktion von Zell-Zell-Kontakten durch die verringerte Expression von Zelladhäsionsmolekülen wie N-Cadherin und Cadherin 6 [28, 29]. Nach einer transienten Auflösung der das Neuralrohr umgebenden

Basallamina verlassen die hoch-motilen NCC den Ort ihrer Entstehung (Abbildung 2).

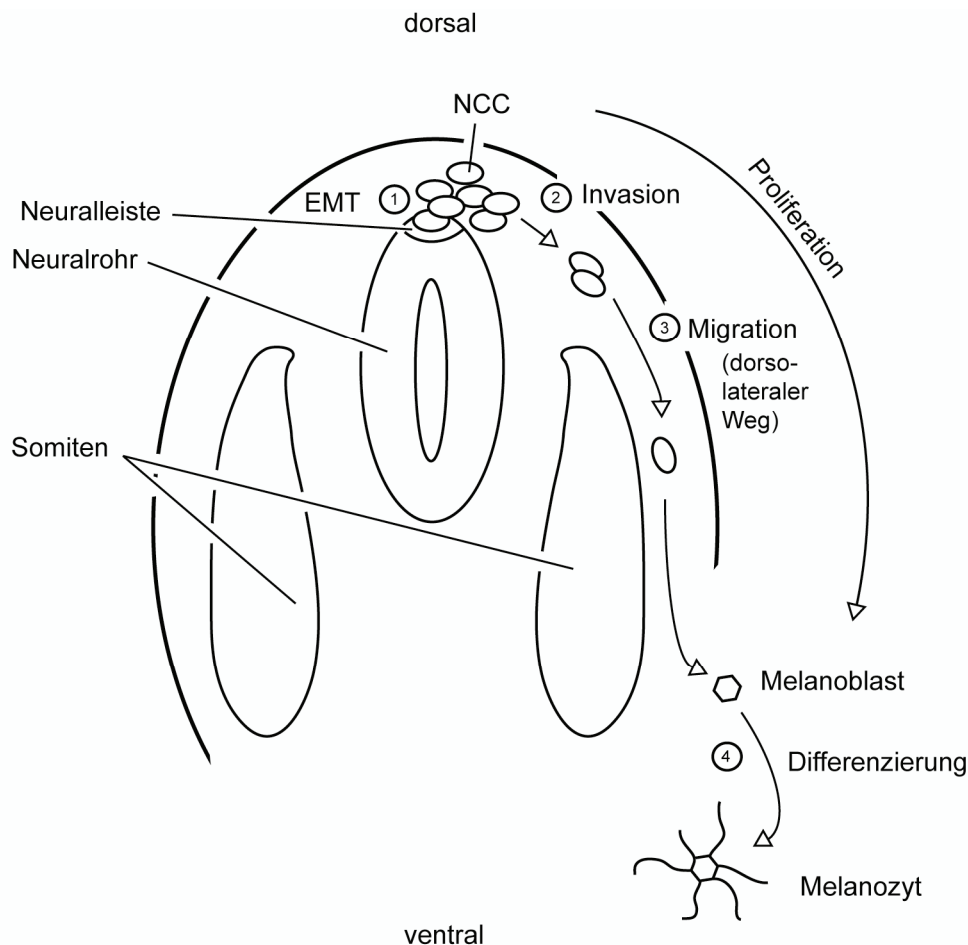


Abbildung 2: Entstehung von Neuralleistenzellen

Neuralleistenzellen (NCC) sind unter anderem die Vorläufer von Neuronen und pigmentbildenden Zellen. Am Anfang ihrer Entwicklung durchlaufen sie eine epithelial-mesenchymale Transition (EMT ①), um ihren Entstehungsort, das Neuralrohr, verlassen zu können. Wie Tumorzellen zeigen sie invasives Verhalten ② und dringen in das umliegende Gewebe ein. Ihre Migration ③ durch den Embryo richtet sich dabei nach dem zu bildenden Zelltyp. Zur Bildung von Melanozyten bestimmte Neuralleistenzellen wandern über den dorsolateralen Weg, entwickeln sich zu Melanoblasten und differenzieren später zu den pigmentbildenden Zellen der Haut ④. Die Aktivierung spezifischer transkriptioneller Netzwerke zur Proliferation und zum Schutz vor Apoptose ist dabei essentiell für die embryonale Entwicklung.

Abbildung modifiziert nach Knecht et al., 2002

Sie zeigen invasives Potential, dringen in das umgebende Gewebe ein und migrieren auf festgelegten Wegen durch den Embryo [26]. Es kommt zu einer Aufteilung der migrierenden Zellen, die auf dem ventralen Weg Strukturen wie das dorsale Wurzelganglion (DRG, *dorsal root ganglion*) bilden. Diese sensorische Linie migrierender NCC wird in der weiteren Entwicklung afferente Neuronen bilden, also Nervenzellen, die der Reizaufnahme und Reizleitung dienen. Die sogenannte autonome Linie hingegen entwickelt sich zu sympathischen und enterischen Neuronen des vegetativen Nervensystems. Eine andere Route schlagen NCC ein, die sich zu den pigmentbildenden Zellen der Haut, den Melanozyten entwickeln werden. Sie wandern über den dorsolateralen Weg, entwickeln sich zu unreifen Melanoblasten und werden später in der Haut zu reifen Melanozyten

ausdifferenzieren, geleitet durch die Aktivität des *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) [30].

Sowohl Neuralleistenzellen als auch Tumorzellen können also unter bestimmten Umständen ihren primären Aufenthaltsort verlassen, wandern, proliferieren und andere Strukturen des Embryos bzw. des Körpers kolonisieren. Die Ähnlichkeit von NCC und Tumorzellen ist aber nicht rein oberflächlich, sondern spiegelt sich im Ablauf von genetischen Programmen wider, die sowohl während der Embryogenese wie auch fälschlicherweise in Tumorzellen aktiv sind. Transkriptionsfaktoren wie Snail, Slug, FoxD3 oder Sox 9 und Sox10 kontrollieren durch die Aktivierung oder Repression von transkriptionellen Zielgenen Migration, Invasion, Zell-Proliferation und Zelltod sowohl während der Embryogenese als auch in Tumoren [31].

Das zentrale Molekül dieser Arbeit gehört ebenfalls zur Gruppe der Transkriptionsfaktoren und erfüllt wichtige Aufgaben im sich entwickelnden peripheren Nervensystem und in adulten Neuronen. Bezüglich des malignen Melanoms ist jedoch bislang nichts zu diesem Faktor bekannt. Es handelt sich um den POU-Klasse IV Transkriptionsfaktor Brn3a, kodiert durch das Gen POU4F1.

1.2 Der Transkriptionsfaktor Brn3a (POU4F1)

1.2.1 POU-Transkriptionsfaktoren

Namensgebend für die Gruppe der POU-Transkriptionsfaktoren ist ein konservierter, DNA-bindender Abschnitt des Proteins, die sogenannte POU-Domäne (Pit-Oct-Unc-Domäne). Diese wurde nach den 4 ersten Transkriptionsfaktoren benannt, in denen sie identifiziert werden konnte: Pit-1, Oct-1 und Oct-2 in Säugetieren und Unc86 in *Caenorhabditis elegans* [32]. POU-Domänen bestehen aus zwei Subdomänen, der POU-spezifischen- (POU_S) und der POU-Homöodomäne (POU_H), welche den POU-Transkriptionsfaktoren die DNA-Bindung durch die Ausbildung von *Helix-turn-helix*-Motiven ermöglichen [33-35]. POU-Proteine binden DNA als Monomere oder homodimere Komplexe [32] in einer Vielzahl von möglichen Konformationen, ermöglicht durch einen hypervariablen Abschnitt des Proteins zwischen POU_S und POU_H [36]. Eine auf Expressionsmustern beruhende oder funktionelle Zusammenfassung der Familie ist nur sehr eingeschränkt möglich, da für sowohl für ihre Expression als auch für ihre Funktion große Heterogenität beschrieben worden ist. POU-Faktoren werden in einer Vielzahl von Zelltypen exprimiert und regulieren sowohl ubiquitär exprimierte *Housekeeping*-Gene als auch für die Entwicklung essentielle, gewebespezifische Gene [37]. Neben gewebespezifischer Expression erreichen POU-Transkriptionsfaktoren hohe Spezifität durch eine zeitliche Regulation ihrer Expression. Viele Vertreter dieser Gruppe werden vor allem während der Embryonalentwicklung exprimiert, um in adulten

Stadien völlig zu verschwinden [38, 39]. Die Einteilung der POU-Faktoren in 6 unterschiedliche Klassen basiert auf Sequenzähnlichkeiten eines weiteren konservierten Abschnitts im N-terminalen Bereich des Proteins, der sogenannten POU-Box. Eine Übersicht der verschiedenen Klassen der POU-Faktoren in Vertebraten und ihrer Expression findet sich in Tabelle 1, modifiziert nach Veenstra et al. (1997) [40].

Tabelle 1: POU-Faktoren der Wirbeltiere

Klasse	POU-Faktor	Synonym	Expression		Funktion
			embryonal	adult	
I	POU1F1	Pit-1 GHF-1	Neuralrohr Hypophyse	Hypophyse	Überleben von Hypophysenzellen
II	POU2F1	Oct-1/OTF-1	Mesencephalon Prosencephalon Neuralleiste	weit verbreitet	Gastrulation, Apoptose
	POU2F2	Oct-2/OTF-2	Neuralleiste	Lymphozyten Nervensystem	Proliferation reifender B-Zellen
	POU2F3	Oct-11	Epidermis	Epidermis	
III	POU3F1	Oct-6	Embryonale Stammzellen	Gehirn, Testis	Differenzierung Schwann'sche Zellen, Myelinierung, Respiration
	POU3F2	Brn-2	sich entw. Nervensystem	Gehirn	Neurale Induktion, Entwicklung des Hypothalamus
	POU3F3	Brn-1			
	POU3F4	Brn-4			
IV	POU4F1	Brn-3a	sich entw. Nervensystem, Rückenmark, Hirnstamm, Retina	Hypophyse, sensorische Neuronen, Retina, Milz	Auswachsen von Neuriten Schutz vor Apoptose
	POU4F2	Brn-3b	sich entw. Nervensystem		Entwicklung retinaler Ganglionzellen
	POU4F3	Brn-3c			Entwicklung Haarzellen des Innenohrs
V	POU5F1	Oct-3/4	Testis, Ovar, embryonale Stammzellen	Oozyten	Pluripotenz
VI	POU6F1	Brn-5	sich entw. Nervensystem	Gehirn, Niere, Muskel, Testis	

1.2.2 Brn3a (POU4F1)

Das zunächst als Brn3 bezeichnete Protein Brn3a wurde bei dem Versuch entdeckt, Faktoren im Rattengehirn zu identifizieren, deren Aufbau dem der bekannten Transkriptionsfaktoren Pit-1, Oct-1 und Unc-1 (P,O und U) ähnelt [41]. Kurz nach der ersten

Beschreibung des Brn3-Transkriptionsfaktors erfolgte seine Unterteilung in die beiden Transkriptionsfaktoren Brn3a (POU4F1) und Brn3b (POU4F2), nachgewiesen in der murinen neuronalen Zelllinie ND7 [42]. Ein Jahr später wurde ein weiterer Brn3-Faktor identifiziert und als Brn3c (POU4F3) bezeichnet [43]. Brn3a (POU4F1), Brn3b (POU4F2) und Brn3c (POU4F3) bilden bis heute die Klasse IV der POU Transkriptionsfaktoren. Die für diese Klasse charakteristische und hochkonservierte, 40 Aminosäuren lange POU IV-Box wurde erstmals von Gerrero et al. (1993) beschrieben [44].

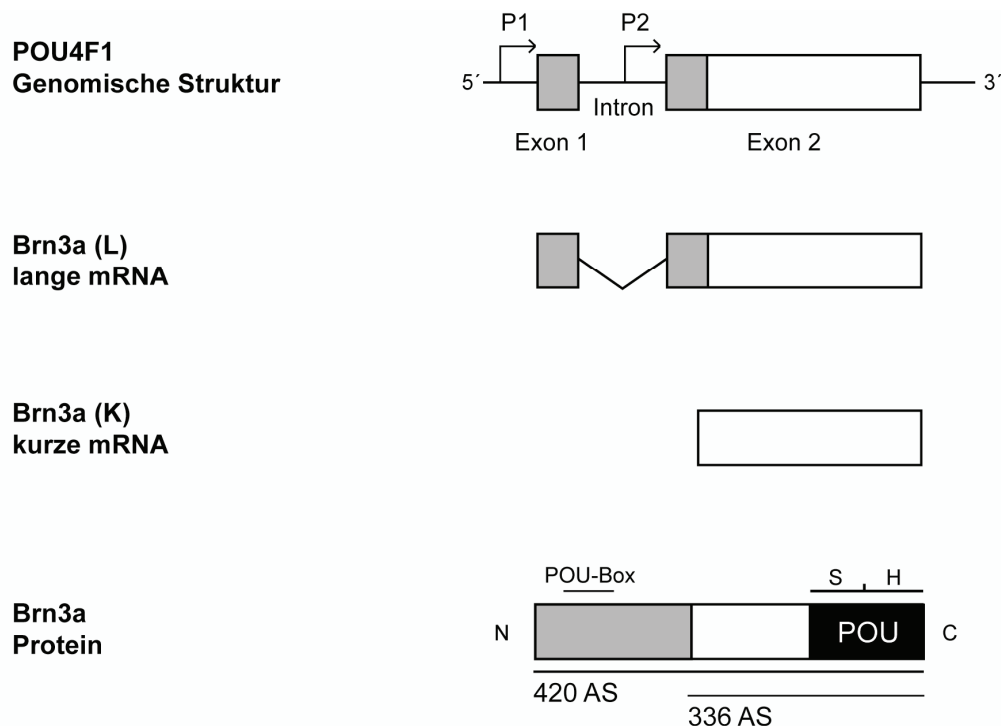


Abbildung 3: Der Brn3a (POU4F1) Transkriptionsfaktor

Das humane POU4F1-Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 13 (13q22) und besteht aus 2 Exons und einem dazwischen liegenden ca. 600 Basen langen Intron. Zusätzlich zum proximalen Promotor (P1) befindet sich eine weitere Promotorsequenz im intronischen Bereich (P2). Transkription von diesem Promotor führt zu einem alternativen, kürzeren Transkript (Brn3a (K)) und einem um 84 Aminosäuren (AS) verkürzten Brn3a-Protein. Das vollständige Brn3a-Protein besteht unter anderem aus dem nahe dem N-Terminus liegenden POU-Box Motif und der am C-Terminus liegenden POU-Domäne mit den Sub-Domänen POU-specific (S) und POU-Homöobox (H). Die DNA-Bindung des Brn3a-Proteins kann alleine über den C-terminalen Bereich als auch über kooperative Bindung von N-Terminus und POU-Domäne erfolgen.

Abbildung modifiziert nach Latchman, 1998

Das humane Gen POU4F1 befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 13 im Abschnitt 22 (13q22) und besteht aus zwei Exons und einem dazwischen liegenden, etwa 600 Basenpaare langen Intron (Abbildung 3). Untersuchungen zur genomischen Organisation und zur transkriptionellen Regulation von Brn3a führten zunächst zur Identifikation von zwei unterschiedlich langen Brn3a copy-DNAs (cDNAs) in murinen Zellen, von denen angenommen wurde, dass es sich um Spleißvarianten handelt [45, 46]. Berichtigend konnten Frass und Kollegen später die genomische Struktur des Brn3a-Lokus genauer beschreiben [47]. Die Transkription von Brn3a erfolgt wie in Abbildung 3 dargestellt

ausgehend von zwei verschiedenen Promotoren, einem proximalen Promotor und einer regulatorischen Sequenz im einzigen Intron des POU4F1-Gens. Das vollständige Brn3a Protein (Brn3a (L)) besteht aus 420 Aminosäuren, der verkürzten Form (Brn3a (K)) fehlen 84 Aminosäuren des N-Terminus. Lange und kurze Isoform werden gewebespezifisch in unterschiedlichem Maß exprimiert und unterscheiden sich auch bezüglich ihrer transkriptionellen Eigenschaften, da der N-terminale Bereich des Proteins offenbar nur zum Teil für die DNA-Bindung benötigt wird [48].

1.2.2.1 Expression von Brn3a

Die Transkriptionsfaktoren der Klasse IV, Brn3a, -b und -c, weisen einen hohen Verwandtschaftsgrad basierend auf konservierten Sequenzabschnitten auf, unterscheiden sich aber stark in ihrer restlichen Sequenz und werden außerdem von drei verschiedenen Genen kodiert [49]. Während Brn3b und Brn3c zeitlich stark limitiert im sich entwickelnden Nervensystem, der Retina und sehr schwach in sensorischen Ganglien und im Rückenmark exprimiert werden, ist Brn3a ab dem 11. Tag der Embryonalentwicklung detektierbar und lässt sich auch im adulten Organismus in den Hinterwurzelganglien des Rückenmarks, im Trigeminalganglion und in Teilen des Vorder- und Hinterhirns nachweisen [50-52]. Im Zuge der embryonalen Entwicklung dient die Expression von Brn3a als Marker für die frühest vorkommenden postmitotischen Neuronen des zentralen Nervensystems bei Wirbeltieren [51]. In Zellen des peripheren Nervensystems wurde Brn3a sowohl in proliferierenden Vorläuferzellen, entstehend aus der Neuralleiste, als auch in ausgewachsenen sensorischen Neuronen nachgewiesen [51, 53]. Neben neuronalen Geweben findet sich eine Expression der POUIV-Faktoren auch in Zellen nicht-neuroektodermalen Ursprungs. In gesundem Gewebe des Gebärmutterhalses und der menschlichen Brustdrüse [54] sowie in Zellen der Hoden wurden die Faktoren Brn3a und Brn3b nachgewiesen (Brn3a in Spermatogonien und Brn3b in postmeiotischen Spermatischen) [55]. Auch in Zellen des Immunsystems wie in B- und T-Lymphozyten [44, 56] sowie in Monozyten (PBMC, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes) von Patienten mit der Autoimmunerkrankung Lupus erythematodes [57] waren Brn3a-Transkripte detektierbar.

1.2.2.2 Funktion von Brn3a

Neben der Charakterisierung von POUIV-Expressionsmustern in Zellen des neuralen Systems wurde versucht, anhand von Mausmodellen mit Defekten für jeweils einen dieser Faktoren (*Knock out*-Mäuse) mehr über Ihre Funktion während der neuronalen Entwicklung zu erfahren. Null-Mutanten für Brn3b zeigten dabei eine gestörte Entwicklung von

Ganglionzellen der Retina, bei Brn3c-defizienten Mäusen wurden Defekte in der Entwicklung von Vestibularzellen und Haarzellen des auditorischen Systems sowie der Verlust von assoziierten sensorischen Ganglien festgestellt [58-60]. In beiden Fällen wurden lebensfähige Mäuse geboren. Brn3a-defiziente Mäuse hingegen zeigten starke motorische Einschränkungen bei Bewegung und Nahrungsaufnahme und starben kurz nach der Geburt. In späten embryonalen Phasen konnte in ihren Neuronen des Trigeminus und des dorsalen Wurzelganglions ein massives Absterben dieser Zellen nachgewiesen werden [61, 62]. Es wurde gezeigt, dass der Verlust von Brn3a zu einer Störung in der Expression von für die Embryonalentwicklung essentiellen Neurotrophinrezeptoren der Trk-Gruppe führte und nachfolgend zur Induktion des programmierten Zelltods, der Apoptose [63]. Ein weiteres mit Apoptoseresistenz assoziiertes und von Brn3a direkt reguliertes Gen ist das antiapoptotische B-Cell Lymphoma 2 (Bcl-2) [64]. Smith und Kollegen zeigten, dass Brn3a-Expression nach Serumentzug das Überleben von kultivierten primären Neuronen als auch der neuronalen Zelllinie ND7 durch die transkriptionelle Aktivierung des antiapoptotischen Faktors Bcl-2 fördern kann. Essentiell für die Promotoraktivierung bei Bcl-2 und die erhöhte Apoptoseresistenz war dabei die aktivierende N-terminale Domäne der langen Brn3a-Isoform [65]. Ebenfalls als direkt durch Brn3a reguliert und mit Apoptose assoziiert ist der Faktor Bcl-XI (*Basal cell lymphoma-extra large*) [66]. Sowohl Bcl-2 als auch Bcl-XI wurden nach ektopischer Brn3a-Expression in sensorischen Neuronen transkriptionell induziert und schützten diese vor Apoptose [64-68]. Die Aktivierung von Bcl-2 durch Brn3a wird zusätzlich durch eine Protein-Protein-Interaktion von Brn3a mit dem Tumorsuppressor p53 reguliert. Diese Interaktion kann die Bcl-2-Aktivierung verhindern, wobei beide Faktoren an benachbarte Bindestellen des Bcl-2-Promotors binden [69]. Ähnlich verhalten sich Brn3a und p53 auch bei der Regulation des zellzyklusregulierenden p21 sowie bei der Aktivierung des proapoptotischen Bax in der neuronalen Zelllinie ND7 [70]. Auch hier erfolgte eine kooperative Bindung von DNA-Abschnitten durch Brn3a und p53 zur Aktivierung des p21-Promotors oder zur Repression der Bax-Expression. Weitere Apoptose-assoziierte Zielgene von Brn3a sind die durch Stress induzierten Hitzeschock-Proteine Hsp27 [71] und Hsp90 [57]. Beide werden über Brn3a-Konsensussequenzen in ihren Promotoren reguliert, wobei erhöhte Hsp27-Expression durch Brn3a in neuronalen ND7-Zellen zum Schutz vor Apoptose beitrug.

Untersuchungen an Brn3a-defizienten Mäusen zeigten neben einer essentiellen Funktion in der Apoptoseregulation auch eine Rolle von Brn3a in der neuronalen Differenzierung. Es wurde nachgewiesen, dass Brn3a auch für das normale Wachstum von sensorischen Neuronen und die Ausbildung sensorischer Netzwerke im Embryo essentiell ist. Eng und Kollegen beschrieben, dass in Brn3a-defizienten Mäusen am Tag 11,5 der Embryonalentwicklung die Neuronen des Trigeminus und des dorsalen Wurzelganglions wie

erwartet kondensierten und in Richtung ihrer peripheren Zielregionen wanderten. Am Tag 13,5 zeigten sich in Brn3a homozygot defizienten Mäusen jedoch abnormale Axonbündel, gestörte Migration und verfrühte Verästelung im Trigemini. Dies wurde gefolgt von einem starken Anstieg der Apoptoserate am embryonalen Tag 15,5 [72]. Die Regulation von differenzierungsassoziierten Zielgenen erfolgte dabei anders als die von apoptoseassoziierten Zielgenen. So war zur Aktivierung des Bcl-2-Promotors eine kooperative DNA-Bindung durch den N-terminalen Teil des Proteins als auch durch die im C-terminalen Bereich lokalisierte POU-Domäne nötig. Im Gegensatz dazu wurde der Promotor des während der neuronalen Entwicklung essentiellen α -Internexin-Gens [73] alleine durch die N-terminale Domäne aktiviert, wohingegen für die Transkription des SNAP-25-Gens die C-terminale POU-Domäne ausreichend war [74]. Letzteres gilt phänotypisch auch für die Ausbildung von Neuriten und die Verlängerung des Axon-Zylinders im Zuge der neuronalen Differenzierung. Hierfür wichtige und durch Brn3a direkt regulierte Gene sind die Neurofilamente [75], sowie synaptische Gene wie Synaptophysin und Synaptotagmin [76]. Kürzlich als durch Brn3a direkt reguliert beschrieben sind außerdem die neuronalen basischen *Helix-Loop-Helix*-Transkriptionsfaktoren NeuroD1 und NeuroD4 [77]. Eine direkte Bindung von Brn3a an Konsensussequenzen in den Promotoren beider Gene konnte mittels lokusweiter Chromatin-Immunpräzipitation nachgewiesen werden.

Bestimmte Neuronengruppen des zentralen und peripheren Nervensystems weisen eine dauerhafte Expression von Brn3a auf. Als möglicher Grund für hierfür wurde eine positive Autoregulation in Betracht gezogen [78]. Trieu und Kollegen konnten 1999 die Bindung von Brn3a an ein *Enhancer*-Element, bestehend aus zwei regulatorischen DNA-Sequenzen ca. 5.000 und 10.000 Basenpaare stromaufwärts des Brn3a-Gens identifizieren. Diese enthalten mehrere kurze Basenabfolgen, an die Brn3a mit hoher Affinität bindet. Vier Jahre später wurden diese Ergebnisse in Experimenten mit für das Brn3a-Gen heterozygoten Mäusen bestätigt. Auch in diesem System konnte die Bindung von Brn3a an die Sequenzen des 5.000 Basenpaare stromaufwärts liegenden *Enhancers* gezeigt werden. Dies war mit einem Anstieg in der Transkription des Brn3a-Gens POU4F1 verbunden, mit dem Ergebnis, dass sensorische Neuronen von Brn3a-heterozygoten Mäusen ähnlich hohe Brn3a-mRNA-Spiegel aufwiesen wie die von Mäusen mit zwei intakten Brn3a-Allelen [79]. Sequenzvergleiche zeigten außerdem, dass diese regulatorischen Sequenzen zwischen Maus und Mensch stark konserviert sind, und dieser autoregulatorische Mechanismus daher auch in humanen Zellen denkbar ist.

1.2.2.3 Expression und Funktion von Brn3a in Tumoren

Neben gesunden neuronalen Geweben wurde die Expression von Brn3a unter anderem auch in Neoplasien neuroektodermalen Ursprungs nachgewiesen. Zellen des Neuroepithelioms, des Ewing'schen Sarkoms [50] und des Cervixkarzinoms [80] zeigten im Vergleich mit gesundem Gewebe eine deutlich erhöhte Brn3a-Expression. Auch in anderen neuroendokrinen Tumoren wie dem kleinzelligen Lungenkarzinom wurden vermehrt Brn3a-Transkripte gefunden [81]. Budhram-Mahadeo und Kollegen zeigten die Expression von Brn3a und Brn3b in gesundem Brustdrüsengewebe und in der Brustkrebs-Zelllinie MCF7 [82]. Brn3a ist somit deutlich mit Tumoren neuroektodermalen Ursprungs assoziiert, wird jedoch nicht exklusiv in solchen exprimiert.

Zur Funktionalität von Brn3a in Neoplasien ist bis jetzt nur wenig bekannt. Theil et al. wiesen 1993 nach, dass murines Brn3a in Ko-Expression mit aktiviertem Ha-Ras primäre Ratten-Fibroblasten transformieren kann [49]. Die gewonnenen stabilen Zelllinien zeigten nicht nur ankerunabhängiges Wachstum in sogenannten *Soft-agar*-Experimenten sondern auch Tumorbildung in Nacktmäusen. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass für die Tumorigenität von Brn3a die N-terminale Domäne des murinen Proteins essentiell ist. Für die kurze Isoform von Brn3a ohne diesen Abschnitt des Proteins wurden keine onkogenen Eigenschaften nachgewiesen. Die Expression dieser natürlich vorkommenden kurzen Isoform wurde zuletzt 2006 von Diss et al. im Prostatakarzinom beschrieben [83]. Ihre Expression wurde in mehr als 50% aller Tumorproben durch immunhistochemische Analysen und quantitative Echtzeit-Polymerase Kettenreaktion gezeigt. Diese Arbeitsgruppe zeigte zusätzlich die Regulation des neuronalen Nav1.7 Natrium-Ionenkanals durch Brn3a, der unter anderem das Wachstum von Prostatatumoren förderte. Daten bezüglich der Expression und Funktion von Brn3a im malignen Melanom sind derzeit nicht in der Literatur verfügbar.

1.3 Umfang dieser Arbeit

Die gezielte Behandlung einer Krebserkrankung setzt eine exakte Kenntnis der therapeutischen Zielstruktur sowie ihrer spezifischen Aufgaben in der Tumorzelle voraus. Idealerweise sollte eine tumorspezifische Expression sowie eine für die transformierte Zelle essentielle Funktion vorliegen, um eine selektive und damit ideale Angriffsfläche für die Behandlung des Tumors zu bieten. Zielsetzung dieser Arbeit ist die Charakterisierung der Expression des neuronalen Transkriptionsfaktors Brn3a (POU4F1) im humanen malignen Melanom und darauf basierend die Charakterisierung seiner Funktion in diesem Tumor.

Folgende Fragestellungen wurden bearbeitet:

1. Die Expression von Brn3a wurde in Melanomzelllinien aus unterschiedlichen Progressionsstufen des Tumors analysiert. Vergleichend wurden gesunde primäre Zellen der Haut untersucht. Ferner wurde die Expression von Brn3a in Biopsien von primären Melanomen und melanozytären Nävi mittels immunhistochemischen Färbungen bestimmt um eine mögliche klinische Relevanz von Brn3a zu prüfen.
2. Die funktionelle Relevanz von Brn3a beim malignen Melanom wurde charakterisiert, um das Potential von Brn3a als Zielstruktur für neue therapeutische Ansätze zu evaluieren. Unter Anwendung von RNA-Interferenz zur Hemmung von Brn3a wurde die Funktion von Brn3a in Melanomzellen *in vitro* analysiert.
3. Zur weiteren Aufklärung der Funktion von Brn3a als Transkriptionsfaktor wurden durch Transkriptomanalysen Zielgene in Melanomzellen identifiziert.
4. Durch Expression von Brn3a in primären Zellen der Haut wurden onkogene Eigenschaften bzw. das transformierende Potential dieses Faktors untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

2.1.1.1 Primäre Antikörper

Anti- β -Aktin	(AC-15)	Sigma (Taufkirchen, D)
Anti-Bak		New England Biolabs (Frankfurt, D)
Anti-Bax		Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Anti-Brn3a	(14A6)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Anti-Brn3a	(EP1972Y)	Epitomics (Hamburg, D)
Anti-Bcl-2	(Ab-1)	Merck Biosciences (Schwalbach/Ts., D)
Anti-Bcl-w		New England Biolabs (Frankfurt, D)
Anti-Bcl-xL		New England Biolabs (Frankfurt, D)
Anti-Caspase 3		New England Biolabs (Frankfurt, D)
Anti-Caspase 8	(1C12)	New England Biolabs (Frankfurt, D)
Anti-Caspase 9		New England Biolabs (Frankfurt, D)
Anti-phospho-Chk2 Thr68		New England Biolabs (Frankfurt, D)
Anti-Mre11		Merck Biosciences (Schwalbach/Ts., D)
Anti-Noxa	(N-15)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Anti-p21	(F5)	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Anti-p53	(Ab-6)	Merck Biosciences (Schwalbach/Ts., D)
Anti-phospho-p53 Ser15		New England Biolabs (Frankfurt, D)
Anti- phospho-p53 Ser20		New England Biolabs (Frankfurt, D)
Anti-Puma	(bbc3)	Sigma (Taufkirchen, D)
Anti-Rad50	(2C6)	Millipore (Schwalbach, D)
Anti- α -Tubulin	(DM1A)	Sigma (Taufkirchen, D)

Anti-Zytochrom C (7H8.2C12) BD Biosciences (Heidelberg, D)

Kif11 Antiserum wurde freundlicherweise von Prof. Dr. rer. nat. Thomas U. Mayer, Universität Konstanz, zur Verfügung gestellt.

2.1.1.2 Sekundäre Antikörper

Anti-Maus IgG HRP-linked	New England Biolabs (Frankfurt, D)
Anti-Rabbit IgG HRP-linked	New England Biolabs (Frankfurt, D)
Alexa Fluor® 488 Goat anti-Mouse SFX	Invitrogen (Karlsruhe, D)
NorthernLights™ Anti-rabbit IgG-NL557	R&D Systems (Wiesbaden, D)
Monoclonal Mouse anti-Rabbit	
Immunoglobulin MR12/53	DAKO (Glostrup, DK)
Polyclonal Rabbit anti-Mouse	
Immunoglobulin	DAKO (Glostrup, DK)

2.1.2 Apparative Ausstattung

CO ₂ -Inkubator Heracell	Heraeus (Hanau, D)
Durchflusszytometer FACScan	Perkin-Elmer (Waltham, USA)
Elektrophoresekammern und Zubehör	Biorad (München, D)
Entwickler für Röntgenfilme X-Omat	Kodak (Stuttgart, D)
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Zeiss (München, D)
Fluorimeter Cytofluor 2350	Millipore (Schwalbach, D)
Kameras Axiovision Mrc und Mrc 5	Zeiss (München, D)
Luminometer GloMAX® 96	Promega (Mannheim, D)
PCR-Gerät Robocycler™	Stratagene (Heidelberg, D)
Quantitatives PCR-Gerät Lightcycler™2.0	Roche (Mannheim, D)
Photometer SmartSpec 3000	Biorad (München, D)
Sterilwerkbank Herasafe	Heraeus (Hanau, D)
Tischzentrifuge (5415 C)	Eppendorf (Hamburg, D)
Tischzentrifuge, gekühlt (5810 R)	Eppendorf (Hamburg, D)

Zentrifuge, mitteltourig, gekühlt (RC5B)	Sorvall (Bad Homburg, D)
Zentrifugenrotoren (F16/250, SS34)	Sorvall (Bad Homburg, D)

2.1.3 Kommerziell erhältliche Komplettsysteme

BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Schwerte, D)

CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay (Promega, Mannheim, D)

CytoSelect[™] 96-Well Cell Transformation Assay (Cell Biolabs, San Diego, USA)

DNeasy[™] Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, D)

ELISA Human phospho-ATM Serin1981, DuoSet[®]IC (R&D Systems, Wiesbaden, D)

ELISA TransAM[™] p53 (Active Motif, Carlsbad, USA)

ECL Plus[™] (GE Healthcare, München, D)

Lightcycler[®] FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green 1 (Roche, Mannheim, D)

Lightcycler[®] TaqMan[®] Master (Roche, Mannheim, D)

QIAprep[™] Spin Mini Kit (Qiagen, Hilden, D)

Rapid DNA Ligation Kit (Roche, Mannheim, D)

RNeasy[™] Mini Kit (Qiagen, Hilden, D)

Reverse Transcriptase (Roche, Mannheim, D)

ViraPower[™] Lentiviral Packaging Mix (Invitrogen, Karlsruhe, D)

2.1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide sind in 5' → 3'-Orientierung angegeben. Primer für SYBRGreen-basierte quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR) wurden mit der Software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) entwickelt. Primer für sondenbasierte qRT-PCR wurden unter Verwendung des "Assay Design Center" (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=UP030000>) entwickelt. Passende Oligonukleotid-Sonden werden dabei automatisch gewählt. *Small Interfering RNAs* (siRNAs) wurden wie unter Punkt 2.2.10.1 entwickelt. Oligonukleotid-Sonden wurden von Roche, alle anderen Oligonukleotide von Eurofins MWG (Ebersberg, D), bezogen.

2.1.4.1 Primer

Tabelle 2: Primer für SYBRGreen basierte qRT-PCR

Gen	Vorwärts	Rückwärts
POU4F1	CCTGCTTTCTTTTGC GG TAG	GTTCTGTTTTCGCCCAACAT
HPRT	GACTTTGCTTTCCTTGGTCA	GGCTTTGTATTTTGCTTTTCC

Tabelle 3: Primer für sondenbasierte qRT-PCR

Gen	Vorwärts	Rückwärts	Sonde(#)
POU4F1	ACTTCCACGGTGCCTCTG	GATGTGGTCCAGCAGATCG	77
CDKN1A	CGAAGTCAGTTCCTTGTGGAG	CATGGGTTCTGACGGACAT	82
IFN α	GCACAGTGCCGAGGTAGC	TGGTGTTCCCTCAGATCATTCTC	44
KIF11	CATCCAGGTGGTGGTGAGAT	TATTGAATGGGCGCTAGCTT	53
TOP2A	CAACATGCCAATTGAGTGAAA	ACTTGGGCCTTAAACTTCACC	76
TP53	AGGCCTTGGA ACTCAAGGAT	CCCTTTTTGGACTTCAGGAT	12
TYMS	CCCAGTTTATGGCTTCCAGT	GGTCAACTCCCTGTCCTGAA	43
RRM2	CAGCAAGCGATGGCATAGT	AGCGGGCTTCTGTAATCTGA	22
RRM2B	ATAAACAGGCACAGGCTTCC	GCTTGTTCCAGTGAGGGAGA	56

Alle Sonden stammen aus dem Set "Universal Probe Library, Human", Kat.-Nr.: 04683633001 der Firma Roche. Einzelne Sequenzen der Sonden werden nach Rücksprache mit dem Hersteller nicht gesammelt bereitgestellt.

2.1.4.2 Small Interfering RNAs (siRNAs)

Tabelle 4: Sequenzen von in dieser Arbeit verwendeten siRNAs

Name	Gen	Sequenz
Brn3a 1	POU4F1	GCAAGAGCCAUCCUUUCAA
Brn3a 2	POU4F1	CCACGUACCACACGAUGAA
p53	TP53	GUACCACCAUCCACUACAA
Kif11	KIF11	GCAGAAAUCUAAGGAUUA
Kontrolle 1	-	GCGCAUCCAGCUUACGUA
Kontrolle 2	-	GCGCAUCCAGCUUACGUA

2.1.4.3 Oligonukleotide zur Herstellung von Genreporterplasmiden

Tabelle 5: Für die Herstellung von Genreporterplasmiden verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz
Brn3.01 sense	GATCTCTCTCTAATAATTATAATCACCCCCGCGGCTCTCTAATAATTATAATCACCCCA
Brn3.01 antisense	GATCTGGGGTGATTATAATTATTAGAGAGCCGCGGGGTGATTATAATTATTAGAGAGA
Brn3.02 sense	GATCTCTAGCTCATTAAATTCTCACCCCCGCGGCTCTAGCTCATTAAATTCTCACCCCA
Brn3.02 antisense	GATCTGGGGTGAGAATTAATGAGCTAGAGCCGCGGGGTGAGAATTAATGAGCTAGA

2.1.5 Plasmide

Tabelle 6: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Name	Parentaler Vektor	Hersteller	Beschreibung
pGL2-K-luc	pGL2-basic	Promega	Kodiert für das <i>Firefly</i> -Luziferase Gen unter Kontrolle eines Prolaktin-Minimalpromotors.
pGL2-Brn3a-luc	pGL2-basic	Promega	Kodiert für das <i>Firefly</i> -Luziferase Gen unter Kontrolle eines Prolaktin-Minimalpromotors mit drei kanonisch inserierten Brn3a DNA-Bindestellen nach Gruber et al. (1999)
pGL2-Brn3.01-luc	pGL2-basic	Promega	Kodiert für das <i>Firefly</i> -Luziferase Gen unter Kontrolle eines Prolaktin-Minimalpromotors mit zwei kanonisch inserierten Brn3a DNA-Bindestellen der Art Brn3.01 (Genomatix) gefunden im Promotor des Gens KIF11
pGL2-Brn3.02-luc	pGL2-basic	Promega	Kodiert für das <i>Firefly</i> -Luziferase Gen unter Kontrolle eines Prolaktin-Minimalpromotors mit zwei kanonisch inserierten Brn3a DNA-Bindestellen der Art Brn3.02 (Genomatix) gefunden im Promotor des Gens KIF11

pRL-CMV Vector	pRL-CMV Vector	Promega	Renilla-Luziferase Kontrollvektor zur Ko-Transfektion mit Luziferase-Reportervektoren
Brn3a WT	pcDNA4/TO	Invitrogen	Eukaryot. Expressionsvektor. Enthält die vollständige Brn3a cDNA unter Kontrolle eines CMV Promotors. Zur Verfügung gestellt von Prof. Eric Turner, Univ. of California at San Diego, USA
Brn3a 1 R	Brn3a WT	Invitrogen	s.o. /enthält zwei Punktmutationen in der Bindungssequenz der Brn3a-spezifischen siRNA 1
Brn3a 2 R	Brn3a WT	Invitrogen	s.o. /enthält zwei Punktmutationen in der Bindungssequenz der Brn3a-spezifischen siRNA 2
pLenti-Brn3a	pLenti6	Invitrogen	Lentiviraler Vektor zur Expression von Brn3a
pLenti-K	pLenti6	Invitrogen	pLenti6 Originalvektor für Kontrollansätze

2.1.6 Puffer und Lösungen

Cold Spring Harbor (CSH)-Puffer zur Proteinpräparation

5x CSH-Stock: 250 mM Tris; pH7.4, 1,25 M NaCl, 5 mM EDTA, H₂O bidest. ad 20 ml.

Phosphataseinhibitoren (Sigma)

EGTA

(Ethyleneglycol-O, O'-bis (2-aminoethyl)-N, N, N', N'-tetraacetic acid) 10 mM

Natriumorthovanadat 0,5 M

Natriumfluorid 0,5 M

CSH-Puffer (Mengen für 1 ml)

5x CSH-Stock	200 µl
TritonX100 (10%)	10 µl
7x Complete Stock	150 µl
EGTA 10 mM	10 µl
Na-Orthovanadat 0,5 M	10 µl
Natriumfluorid 0,5 M	100 µl
H ₂ O bidest. ad 1 ml	520 µl

Cycloheximid (Sigma)

100 mg/ml in DMSO

Bradford-Reagenz:

350 mg Serva-Blau G (Coomassie-Blau)

250 ml Ethanol (Merck)

250 ml Phosphorsäure (85 %, Merck)

ad 1 l H₂O bidest.**Reagenzien für Immunoblot nach Lämmli****1x Laufpuffer (1.000 ml)**

20x MES SDS Running Buffer (Invitrogen) 50 ml

H₂O bidest. 950 ml

Antioxidanz (Invitrogen) 0,5 ml

1x Transferpuffer (500 ml)

20x Transferpuffer (Invitrogen) 25 ml

Methanol, absolut (Merck) 50 ml

H₂O bidest. 425 ml

Antioxidanz (Invitrogen) 0,5 ml

1x Blockierlösung (Roche)

Roche Blocking Solution 50 ml

Natriumfluorid (0,5 M)	50 ml
Phosphatgepufferte Saline (PBS, Apotheke Klinikum Großhadern, München, D)	450 ml

1x Waschpuffer (500 ml)

PBS	500 ml
Tween20 (Sigma)	0,5 µl

Reagenzien für Durchflusszytometrie (FACS)-Analyse

Zellzyklusanalyse (PI-FACS)

Propidiumiodid (Sigma)	5 mg/ml in PBS
RNase A (Sigma)	10 mg/ml in PBS
Waschpuffer	1% BSA in PBS, steril filtriert
Ethanol pro analysi (Merck)	75% (in H ₂ O bidest.)

Annexin V -Färbung

Annexin V Fluos (Roche)

Färbepuffer:

10 mM HEPES/NaOH pH7,4, 140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂

Reagenzien für Reporter-Analysen

5x Passive Lysis Buffer (Promega)

ATP Substrat und Luziferase Substrat (Biothema, Handen, S)

Coelentarezine (Promega)

Reagenzien für Immunzytochemie

Paraformaldehyd (Merck) 4%, in PBS

5% BSA (Sigma) in PBS

Alkoholische Lösungen

Chloroform, Isopropanol und Ethanol (absolut, pro analysi) von Merck

RNase freies Wasser

0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (Sigma) in H₂O bidest., autoklaviert

Puffer und Lösungen aus kommerziellen Komplettsystemen sind nicht einzeln aufgeführt.

2.1.7 Transfektionsreagenzien

Lipofectamin™ RNAiMAX (Invitrogen) wurde für die Transfektion von siRNAs verwendet, für Plasmide FuGENE®6 (Roche).

2.1.8 Verbrauchsmaterialien

Einmalpipetten 5, 10, 25 ml	Greiner (Frickenhausen, D)
Einmalreaktionsgefäße (1,5 ml, 2,2ml)	Eppendorf (Hamburg, D)
Einmalreaktionsgefäße (15 ml, 50ml)	Falcon (Heidelberg, D)
Einmalspritzen	GLW (Würzburg, D)
FACS-PE Röhrchen	Falcon (Heidelberg, D)
Kryoröhrchen	Falcon (Heidelberg, D)
Küvetten, 1 ml	Sarstedt (Nürnberg, D)
Objektträger	Schubert und Weiss (München, D)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim, D)
PCR Mikroreaktionsgefäße (0,5 ml)	Peqlab (Erlangen, D)
Petrischalen (für Bakteriologie)	Greiner (Frickenhausen, D)
Pipettenspitzen	Biozym (Hess. Oldendorf, D)
Röntgenfilm (Hyperfilm ECL)	Amersham (Braunschweig, D)
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher&Schuell (Dassel, D)
Zellkulturflaschen (Fläche 75 cm ²)	Nunc (Wiesbaden, D)
Zellkulturlochplatten (6-, 12-, 24- und 96-Loch)	Nunc (Wiesbaden, D)
Zellschaber	Costar (Bodenheim, D)

2.1.9 Zellkulturmedien

Medium für Tumorzellen (TU2%)

MCDB153 (Sigma)	80%	400 ml
Leibovitz L-15 (Gibco)	20%	100 ml
Fötale Kälberserum (Biochrom, Berlin, D)	2%	11 ml
Rinderinsulin (Sigma)	5 µg/ml	0,5 ml
Calciumchlorid (CaCl ₂)	1,68 mM	0,42 ml

Medium für primäre Fibroblasten

DMEM (Biochrom, 4,5 g/L Glukose)

10% Fötale Kälberserum (FKS, Biochrom)

Medium für primäre Keratinozyten

SFM (serumfreies Medium, Biochrom) 500 ml

rEGF (rekombinanter epithelialer Wachstumsfaktor, Biochrom) 15 µl

BPE (Kälberhypophysenextrakt, Biochrom) 937,5 µl

Medium für primäre Melanozyten

Medium 254CD (Invitrogen) 500 ml

CaCl₂ (Invitrogen) 500 µl

HMGS-2 (Invitrogen) 5 ml

Weitere Zellkultur-Lösungen

Hank's balanced salt solution (HBSS, Invitrogen)

Trypsin/EDTA (Invitrogen)

0,2% EDTA in PBS

Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung von primären Zellen der menschlichen Haut

Primäre humane Fibroblasten wurden in Vollmedium (DMEM/10%FKS), humane Keratinozyten in serumfreiem Medium (SFM, Biochrom) mit Zusatz von rekombinantem epidermalen Wachstumsfaktor und Kälberhypophysenextrakt kultiviert. Primäre humane Melanozyten wurden in 254CD Medium (Invitrogen) unter Zusatz von HMGS-2 (*Human Melanocyte Growth Supplement*, Invitrogen) kultiviert. Alle Zellen wurden in T75 Zellkulturflaschen (Nunc) bei 37° C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert.

2.2.1.2 Melanomzellkultur

Humane Melanomzelllinien wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Meenhard Herlyn vom Wistar-Institut, Philadelphia (USA), zur Verfügung gestellt. Sie wurden in Tumormedium 2% (TU2%, siehe 2.1.9) bei 37° C und 5% CO₂-Gehalt in T75 Zellkulturflaschen kultiviert. Bei 80-90% Konfluenz wurden adhärenente Zellen zur Passagierung mit 2-3 ml Trypsin/0.5% EDTA bei 37° C vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Nach 2 Minuten (min) wurde die Reaktion durch Zugabe von Vollmedium (DMEM/10% FKS) abgestoppt und die abgelösten Zellen in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die bei 1.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) über 5 min sedimentierten Zellen wurden anschließend in TU2% entsprechend ihrer Kulturdichte verdünnt und erneut in Kulturflaschen ausgesät. Für Transfektionsversuche wurden die abgelösten Zellen in der Neubauer Zählkammer gezählt und zu 60-70% Konfluenz in Multilochplatten (6- oder 12-Loch, Nunc) in TU2% ausgesät und bis zur Verwendung bei 37° C und 5% CO₂-Gehalt inkubiert.

2.2.2 Zellyse und Proteinpräparation

2.2.2.1 Gesamtzellprotein

Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit PBS/0,2% EDTA bei 37° C vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Vollmedium (DMEM/10% FKS) abgestoppt und die Zellen für 5 min bei 4° C und 2.400 rpm sedimentiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen nach Zugabe des

Lysepuffers (CSH-Puffer) 30 min auf Eis inkubiert. Zelldebris wurde durch Zentrifugation (20 min, 4° C, 13.200 rpm) abgetrennt und verworfen. Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte spektrometrisch bei 562 nm aus dem Überstand.

2.2.2.2 Präparation von nukleären Proteinen

Die fraktionierte Zellyse zur Präparation von nukleären Proteinen wurde unter Verwendung des „Nuclear Extract Kit“ der Firma Active Motif durchgeführt. Zellen aus einer T75 Zellkulturflasche wurden mit 5 ml eiskalter PBS/Phosphatase Inhibitor (Pfi)- Lösung gewaschen, anschließend in 3 ml PBS/Pfi-Lösung mit einem Zellschaber vom Boden der Flasche abgelöst und in 15 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 4° C und 500 rpm 5 min lang sedimentiert und der Überstand verworfen. Nach der Zugabe von 500 µl hypotonischem Puffer und anschließendem mehrmaligen auf- und ab pipettieren wurden die Zellen 15 min auf Eis inkubiert und durch Zugabe von 25 µl Detergens und 15 sekündigem (sec) Schütteln (Vortex) lysiert. Die Suspension wurde 30 sec lang bei 4° C und 13.200 rpm zentrifugiert um so die Zellkerne von der zytoplasmatischen Fraktion zu trennen. Der Überstand wurde abgenommen und bei -80° C gelagert. Das entstandene Sediment wurde in 50 µl „Complete Lysis Buffer“ aufgenommen und nach 10 sec Schütteln (Vortex) 30 min auf Eis bei leichtem Schütteln inkubiert, um die Zellkerne zu öffnen. Die Suspension wurde für 10 sec geschüttelt (Vortex) und dann bei 4° C und 13.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand mit den enthaltenen nukleären Proteinen wurde anschließend in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und sofort weiter verwendet oder bei -80° C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration der nukleären Fraktion erfolgte mit Bradford-Reagenz wie unten beschrieben.

2.2.2.3 Präparation von zytosolischen Proteinen

Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit Trypsin/EDTA abgelöst und zweimal mit PBS gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die sedimentierten Zellen in 50 µl Digitoninpuffer (100 µg/µl Digitonin in PBS) aufgenommen und zur Permeabilisierung der Membran für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden Zellmembranreste und Mitochondrien durch Zentrifugation (5 min, 3.000 rpm, 4° C) von der zytosolischen Fraktion abgetrennt. Der Überstand mit zytosolischen Zellbestandteilen wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur vollständigen Entfernung von Zelldebris wurde die zytosolische Fraktion bei 13.200 rpm und 4° C für 20 min zentrifugiert und der Überstand anschließend bei -80° C gelagert. Die sedimentierten Mitochondrien wurden zweimal in 0,3% BSA/PBS gewaschen und nach dem zweiten Waschschrift in 50 µl CSH-Puffer 30 min lang

auf Eis lysiert. Der Debris wurde bei 13.200 rpm für 20 min sedimentiert, der die mitochondrialen Proteine enthaltende Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80° C gelagert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration von zytosolischer und mitochondrialer Fraktion erfolgte mit Reagenzien der Firma Pierce wie unten beschrieben.

2.2.3 Präparation von Nukleinsäuren

2.2.3.1 Präparation der genomischen Desoxyribonukleinsäure (DNA)

Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und zur Ablösung vom Kulturgefäß mit 0,2% PBS/EDTA für 5-10 min bei 37° C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Vollmedium abgestoppt und die abgelösten Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 1.000 rpm wurden die Zellen einmal mit 10 ml PBS gewaschen und im nachfolgenden Schritt in einem Milliliter PBS aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in Lysepuffer aufgenommen. Die Präparation der genomischen DNA aus dem Zelllysat erfolgte durch den DNeasy™ Blood and Tissue- Kit der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers.

2.2.3.2 Präparation von Ribonukleinsäuren (RNA)

Die Präparation von RNA erfolgte mit Trizol Reagenz der Firma Invitrogen. Diese saure Mischung aus Phenol und dem RNase-Inhibitor Guanidinisothiocyanat lysiert Zellen und stabilisiert gleichzeitig die enthaltene RNA. Adhärente Zellen wurden zweimal mit HBSS gewaschen und anschließend mit 1 ml Trizol Reagenz überschichtet. Nach 5 min Inkubation mit mehrmaligem leichtem Schwenken bei Raumtemperatur wurden die Zellen mit einem Zellschaber vom Boden des Zellkulturgefäßes abgelöst und in Trizol Reagenz in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Es wurden 200 µl Chloroform zugegeben und die Reaktionsgefäße nach 15-30 sec Schütteln 2 bis 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 15 min Zentrifugation bei 4° C und 12.000 rpm wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die darin enthaltene RNA wurde durch anschließende Zugabe von einem Volumen Isopropanol 10 min bei Raumtemperatur präzipitiert und dann 30 min lang bei 4° C und 13.200 rpm sedimentiert. Die RNA wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen, um Isopropanolreste und Salze zu entfernen, bei Raumtemperatur für etwa 10 min getrocknet und anschließend in 20 bis 50 µl Diethylpyrocarbonat-Wasser (H₂O/DEPC) gelöst. Die Konzentration der gelösten RNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge 260 nm bestimmt und entsprechend ihrer Verdünnung in 10 mM TRIS/HCl pH7 und dem Umrechnungsfaktor 40 (siehe Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren) berechnet.

2.2.3.3 Präparation von RNA für Microarrayanalysen

RNA für die Verwendung in Microarrayexperimenten wurde unter Verwendung des RNeasy™ Mini Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers isoliert.

2.2.4 Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

2.2.4.1 Reverse Transkription von RNA zur Verwendung in qRT-PCR

Bei der reversen Transkription wird poly A-RNA in copy-DNA (cDNA) umgeschrieben. Der dazu verwendete Primer Oligo dT (p(DT)15, Eurofins MWG) bindet an den für mRNA typischen poly-A Schwanz des 3'-Endes und ermöglicht es dadurch dem Enzym Reverse Transkriptase eine Abschrift oder Kopie der mRNA zu erstellen. Ein Mikrogramm (μg) präparierte RNA wurde mit 500 ng Oligo dT-Primer in einem Gesamtvolumen von 9,5 μl 10 min lang bei 65° C inkubiert, um eine vollständige Denaturierung der RNA zu erreichen. Anschließend wurden First Strand Buffer, Dithiothreitol (DTT), Natrium-Desoxyribonukleosidtriphosphate (Na-dNTPs), RNAsin (Rekombinanter RNAsin RNase-Inhibitor) und das Enzym Reverse Transkriptase zu einem Gesamtreaktionsvolumen von 20 μl zugegeben und die Reaktion eine Stunde bei 42° C durchgeführt. Alle Reagenzien stammten von Roche.

RNA Denaturierung:

Gesamt RNA 1 μg	x μl
H ₂ O/DEPC	y μl
Oligo dT (250 ng/ μl)	2,0 μl
	insg. 9,5 μl

Erststrangsynthese:

5x First Strand Buffer	4,0 μl
0,1 M DTT	2,0 μl
10 mM Na-dNTPs	2,0 μl
RNAsin	0,5 μl
Reverse Transkriptase	1,0 μl
	insg. 10,5 μl

Gesamtvolumen: 20,0 μl

Für die Verwendung der cDNA in der sondenbasierten qRT-PCR (siehe unten) wurde der 20 µl-Ansatz mit H₂O/DEPC auf 60 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und je 3 µl (entsprechend 50 ng) in die qRT-PCR eingesetzt oder bei -80° C gelagert.

2.2.4.2 qRT-PCR

Das Prinzip der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) basiert auf dem der konventionellen Polymerase-Kettenreaktion (PCR), mit dem Unterschied, dass neben der Nukleinsäurevervielfältigung eine Lichtreaktion herbeigeführt wird, die die Quantifizierung des entstehenden PCR-Produktes ermöglicht. Die Fluoreszenzentwicklung wird nach jedem Amplifikationszyklus der PCR gemessen. Die Amplifikation der Ausgangs-DNA (Template-DNA) kann dadurch in Echtzeit verfolgt werden. Dabei korreliert die Zunahme an emittiertem Licht mit der Zunahme an PCR-Produkt. Nach Abschluss der Reaktion kann so die Menge an erzieltm Produkt aus der exponentiellen Phase der Reaktion bestimmt werden. Diese Phase der Reaktion wird herangezogen, da am Anfang einer PCR nur eine begrenzte Menge an Template-DNA vorhanden ist und die Wahrscheinlichkeit eines Zusammentreffens von Template, Primern und DNA-Polymerase deutlich geringer ist als nach einer Vervielfältigung der DNA. In der Schlussphase der PCR hingegen kommt es durch den Verbrauch des Enzyms und der Na-dNTPs sowie durch die Entstehung des Reaktionsproduktes und von Nebenprodukten wie Pyrophosphat und Monophosphatnukleotiden zu einer Hemmung der Reaktion, die langsam zu einem Plateau in der Amplifikation der Template-DNA führt. Den Anfang der exponentiellen Phase der Reaktion kennzeichnet der Threshold Cycle ("Schwellenwert-Zyklus") oder CT-Wert. Dieser auch als „Crossing Point“ (CP) bezeichnete Zeitpunkt beschreibt den Amplifikationszyklus, in dem die Fluoreszenz erstmals signifikant über die Hintergrundfluoreszenz hinausgeht. Bei jeder Reaktion werden zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben auch Proben mit bekannter Konzentration in einer Verdünnungsreihe amplifiziert, um daraus eine Standardkurve für die Reaktion zu erstellen. Mit Hilfe dieses Standards kann dann durch den CT-Wert der Probe eine Aussage über die Menge an amplifizierter cDNA getroffen werden.

Zusätzlich zur Amplifikation des Zielgens wird ein weiteres Gen als Referenz gemessen. Dabei wird ein sogenanntes *Housekeeping*-Gen gewählt, welches ubiquitär und ohne größere Schwankungen in der Zelle exprimiert wird. Die Messung des Zielgens wird mit der Messung des Referenzgens verrechnet und damit normiert. Man spricht dabei von relativer Quantifizierung, da nur ein quantitativer Vergleich von entstandenen Produkten verschiedener Ansätze einer PCR möglich ist, jedoch keine Messung von absolut entstandenen Mengen. Als Referenzgen wurde die Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT), ein Enzym des Purinmetabolismus, verwendet. Seine Hauptaufgabe besteht im

Recycling von Hypoxanthin und Guanin für den in der Zelle verfügbaren Nukleotidpool. Das konstitutiv exprimierte HPRT-Gen kodiert für eine in geringer Menge vorliegende HPRT mRNA, weshalb es sich als endogene Referenz für sogenannte *low-copy* oder seltene RNAs anbietet. Um den gemessenen RNA-Mengen von Standardgen und Zielgen Werte zuweisen zu können, verwendet man die oben genannte Standardkurve.

2.2.4.3 SYBR Green 1-basierte qRT-PCR

SYBR Green 1 ist ein Cyaninfarbstoff, der ähnlich Ethidiumbromid zum Nachweis von doppelsträngiger DNA (dsDNA) verwendet wird. Beide Verbindungen sind in der Lage, unspezifisch in dsDNA zu interkalieren. Der bei dieser Bindung entstehende Komplex absorbiert blaues Licht der Wellenlänge 498 nm und emittiert grünes Licht der Wellenlänge 522 nm. Da es sich aber um eine unspezifische Bindung an jedes entstehende PCR-Produkt handelt, muss im Anschluss an die Amplifikation eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, um die Spezifität der Reaktion sicher zu stellen und Artefakte sowie Primerdimere auszuschließen. Die Temperatur im Reaktionsansatz wird nach der Amplifikation schrittweise erhöht und damit die entstandene dsDNA wieder in Einzelstränge aufgetrennt. Dabei kommt es zu einer messbaren Abnahme der Fluoreszenz, die je nach Länge des PCR-Produkts spezifisch verläuft. Unspezifische Produkte haben meist eine geringere Größe und damit eine geringere Schmelztemperatur (T_m). So lässt sich abschätzen, ob unspezifische PCR-Produkte entstanden sind und die Qualität der Reaktion kann so beurteilt werden. SYBR Green 1-basierte qRT-PCR wurde zu Beginn dieser Arbeit für Untersuchungen der Brn3a-mRNA in humanen Melanomzellen und primären Zellen der Haut sowie für die Evaluierung von Brna-spezifischen siRNAs verwendet. Sie wurde anschließend durch die spezifischere sondenbasierte qRT-PCR ersetzt.

Spezifische Primer für die Untersuchung der Brn3a-mRNA Expression wurden mittels der internetbasierten Software Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) entworfen und bei Eurofins MWG synthetisiert. Reaktionen wurden in 20 µl Gesamtvolumen durchgeführt und die entstandenen Produkte durch Schmelzkurvenanalyse auf Spezifität überprüft. Für alle SYBRGreen 1-basierten Versuche wurde der Lightcycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green 1-Kit von Roche benutzt. Dieses System ist eine Weiterentwicklung des herkömmlichen SYBR Green 1-Kits von Roche und vereinfacht die Etablierung der Reaktion, da keine Magnesiumtitration mehr vorgenommen werden muss. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes für die erfolgreiche und spezifische Amplifikation eines Brn3a-Fragments aus der mRNA von 1205Lu-Melanomzellen war wie folgt:

H ₂ O, PCR grade	9 µl
PCR Primer (je 10 µM)	2 µl
Reaction Master Mix (mit Enzym)	4 µl
cDNA (100 ng)	5 µl
	insg. 20 µl

Es wurde ein LightCycler[®] 2.0-Gerät der Firma Roche verwendet. Das Reaktionsprotokoll war wie folgt:

Initiale Denaturierung	1 Zyklus	95° C/10 min
Quantifizierung	45 Zyklen	95° C/15 sec 55° C/10 sec 72° C/30 sec
Schmelzkurve	1 Zyklus	95° C/0 sec
Abkühlung auf 40° C		0,1° C/sec

Das entstandene Produkt wurde in einem 1,5% Agarosegel aufgetrennt, ausgeschnitten und zur Sequenzierung an Eurofins MWG übergeben.

2.2.4.4 qRT-PCR mit spezifischen Hybridisierungssonden

Zusätzlich zu spezifischen Primern wird hier eine kurze LNA (*locked nucleic acids*)-haltige Hybridisierungssonde verwendet. Als LNA bezeichnet man Nukleotide oder Oligonukleotide, deren Zuckeranteil chemisch modifiziert wurde. Bei dieser Modifikation handelt es sich um eine Verbindung des C2- und C4-Atoms über eine Sauerstoff-Methylen-Brücke. Die so modifizierte Verbindung ist in der 3'-endo-Konformation fixiert und weist dadurch eine höhere Bindungsspezifität auf als die natürlich vorkommende Variante. Außerdem haben die nur 9 Nukleotide langen LNA-Sonden durch diese Modifikation eine ähnliche Hybridisierungstemperatur wie die unmodifizierten Primer mit einer Länge von 20 bis 25 Nukleotiden. Sie sind am 5'-Ende mit Fluorescein und am 3'-Ende mit einem sogenannten Quencher markiert, der die Lichtemission nach Anregung des 5'-Fluorophors unterdrückt. Nach Bindung der genspezifischen Primer und der Hybridisierungssonde kommt es zur Strangverlängerung durch die DNA-Polymerase, einer thermostabilen Taq-Polymerase. Dieses Enzym verfügt zusätzlich über 5'-3'-Exonuclease-Aktivität und beginnt bei Erreichen der an die cDNA gebundenen Sonde diese abzubauen. Da so das Fluorophor am 5'-Ende vom Quencher am 3'-Ende getrennt wird, kann die Lichtemission durch das 5'-Fluorophor

nicht mehr durch den Quencher unterdrückt werden. Die entstehende Fluoreszenz wird während der PCR in Echtzeit gemessen. Sie ist proportional zur Menge an entstehendem PCR-Produkt. Die Ermittlung von relativen Mengen an Produkt ausgehend von Fluoreszenz und Standardkurve verläuft analog zur SYBR Green 1-basierten Methode (siehe oben). Aufgrund der zusätzlich durch die Sonde gegebenen erhöhten Spezifität wird bei der Auswertung auf eine Schmelzkurvenanalyse verzichtet. Durch die Kombination von spezifischen Primern und spezifischer LNA-Sonde ist es möglich mit nur etwa 100 verschiedenen Sondensequenzen PCRs für das vollständige humane Genom zu generieren. Spezifische Hybridisierungssonden wurden in Form der UniversalProbeLibrary™ (UPL) von der Firma Roche bezogen. Primer-Paare und passende Sonden wurden für jedes zu untersuchende Gen mittels internetbasiertem Assay-Design auf www.universalprobelibrary.com ausgewählt. Wenn möglich wurde aus den angebotenen Varianten ein intronübergreifender Ansatz (*Intron-spanning assay*) ausgewählt. Dabei binden die spezifischen Primer an mRNA-Abschnitte, die aus zwei aufeinander folgenden Exons des Gens stammen. Das Risiko einer Kontamination der Messung durch genomische DNA wird dadurch minimiert. Oligonukleotidprimer wurden von Eurofins MWG bezogen. Für die qRT-PCR wurde der Lightcycler® TaqMan® Master-Kit von Roche verwendet.

Der für alle Reaktionen verwendbare Ansatz war wie folgt:

H ₂ O, PCR grade	4,5 µl
Sonde	0,1 µl
PCR Primer (je 10 µM)	0,2 µl
Reaction Master Mix (mit Enzym)	2,0 µl
cDNA (100 ng)	3,0 µl
	insg. 10 µl

Die Reaktionsbedingungen waren für alle untersuchten Gene identisch:

Initiale Denaturierung	1 Zyklus	94° C/10min
Quantifizierung	45 Zyklen	94° C/10 sec 55° C/20 sec 72° C/5 sec
Abkühlung auf 40° C		0,1° C/sec

Primerpaare und die Nummern der verwendeten Sonden sind unter Punkt 2.1.4.1 aufgeführt.

2.2.5 Microarrayanalysen

Microarrayanalysen des vollständigen humanen Genoms wurden mit Bead-Chips der Firmen Affymetrix (Santa Clara, USA) und Illumina, (Arnsberg, D) in Kooperation mit der Arbeitsgruppe um Prof. Johannes Beckers am Institut für Experimentelle Genetik (IEG) des Helmholtz Zentrums Neuherberg durchgeführt. Die dafür benötigte RNA von Melanomzellen wurde durch den RNeasy™ Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert. Nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde die RNA auf Trockeneis gelagert und an das IEG übergeben.

2.2.6 Photometrische Konzentrationsbestimmungen

Alle Bestimmungen wurden in einem Smartspec 3000 Gerät der Firma Bio-Rad durchgeführt.

2.2.6.1 Nukleinsäuren

Genomische DNA und RNA wurden 1:20 in 10 mM TRIS/HCl pH7 verdünnt und in einer Quarzküvette gemessen. Die Bestimmung von Konzentration und Reinheit der RNA erfolgte durch die Messung bei 260 und 280 nm. Ein Koeffizient zwischen 1,7 und 2 wies dabei auf eine minimale Kontamination mit DNA oder Proteinen hin und diente als Indikator für eine ausreichend hohe Qualität der Präparation. Da eine Optische Dichte (OD) von 1 bei 260 nm einer RNA Konzentration von 40 ng/µl entspricht, kann man die RNA Konzentration wie folgt berechnen:

Konzentration RNA [ng/µl] = Extinktion bei 260 nm x Verdünnung x 40

Für isolierte genomische DNA wurde äquivalent verfahren. Die Berechnung der Konzentration unterscheidet sich lediglich im Umrechnungsfaktor (50 statt 40 für isolierte RNA). Die Formel zur Berechnung lautet daher wie folgt:

Konzentration DNA [ng/µl] = Extinktion bei 260 nm x Verdünnung x 50

Als Referenz wurde in beiden Fällen 10 mM TRIS/HCl pH8 verwendet.

2.2.6.2 Proteine

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Reagenzien der Firma Pierce nach den Angaben des Herstellers. Die Reagenzien A und B wurden im Verhältnis 1:50 gemischt und je 10 µl Proteinlysate zugegeben. Die Proben wurden kurz gemischt (Vortex) und nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur in Halbmikroküvetten bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Die Berechnung der Proteinkonzentration erfolgte mittels einer Eichgeraden aus

in CSH-Lysepuffer verdünntem bovinen Serumalbumin (New England Biolabs, 10 mg/ml) in Verdünnungsschritten von 80, 40, 20, 10, 5 und 2,5 mg/ml. Als Referenz wurden 10 µl CSH-Lysepuffer verwendet. Da dieses Verfahren nach Pierce nicht mit dem zur Herstellung von Nuklearextrakten verwendeten „Complete Lysis Buffer“ kompatibel ist (Erfahrung des Labors), wurde hier die Konzentrationsbestimmung nach Bradford durchgeführt [84]. 10 µl Proteinlysate wurden in 800 µl H₂O bidest. in Halbmikroküvetten vorgelegt und durch Zugabe von 200 µl Bradford-Reagenz die für die Umsetzung von Coomassie-Brilliantblau typische Farbreaktion herbeigeführt. Die Messung erfolgte sofort bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Berechnung der Konzentration erfolgte anhand einer Eichgeraden wie oben beschrieben. Als Referenz wurde in diesem Fall „Complete Lysis Buffer“ der Firma Active Motif verwendet.

2.2.7 Proteinbiochemische Verfahren

2.2.7.1 Bestimmung der p53-Aktivität im ELISA

Die Bestimmung der p53 DNA-Bindungsfähigkeit erfolgte durch den TransAM™ p53-Kit der Firma Active Motif. Die Messung wurde im 96-Loch-Format durch die Bindung von p53 Protein aus Nuklearextrakten von Melanomzellen an eine p53-Konsensus-Bindesequenz (5'-GGACATGCCCGGGCATGTCC-3') und anschließende Inkubation mit einem p53-spezifischen Antikörper durchgeführt. Der verwendete Antikörper erkennt p53 nur nach einer durch DNA-Bindung hervorgerufenen Konformationsänderung. Die Detektion der DNA-Protein-Antikörperbindung erfolgte durch Zugabe eines HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers und die dadurch ermöglichte kolorimetrische Messung im Spektrophotometer bei 450 nm und Referenzwellenlänge 655 nm. Kernextrakte aus Melanomzellen wurden unter 2.2.2.2 beschrieben hergestellt. Zur Etablierung der Methode wurden Kompetitorversuche mit den im Kit enthaltenen mutierten und Wildtyp-Oligonukleotiden durchgeführt. Als Positivkontrolle wurde ein im Kit enthaltener H₂O₂-behandelter Nuklearextrakt von MCF7-Zellen eingesetzt. Die Durchführung des Experiments erfolgte mit am gleichen Tag hergestellten Kernextrakten wie in der Anleitung des Herstellers beschrieben.

2.2.7.2 Bestimmung der ATM-Phosphorylierung im ELISA

Der Nachweis der Phosphorylierung der Kinase *Ataxia telangiectasia mutated* (ATM) erfolgte durch den ELISA Human phospho-ATM Serin1981, DuoSet®IC der Firma R&D Systems nach den Angaben des Herstellers. 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und nach 48 h das Gesamtzellprotein wie unter 2.2.2.1 beschrieben

isoliert. Je 5 µg Gesamtprotein wurde pro Ansatz eingesetzt. Die Detektion erfolgte durch Messung des Farbumschlags bei 470 nm in einem Titertek Multiscan Fotometer der Firma Du Pont.

2.2.7.3 Immunoblot nach Lämmli

Proteine, die wie unter 2.2.2.1 beschrieben isolierte wurden, wurden nach Lämmli [85] in einem 4-12% Acrylamid-Gel der Firma Invitrogen (Nupage Novex 4-12% Bis Tris Gel, 1,0 mm, 10 Taschen) ihrer Größe und Ladung entsprechend aufgetrennt. Vor dem Gellauf wurden die vorgefertigten Gele mit H₂O bidest. und anschließend mit Laufpuffer gewaschen und die Geltaschen mit Laufpuffer gespült. Je nach Expression des zu detektierenden Proteins und Qualität des Antikörpers wurden 5 bis 10 µg Protein mit Ladepuffer und Sample Reducing Agent zu einem Gesamtvolumen von 20 µl gemischt, für 10 min bei 70° C denaturiert und auf das Gel geladen. Zusätzlich wurden 15 µl eines Protein Größenstandards der Firma Invitrogen (NuPage MES) mit aufgetragen. Der Gellauf erfolgte bei konstanten 150 Volt (V) für etwa 45 min. Die Proteine wurden anschließend auf Invitrolon PVDF-Membranen der Firma Invitrogen mittels Elektroblob übertragen (30 V für 70 min). Die Membranen wurden dann eine Stunde lang in Blockierlösung der Firma Roche bei Raumtemperatur inkubiert um unspezifische Bindungen des primären Antikörpers zu minimieren. Primäre Antikörper wurden je nach Packungsbeilage in Blockierlösung (Roche) oder 5% BSA in PBS/0,1% Tween20 nach Angaben des Herstellers verdünnt und über Nacht bei 4° C unter leichtem Schütteln auf die auf der Membran enthaltenen Proteine hybridisiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 10 min in PBS/0,1% Tween20 gewaschen und anschließend mit dem in Blockierlösung verdünnten, Horse Raddish Peroxidase (HRP)-gekoppelten Sekundärantikörpern (1:1.000) für 1 h bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Membran wurde danach erneut dreimal gewaschen. Für die Lichtreaktion wurden Membranen mit 2 ml Enhanced Chemoluminescence (ECL) Plus Western Blotting Detection Reagent (Amersham) für 5 min im Dunkeln inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL Hyperfilm-Filmen der Firma GE Healthcare, deren Entwicklung automatisiert durch ein X-omat 1000-Gerät der Firma Kodak.

2.2.7.4 Brn3a-Immunoblot

Für die Detektion von Brn3a mit dem monoklonalen Maus-Antikörper SC-8429 von Santa Cruz Biotechnology (verdünnt 1:250 in 5% BSA/0,1% Tween20) wurde die PVDF-Membran nach dem Proteintransfer mit einer Verdünnungsreihe von 4 M bis 0,125 M Guanidinisothiocyanat (Sigma), gelöst in Waschpuffer (0,05% Tween20 in PBS) auf Eis und

bei leichtem Schütteln inkubiert, um die auf der Membran gebundenen Proteine vollständig zu denaturieren. Anschließend wurde die Membran 5 min in PBS/0,1% Tween20 gewaschen und dann eine Stunde mit Blockierlösung bei leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert.

2.2.7.5 Immunhistochemie

Histopathologisch bestätigte Gewebeproben von humanen primären Melanomen und melanozytären Nävi wurden aus der histologischen Abteilung der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität, München, bezogen. formalinfixiertes und in Paraffin eingebettetes Gewebe (Dicke 5 mm) wurde in Xylol deparaffiniert (2 x 10 min) und in einer Isopropanolverdünnungsreihe (100, 96, 80, und 70% in H₂O bidest.) rehydriert. Die Proben wurden zur Antigenaufschlüsselung in Citrat-Puffer (ICH Select, Chemicon, Temecula, CND), pH 6, 10-20 min in einer Mikrowelle (8 min bei ~450 Watt) erhitzt. Die Färbung erfolgte nach der Alkaline Phosphatase Anti Alkaline Phosphatase (APAAP)-Methode. Verwendet wurde eine 1:50 Verdünnung von primärem Brn3a-Antikörper (Epitomics), Maus anti-Kaninchen (Monoklonal MR12/53, Verdünnung 1:1.000, DAKO) und Kaninchen anti-Maus sekundären Antikörpern (Polyklonal, Verdünnung 1:20, DAKO) sowie alkalischer Phosphatase (DAKO). Fast Red (5 min, Sigma-Aldrich) wurde als Substrat verwendet und alle Proben mit Mayers Hämatoxylin gegengefärbt. Die mikroskopische Untersuchung wurde an einem Axioskop Mikroskop der Firma Zeiss durchgeführt. Digitale Fotoaufnahmen wurden mit einer AxioCam Mrc5-Kamera der Firma Zeiss gemacht.

2.2.7.6 Immunzytochemie

1205Lu-Melanomzellen wurden auf Falcon[®] Zellkultur-Objektträgern (BD) kultiviert und je nach Experiment mit entsprechenden siRNAs (20 nM) transfiziert. Für Färbungen von Mre11/Rad50-Foci wurde 40 h nach Transfektion das Medium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und für 20 min bei Raumtemperatur in 4% Paraformaldehyd/PBS fixiert. Anschließend wurde dreimal für 5 min mit PBS gewaschen und die Zellen für 20 min in 0,1% Triton X-100 (Sigma) permeabilisiert. Nach weiteren drei Waschungen in PBS (5 min) wurden die Zellen zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungen für 30 min bei Raumtemperatur in 20% BSA/PBS inkubiert. Färbungen erfolgten mit primären Antikörpern gegen humanes Rad50 (Millipore, Schwalbach, Verdünnung 1:1.000) und humanes Mre11 (Merck, Verdünnung 1:100) in 1% BSA/PBS bei 4° C in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurden die Zellen dreimal mit PBS

gewaschen und für 1 h bei RT mit der Verdünnung der sekundären Antikörper inkubiert. Für die Färbung von Rad50 wurde ein *Alexa Fluor[®] 488 Goat anti-Mouse SFX*-Antikörper (1:250, Invitrogen) verwendet, für die Färbung von Mre11 ein *NorthernLights[™] Anti-Rabbit IgG* (1:400, R&D Systems). Schließlich wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen, wobei im letzten Waschschrift 0,1% Hoechst 33342 (Sigma) zur Färbung der Zellkerne zugegeben wurde und die Dauer des Waschschrifts auf 2 min verkürzt wurde. Die Zellen wurden mit Gel/Mount (Biomedica, Foster City, USA) überschichtet, mit einem Deckglas bedeckt und mit Nagellack versiegelt. Für die immunzytochemische Darstellung der Kernlokalisierung von Brn3a-Protein wurde analog unter Verwendung des Brn3a-Antikörpers von Biomol und dem Anti-Kaninchen Sekundärantikörper von R&D Systems verfahren. Für Färbungen des Mikrotubuli-Zytoskeletts wurden die Zellen in eiskaltem absoluten Methanol für 10 min bei 4° C fixiert, dreimal in PBS gewaschen und in einer 1:1.000 Verdünnung eines FITC-markierten α -Tubulin-spezifischen Antikörpers (Sigma) in 1% BSA/PBS über Nacht bei 4° C in einer feuchten Kammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen wie oben beschrieben gewaschen. Die mikroskopische Untersuchung wurde an einem Axioskop Mikroskop der Firma Zeiss durchgeführt. Digitale Fotoaufnahmen wurden mit einer Axiocam Mrc5-Kamera der Firma Zeiss gemacht.

2.2.8 Cell Titer Blue[®]: Messung der Zell-Vitalität

Der Cell Titer Blue[®] Cell Viability Assay (Promega) diente zur Feststellung der Vitalität von kultivierten primären Zellen der Haut und Melanomzellen. Bei diesem einfachen, fluoreszenzbasierten Test wird zum Kulturmedium der Zellen eine dunkelblaue, resazurinhalte Pufferlösung gegeben und die Zellen anschließend für eine Zeitspanne von bis zu 60 min bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Die dunkelblaue oxidierte Form des Farbstoffs wird in dieser Zeit durch den Stoffwechsel intakter Zellen zur rötlichen Verbindung Resafurin reduziert. Das Absorptionsmaximum ändert sich dadurch von 600 nm nach 560 nm und ermöglicht so eine fluorimetrische Bestimmung des Anteils der lebenden Zellen einer Gesamtpopulation. Zellen in einer 6-Loch-Kulturplatte wurden wie folgt behandelt: Das Kulturmedium wurde abgenommen und durch 750 μ l frisches Medium ersetzt. Dazu wurden 150 μ l Cell Titer Blue[®]-Reagenz gegeben, kurz geschüttelt und der Reaktionsansatz bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Nach 30 und 60 min wurde je eine Probe von 100 μ l genommen und in eine 96-Loch-Kulturplatte überführt. Ein Referenzwert aus der Reaktion von 750 μ l sterilem Kulturmedium mit 150 μ l Cell Titer Blue[®]-Reagenz wurde mitgeführt. Die Messung wurde an einem Cytofluor 2350 Fluorimeter der Firma Millipore bei einem Absorptionsmaximum von 560 nm und einem Emissionsmaximum von 590 nm, durchgeführt.

2.2.9 Durchflusszytometrie (FACS)

2.2.9.1 Propidiumiodid-FACS zur Analyse des Zellzyklus

Propidiumiodid (PI) interkaliert wie Ethidiumbromid unspezifisch in doppelsträngige DNA. Dabei lagert sich etwa alle 4 bis 5 Basen ein PI-Molekül ein. Als Folge dieser Bindung verändert sich das Absorptionsmaximum von PI von 488 nm nach 535 nm bzw. das Emissionsmaximum von 590 nm nach 617 nm und die Intensität des emittierten Lichts steigert sich um das 20- bis 30-fache. Auf diese Weise kann der intrazelluläre DNA-Gehalt bestimmt werden, welcher Rückschlüsse auf die Zellzyklusphase in der die Zelle sich befindet, zulässt (siehe auch Abschnitt 3.2.3.1). Da PI auch RNA binden kann, muss diese vor der Analyse durch RNAsen, entfernt werden. Propidiumiodid kann die Membran von gesunden Zellen nicht durchdringen. Daher kann es in der Durchflusszytometrie neben der Messung des DNA-Gehalts der Zelle auch zur Diskriminierung von lebenden und toten Zellen mit permeabler Zellmembran verwendet werden. Für Zellzyklus-Analysen, also zur Bestimmung des DNA-Gehalts von Zellen, wurde PI (Sigma) in einer Konzentration von 5 mg/ml in PBS eingesetzt. Für den Verdau der RNA wurde RNase A (Sigma) zu 10 mg/ml in PBS gelöst. Adhärente Zellen wurden zweimal mit HBSS gewaschen, durch Zugabe von 500 µl Trypsin/0,2% EDTA abgelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden bei 2.000 rpm und 4° C für 5 min sedimentiert und zweimal mit PBS gewaschen. Das PBS wurde bis auf ein Restvolumen von 100 µl von den pelletierten Zellen abgenommen und 1,4 ml eiskaltes Ethanol 75% (Endkonzentration 70%) unter langsamem Schütteln (Vortex) zugeträufelt, um die Zellmembran zu permeabilisieren und die DNA der Zellen zu fixieren. Die fixierten Zellen wurden über Nacht bei 4° C inkubiert und am nächsten Tag zweimal mit 500 µl Waschpuffer (0,5% BSA/PBS) gewaschen. Der Waschpuffer wurde vollständig abgenommen und die pelletierten Zellen in 300 µl Färbelösung pro Ansatz aufgenommen.

Propidiumiodid-Färbelösung (für 3 Ansätze):

Propidiumiodid-Lösung (5 mg/ml)	8 µl
RNase A-Lösung (10 mg/ml)	8 µl
Waschpuffer (0,5% BSA/PBS)	3 ml

Anschließend wurden alle Ansätze zum Verdau der RNA für 15 min bei 37° C inkubiert und dann in FACS-Röhrchen überführt. Die Analyse des DNA-Gehalts erfolgte mit einem FACScan-Gerät der Firma Perkin-Elmer.

2.2.9.2 Quantifizierung apoptotischer Zellen

Phosphatidylserin (PS) ist ein Baustein der eukaryotischen Doppelmembran, der sich in gesunden Zellen auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran befindet. Während der Apoptose kommt es zu Veränderungen im Membranaufbau und PS kann auch auf der extrazellulären Seite der Zellemembran nachgewiesen werden. Das Protein Annexin V kann PS spezifisch binden und damit die bei Apoptose auftretenden Membranveränderungen messbar machen. Das in dieser Arbeit verwendete Annexin V war mit Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) gekoppelt und konnte daher nach einer Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm im Durchflusszytometer gemessen werden. Da beim natürlichen Zelltod, der Nekrose, wegen des Verlusts der Membranintegrität Annexin V auch in die Zelle eindringen und so an intrazelluläres PS binden kann, muss gleichzeitig eine Färbung mit PI durchgeführt werden, um tote Zellen von den in Apoptose befindlichen Zellen unterscheiden zu können. Wie oben erwähnt kann PI nur in Zellen mit zerstörter Membranintegrität eindringen. Bei Zellen, die sich mit Annexin V und PI positiv färben lassen, kann nicht mehr unterschieden werden, ob Apoptose oder Nekrose für den Zelltod verantwortlich war.

Die adhärenenten Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, anschließend durch Zugabe von PBS/0,2% EDTA abgelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (Zentrifugation bei 2.000 rpm und 4° C für 5 min) wurden die sedimentierten Zellen in 50 µl Färbelösung aufgenommen und für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Pro 50 µl Färbelösung wurde 1 µl FITC-markiertes Annexin V zugegeben. Nach der Inkubation wurden weitere 50 µl Färbepuffer, versetzt mit 10 µl PI, zugegeben und die Messung mit einem FACScan-Gerät der Firma Perkin-Elmer durchgeführt.

2.2.10 Inhibition der Genexpression durch RNA-Interferenz

2.2.10.1 Entwicklung von spezifischen siRNAs

Genspezifische siRNAs wurden nach publizierten Standards entworfen [86, 87]. Kontroll-siRNAs wurden so entworfen, dass sie an keine Sequenz des bekannten menschlichen oder murinen Transkriptoms hybridisieren können [88]. In Experimenten, in denen nur eine Kontroll-siRNA verwendet wurde handelte es sich stets um Kontrolle 1 (siehe 2.1.4.2).

2.2.10.2 Transfektion von siRNAs

Zellen wurden zu 60-70% Konfluenz am Tag der Transfektion in 6-Loch-Kulturplatten ausgesät. 1,25 µl der siRNA (20 µM) wurden in 125 µl serumfreiem Medium (Optimem, Invitrogen) verdünnt. Im gleichen Volumen Optimem wurden 1,25 µl Lipofectamin RNAiMax (Invitrogen) verdünnt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden beide Lösungen gemischt und zur Komplexbildung der siRNA für 15-20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen abgenommen und durch 1,25 ml frisches Kulturmedium ersetzt. Anschließend wurden die nun in 250 µl serumfreiem Medium mit Lipofectamin RNAiMax komplexierten siRNAs in die einzelnen Löcher der Kulturplatte tröpfchenweise zugegeben. Die Endkonzentration der siRNA betrug 20 nM in einem Volumen von 1,5 ml. Die Effizienz der verwendeten siRNAs wurde auf mRNA-Ebene durch qRT-PCR untersucht, auf Proteinebene mittels Immunoblot.

2.2.11 Inhibition der Proteinsynthese durch Cycloheximid

Das Antibiotikum Cycloheximid (CHX) wird von *Streptomyces griseus*, einem Bakterium aus der Gruppe der Actinomyceten produziert. Es wirkt als Translationshemmer bei Eukaryonten durch die Hemmung der ribosomalen Peptidyltransferase. Der dadurch ausgelöste Proteinsynthesestopp ermöglicht eine Untersuchung der Abbauraten von Proteinen im Immunoblot. Diese Technik wurde zur Untersuchung der Stabilität des p53-Proteins nach Brn3a-Hemmung verwendet. Dazu wurden 1205Lu-Melanomzellen mit Brn3a-spezifischer siRNA oder mit Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 48 h wurde CHX (Sigma) in DMEM/10% FKS verdünnt und in einer Endkonzentration von 25 µg/ml in das Kulturmedium der Zellen gegeben. Ein Ansatz ohne CHX-Behandlung wurde als Referenzwert verwendet. Anschließend wurden Zellen nach 30 min sowie nach 1, 2, 4 und 8 h geerntet. Die Zellen wurden wie oben beschrieben mit CSH-Puffer lysiert und das Gesamtzellprotein präpariert. Die Analyse des p53-Abbaus erfolgte im Immunoblot.

2.2.12 Reporteranalysen

Für Reporteranalysen wurden Firefly- (Glühwürmchen, *Phausis splendidula*) und Renilla- (Seefeder, *Renilla reniformis*) Luziferasevektoren verwendet. Bei diesem System enthält der Firefly-Luziferasevektor einen Promotor mit den zu untersuchenden spezifischen DNA-Bindesequenzen eines Transkriptionsfaktors. Bindet der Transkriptionsfaktor an diese Sequenzen kommt es zur Promotoraktivierung und dadurch zur Produktion des Enzyms Firefly-Luziferase. Dabei ist im eukaryotischen System die Menge an produziertem Enzym proportional zur Stärke der Promotoraktivierung zu sehen, das heißt je affiner ein

Transkriptionsfaktor an diese regulatorischen DNA-Sequenzen bindet, desto mehr Luziferase wird gebildet. Die Detektion des gebildeten Enzyms erfolgt dann durch Zugabe eines spezifischen Substrats, dem Luziferin. Luziferine werden mit Sauerstoff zu energiereichen, instabilen Dioxetanen umgesetzt. Beim Zerfall dieser Substanzen kommt es zur Biolumineszenz, also zur Lichtemission. Diese wird sofort nach der Zugabe des Luziferins luminometrisch detektiert. Um Unterschiede in der Zellzahl oder in der Transfektion berücksichtigen zu können, wird ein Kontroll-Vektor zusammen mit dem Reporterkonstrukt komplexiert und transfiziert. Dabei handelt es sich um einen Expressionsvektor mit dem Gen der Renilla-Luziferase unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors. Die Lichtemission der gebildeten Renilla-Luziferase kann unabhängig vom Firefly-System detektiert werden. Die gemessenen Emissionswerte werden verwendet, um die Werte der Firefly-Messung zu normalisieren.

Das hier verwendete Brn3a-Reporterplasmid pGI2-Brn3a-luc enthielt einen Prolaktin-Minimalpromotor in den dreimal aufeinanderfolgend eine DNA-Bindesequenz eingefügt wurde, an die Brn3a bevorzugt bindet [89]. Als Kontrolle diente der gleiche Vektor ohne Brn3a-Bindestellen (pGI2-K-luc). Beide Vektoren wurden freundlicherweise von Dr. Eric Turner, University of California, San Diego, USA zur Verfügung gestellt. Zur Normalisierung der Messung wurde ein Renilla-Luziferasevektor der Firma Promega verwendet. Alle Messungen wurden im 96-Loch-Format in einem GLOMAX Microplate Luminometer der Firma Turner Biosystems durchgeführt.

2.2.12.1 Nachweis der transkriptionellen Aktivität von Brn3a

Zur Untersuchung der transkriptionellen Aktivität von Brn3a in Melanomzelllinien wurden diese im 96-Loch-Format in 150 µl TU2%-Medium ausgesät und nach 24 h mit Genreporterplasmiden transfiziert. Dazu wurde pro Ansatz 1 µl FuGENE®6 Transfektionsreagenz (Roche) in 50 µl Optimem verdünnt und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur 100 ng des Reporterplasmids (pGI2-Brn3a-luc) bzw. des Kontrollplasmids (pGI2-K-luc) und 50 ng des Renilla-Luziferasevektors zugegeben. Der Transfektionsansatz wurde durch leichtes Anstoßen des Reaktionsgefäßes gemischt, 20-25 min bei Raumtemperatur zur Komplexbildung inkubiert und anschließend zu den Melanomzellen pipettiert. Nach 48 h wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 50 µl Passive Lysis Buffer (Promega) bei 4° C für 10 min aufgeschlossen. Je 20 µl des Lysats wurden zur Messung der Firefly- oder der Renilla-Luziferase Aktivität verwendet. Das Lysat wurde dazu in eine lichtundurchlässige 96-Loch-Kulturplatte überführt. Für die Firefly-Luziferase-Messung wurden 20 µl Substrat-Lösung in Form eines 1:1 Gemischs aus Luziferin-Substrat und ATP-Substrat (beide Firma Biothema) zugegeben, für die Renilla-Messung 20 µl

Coelenterazine-Lösung (Promega 1:800 in H₂O bidest.). Die Messung des emittierten Lichts erfolge sofort nach Zugabe des jeweiligen Substrats.

2.2.12.2 Hemmung der transkriptionellen Aktivität von Brn3a

Zum Nachweis der Effizienz und der Spezifität der verwendeten siRNAs wurde die transkriptionelle Aktivität von Brn3a in Brn3a-gehemmten Zellen durch Genreporteranalysen bestimmt. Dazu wurden Melanomzellen mit 20 nM Brn3a-spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert und für 24 h inkubiert. Dann wurde das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen einmal mit HBSS gewaschen. Anschließend wurde wie oben beschrieben mit pGL2-Brn3a-luc und Renilla-Plasmid transfiziert. Die Analyse erfolgte wie oben beschrieben nach weiteren 24 h. Dieser Versuchsaufbau wurde für die unter 2.2.12.3 beschriebenen Versuche beibehalten.

2.2.12.3 Nachweis der Regulation des KIF11-Gens durch Brn3a

Für den Nachweis der Regulation des KIF11-Gens durch Brn3a wurde der Reporter-Vektor pGL2-Brn3a-luc wie folgt modifiziert. Die bereits enthaltenen Brn3a-DNA-Bindestellen nach Gruber et al. (1999) wurden durch Restriktionsverdau mit dem Enzym BglIII (NEB, Frankfurt am Main, D) entfernt und stattdessen doppelsträngige DNA-Oligonukleotide mit den potentiellen Brn3a-DNA-Bindestellen Brn3.01 und Brn3.02 des KIF11-Promotors eingefügt (siehe 2.1.4.3). Die Ligation erfolgte unter Verwendung des Rapid DNA Ligation Kit (Roche) nach den Angaben des Herstellers. Es wurden zwei verschiedene Vektoren generiert: pGL2-Brn3.01-luc und pGL2-Brn3.02-luc, die je zwei Kopien der jeweiligen Bindestelle inseriert in den Prolaktin-Minimalpromotor enthielten. Für den Versuch zum Nachweis der Regulation des KIF11-Gens durch Brn3a wurde wie unter 2.2.12.2 verfahren.

2.2.13 Ektopische Expression von Brn3a-Protein

Der Brn3a-exprimierende Vektor Brn3a WT wurde freundlicherweise ebenfalls von Prof. Eric Turner zur Verfügung gestellt. Dabei handelt es sich um einen pcDNA4/TO-Expressionsvektor der Firma Invitrogen, der das vollständige Brn3a-Protein konstitutiv unter Kontrolle eines CMV-Promotors exprimiert. Die im *Rescue*-Versuch (Abbildung 12) verwendeten Varianten mit mutierten siRNA-Bindestellen (Brn3a 1 R und Brn3a 2 R) wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe PD Dr. med. Simon Rothenfusser der Abteilung Klinische Pharmakologie der Universität München unter Verwendung des QuikChange Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, Heidelberg, D) hergestellt. Für die Transfektion von Vektoren und siRNAs in diesem Versuch wurde wie folgt verfahren: 3 µl FuGENE®6

Transfektionsreagenz wurden in 50 µl OPTIMEM verdünnt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1 µg des jeweiligen Plasmids zugegeben und das Transfektionsgemisch zur Komplexierung 30 min bei RT inkubiert. 1205Lu-Melanomzellen wurden zu 60-70% Konfluenz am Tag des Versuchs in 6-Loch-Kulturplatten ausgesät. Das Kulturmedium wurde durch 1 ml frisches Medium ersetzt und der Transfektionsansatz tröpfchenweise zugegeben. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen, einmal mit HBSS gewaschen und mit siRNAs wie unter Punkt 2.2.10.2 beschrieben transfiziert. 48 h später wurden die Zellen im Immunoblot oder durchflusszytometrisch analysiert.

2.2.14 Stabile Expression von Brn3a in primären Zellen der Haut

2.2.14.1 Virenproduktion

Vier Millionen 293FT-Produzentenzellen wurden in DMEM/10% FKS in 10 cm-Zellkulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden 5 µg Fugene®6-komplexierter Vektor zusammen mit dem ViraPower™ Lentiviral Packaging-Mix nach den Angaben des Herstellers Ko-transfiziert. Der Transfektionsansatz war wie folgt:

pLenti-Brn3a oder pLenti-K	5 µg
ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix	5 µg
Fugene 6	35 µl
Optimem	500 µl

Zunächst wurden 35 µl FuGENE 6 in 500 µl serumfreiem Medium verdünnt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden Vektor und Packaging-Mix zugegeben und das Transfektionsgemisch zur Komplexierung 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Kulturmedium der 293FT-Zellen durch 6 ml frisches Kulturmedium ersetzt. Der Transfektionsansatz wurde zugegeben und nach 17 h das Medium erneut gewechselt. Nach weiteren 48 h wurden die Virenüberstände geerntet, durch 0,2 µm Sterilfilter filtriert und bei -80° C eingefroren.

2.2.14.2 Infektion primärer Zellen der Haut

Primäre Fibroblasten oder Melanozyten wurden in entsprechendem Medium zu 60-70% in 6-Lochplatten mit 1 ml Virenüberstand infiziert. Nach 24 h wurde dies wiederholt und die infizierten Zellen für weitere 24 h bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

2.2.14.3 Soft-agar-Assay

Um onkogene Eigenschaften von Brn3a in primären Fibroblasten und Melanozyten zu untersuchen, wurden Zellen wie oben beschrieben mit Brn3a-exprimierenden Lentiviren oder Kontroll-Viren infiziert und deren Fähigkeit zu ankerunabhängigem Wachstum mittels *Soft-agar*-Assays untersucht. Hierfür wurde der CytoSelect™ 96-Well Cell Transformation Assay (Cell Biolabs) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dazu wurden 5.000 Zellen pro Bedingung (pLenti-Brn3a und pLenti-K) in je drei unabhängigen Ansätzen eingesetzt. Zusätzlich wurden 1205Lu-Melanomzellen als Positivkontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden für 10 Tage in *Soft-agar* bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte die Untersuchung im Inversmikroskop, wobei Anzahl und Größe der Kolonien bestimmt wurden. Schließlich wurde der Agar verflüssigt und die enthaltenen Zellen lysiert. CyQuant®GR Dye wurde zugegeben und Unterschiede im Wachstum der Zellen fluorimetrisch bei 485/520 nm bestimmt.

2.2.15 Statistische Analysen

Alle statistischen Untersuchungen in dieser Arbeit wurden mit einem *t*-Test mit unabhängigen Proben unter Verwendung der SPSS Software PASW statistics 17 durchgeführt. Als signifikant (*) gelten Werte $p < 0,05$. Als nicht signifikant (n.s.) gelten Werte $p > 0,05$. Ausnahme ist die statistische Analyse des Tumorwachstums im Mausversuch (siehe Abbildung 8). Hier wurden je zwei Tumoren pro Tier vermessen. Da es sich daher um je zwei verbundene Stichproben handelt, wurde zur Analyse der Wilcoxon-Test mit gepaarten Proben verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalyse von Brn3a in Zellen des malignen Melanoms

Bei der Entwicklung innovativer Ansätze in der Melanomtherapie und der Therapie von Tumorerkrankungen allgemein ist eine tumorspezifische Expression der therapeutischen Zielstruktur von großer Bedeutung. Neue Therapeutika sollen selektiv die Tumorzelle angreifen und dabei umliegendes Gewebe und gesunde Zellen nicht schädigen. Die folgende Expressionsanalyse des neuronalen Transkriptionsfaktors Brn3a beim malignen Melanom umfasst Untersuchungen auf mRNA- und Proteinebene in kultivierten Melanomzellen und primären Zellen der Haut. Weiterhin wurden klinische Proben von melanozytären Nävi und primären Melanomen immunhistochemisch untersucht, um Informationen zur klinischen Relevanz von Brn3a zu gewinnen.

3.1.1 Untersuchung der Brn3a-mRNA

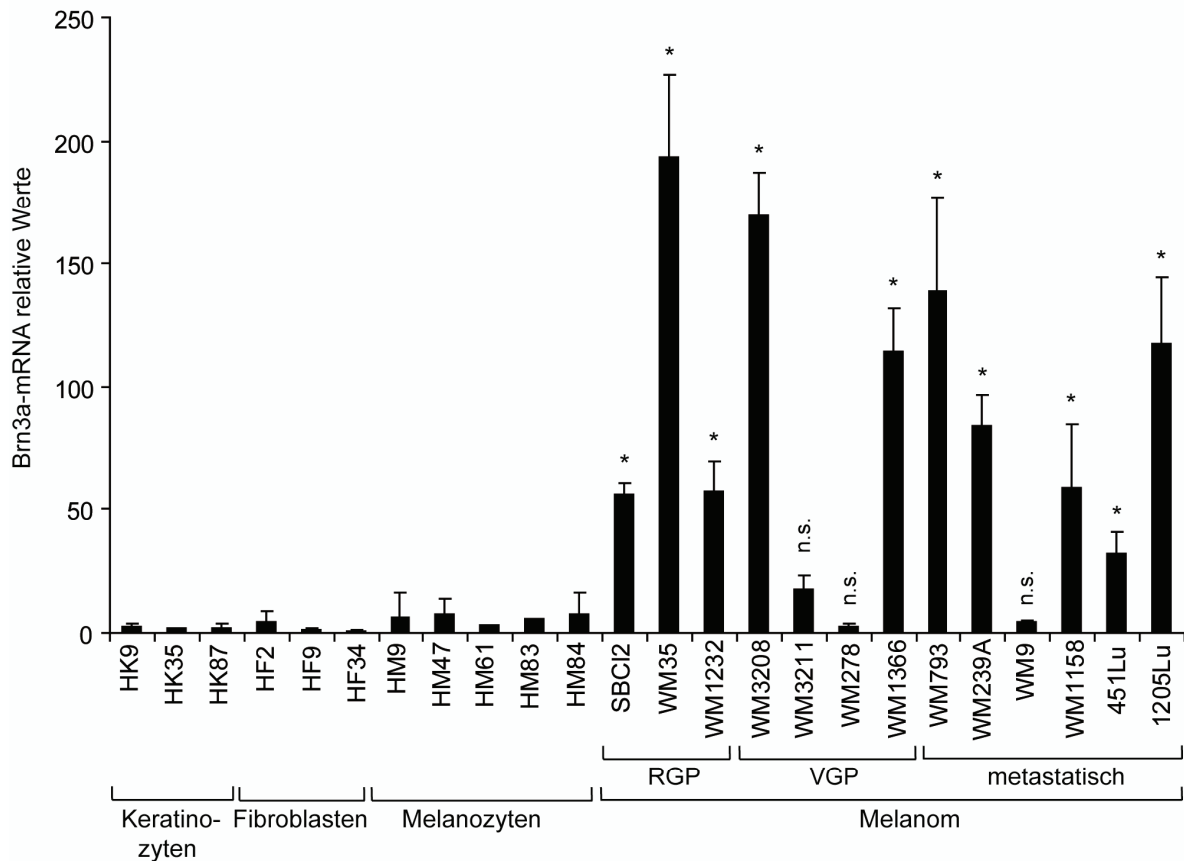
Die Brn3a-mRNA von primären humanen Keratinozyten, Fibroblasten (je 3 Spender) und Melanozyten (5 Spender) sowie von 13 humanen Melanomzelllinien wurde in einer SYBR Green™-basierten qRT-PCR quantifiziert. Dabei zeigten 10 von 13 untersuchten Melanomzelllinien eine signifikant höhere Expression von Brn3a als die untersuchten primären Zellen der Haut (Abbildung 4 A). In primären Keratinozyten und Fibroblasten konnten nur sehr geringe Mengen von Brn3a-mRNA detektiert werden. Auch Melanozyten, die gesunden Vorläuferzellen des malignen Melanoms, zeigten eine sehr niedrige Brn3a-Expression. Die untersuchten Melanomzelllinien wurden in Abbildung 4 A entsprechend der Progression des Tumors von links nach rechts angeordnet. Es wurden 3 Zelllinien aus der radiären Wachstumsphase (*radial growth phase*, RGP), 3 aus der vertikalen Wachstumsphase (*vertical growth phase*, VGP) und 7 Zelllinien aus Melanommetastasen (metastatisch) untersucht. Beim Vergleich der Brn3a-Expressionsstärke der Melanomzelllinien untereinander konnte keine Korrelation mit dem Stadium der Tumorprogression festgestellt werden.

3.1.2 Untersuchung des Brn3a-Proteins

Untersuchungen auf Proteinebene erfolgten mit Proben von primären Melanozyten (5 Spender) und 12 Melanomzelllinien mittels Immunoblot. Um ein spezifisches Signal für

Brn3a zu erhalten musste das Versuchsprotokoll wie in Material und Methoden unter Punkt 2.2.7.4. angegeben modifiziert werden.

A



B

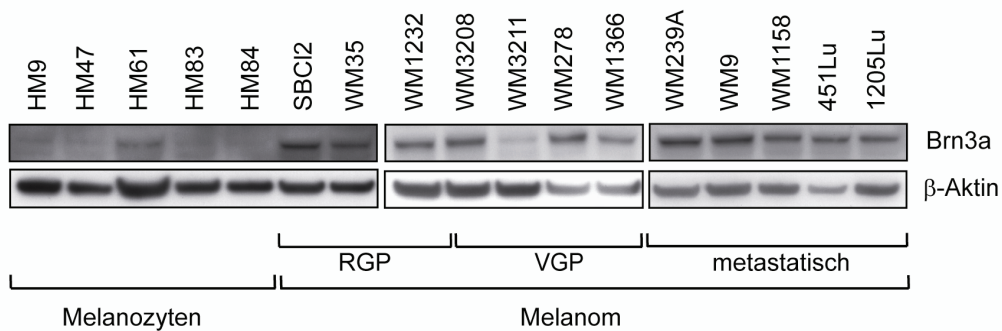


Abbildung 4: Expressionsanalyse von Brn3a in primären Zellen der Haut und Melanomzellen

(A) Untersuchung der Brn3a-mRNA Die Expression von Brn3a-mRNA wurde mittels qRT-PCR in primären Zellen der Haut und Melanomzellen analysiert. Dargestellt sind von links nach rechts humane primäre Keratinozyten (HK, 3 Spender), Fibroblasten (HF, 3 Spender) und Melanozyten (HM, 5 Spender), gefolgt von Melanomzellen aus der radiären (RGP), vertikalen (VGP) und metastatischen Wachstumsphase. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. * bezeichnen einen signifikanten Unterschied in der Expression von Brn3a-mRNA im Vergleich zu allen untersuchten Melanozyten.

(B) Untersuchung der Expression von Brn3a-Protein Die Expression von Brn3a auf Proteinebene wurde mittels Immunoblot mit einem Brn3a-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Dabei wurden Proben von primären Melanozyten (HM, 5 Spender) mit 12 Melanomzelllinien aus unterschiedlichen Progressionsstufen des Tumors verglichen. Humanes β -Aktin diente als Ladekontrolle. Immunoblots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

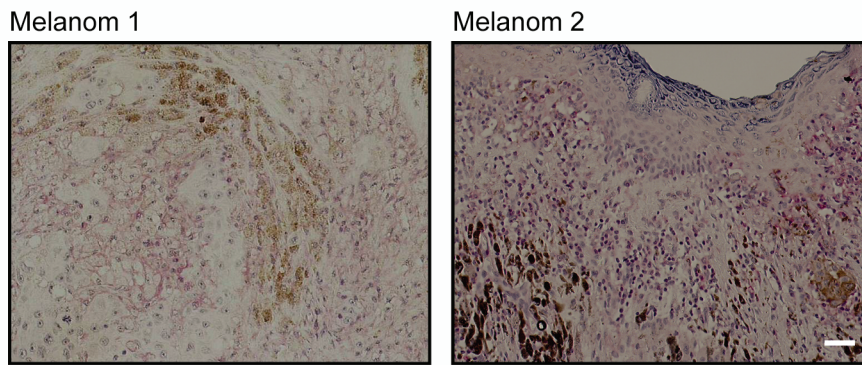
Die Spezifität des Antikörpers wurde in RNA-Interferenz-Versuchen (siehe Abbildung 6 B) und bei der ektopischen Expression des Brn3a-Proteins (siehe Abbildung 12 B) bestätigt. In Abbildung 4 B sind Melanozyten und Melanomzelllinien dargestellt, letztere wie in Abbildung 4 A nach dem Stadium der Tumorprogression von links nach rechts. Während 11 von 12 Melanomzellen ein deutliches Brn3a-Signal zeigten, konnte in primären Melanozyten kein, oder nur sehr geringe Mengen von Brn3a-Protein nachgewiesen werden. Die Melanomzelllinie WM3211 zeigte wie zuvor auf mRNA-Ebene beobachtet in drei unabhängigen Experimenten keine Brn3a-Expression auf Proteinebene. Auch auf Proteinebene korrelierte die Expression von Brn3a nicht mit dem Progressionsstadium des Tumors. In den meisten Fällen korrelierte die Expressionsstärke von Brn3a auf mRNA- und Proteinebene in den untersuchten Zellen. Ausnahmen zeigten sich z.B. bei der metastatischen Zelllinie WM9, in der Brn3a-Protein deutlich detektierbar war, Brn3a-mRNA aber nur sehr niedrige Werte erzielte. Da der verwendete Antikörper laut Angaben des Herstellers die Aminosäuren 1-107 des N-Terminus des Brn3a-Proteins erfasst, ist davon auszugehen, dass im Brn3a-Immunoblot die lange Brn3a-Isoform (Brn3a (L), siehe Abbildung 3) erkannt wird.

3.1.3 Immunhistochemische Untersuchung von Brn3a

In Paraffin eingebettete Gewebeschnitte von primären Melanomen und melanozytären Nävi wurden immunhistochemisch auf die Expression von Brn3a-Protein getestet. Alle immunhistologischen Färbungen wurden über die APAAP (Alkalische Phosphatase Anti-Alkalische Phosphatase)-Methode angefertigt. Von 6 untersuchten primären Melanomen verschiedener Spender waren 4 eindeutig positiv für die Expression von Brn3a. Abbildung 5 A zeigt repräsentative Färbungen primärer Melanome von 2 unterschiedlichen Spendern mit positiver Brn3a-Färbung. In melanozytären Nävi von 4 Spendern wurde hingegen keine Expression von Brn3a detektiert. Gezeigt sind zwei repräsentative Färbungen melanozytärer Nävi von 2 verschiedenen Spendern (Abbildung 5 B).

Zusammengefasst zeigen die im Zuge der Expressionsanalyse gewonnenen Daten eine deutlich verstärkte Expression von Brn3a in Zellen des malignen Melanoms im Vergleich mit gesunder Haut. Eine Korrelation der Brn3a-Expression mit der Tumorprogression des malignen Melanoms konnte nicht festgestellt werden.

A



B

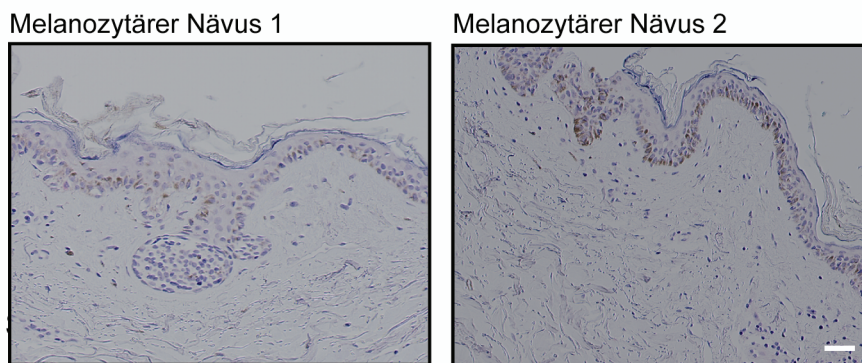


Abbildung 5: Nachweis der Brn3a-Expression in menschlichem Gewebe *in situ*

Immunohistochemische Untersuchungen an Patientenmaterial zeigten die Expression von Brn3a in primären Melanomen, aber nicht, oder nur sehr vereinzelt, in melanozytären Nävi. Gezeigt sind repräsentative Brn3a-Färbungen von primären Melanomen und melanozytären Nävi von jeweils 2 Spendern. Der Maßstabsbalken entspricht 200 μm .

3.2 Funktionelle Charakterisierung von Brn3a beim malignen Melanom

3.2.1 Design und Evaluierung von Brn3a-spezifischen siRNAs

RNA-Interferenz ist eine etablierte Methode zur spezifischen Deregulation von Genen durch Transfektion von kurzen doppelsträngigen RNA-Oligonukleotiden in die Zielzelle. Der zugrunde liegende Mechanismus wurde von Fire und Mello 1998 für die Verwendung in *Caenorhabditis elegans* beschrieben [90] und wenig später auf Säugetierzellen übertragen [91]. Prinzipiell wird durch das Einbringen von *small interfering RNAs* (siRNAs) der Angriff eines RNA-Virus auf die Zelle simuliert. Um eine Replikation des Virus zu verhindern, wird die in die Zelle injizierte doppelsträngige RNA vom Enzymkomplex Dicer in kleine doppelsträngige, den siRNAs entsprechende Oligonukleotide gespalten. Diese werden von

einem weiteren Enzymkomplex, genannt RISC (*RNA-induced silencing complex*), gebunden, und in ihre komplementären Einzelstränge aufgetrennt. Der *Sense*-Strang wird in der Folge abgebaut und der frei gewordene *Antisense*-Strang kann sequenzspezifisch an die mRNA des Virus binden. Sie wird zunächst an der Bindestelle gespalten und dann vollständig abgebaut.

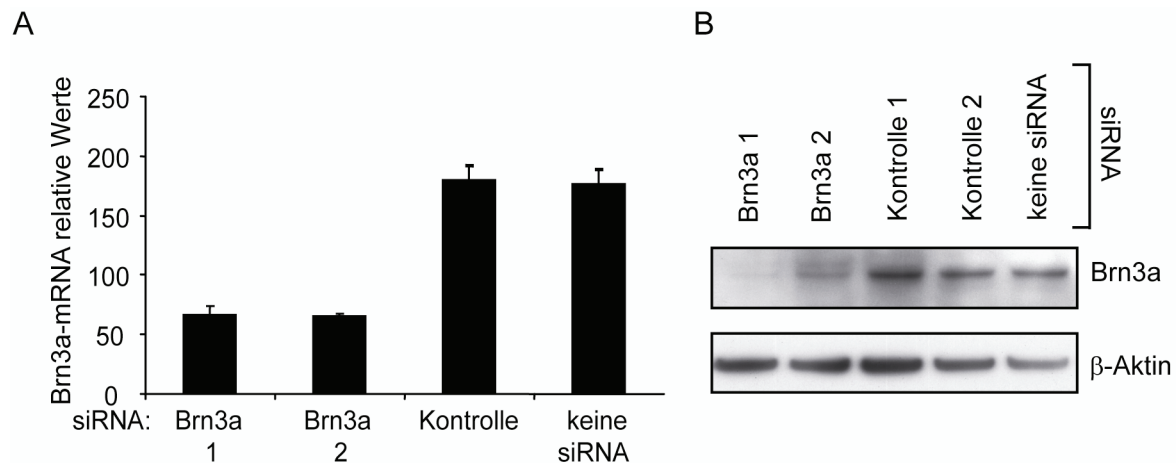


Abbildung 6: Hemmung von Brn3a durch spezifische siRNAs

(A) Evaluierung von Brn3a-spezifischen siRNAs Zwei unterschiedliche Brn3a-siRNAs wurden auf Hemmung von Brn3a in 1205Lu-Melanomzellen mittels qRT-PCR getestet. Beide Sequenzen reduzierten die Brn3a-mRNA um bis zu 70% verglichen mit einer Kontroll-Sequenz und unbehandelten Zellen bei einer siRNA-Konzentration von 20 nM und 24 h nach Transfektion. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

(B) Analyse des Brn3a-Proteins nach Hemmung von Brn3a 48 h nach Transfektion mit Brn3a-siRNAs wurde das Gesamtprotein von 1205Lu-Melanomzellen im Immunoblot untersucht. Gezeigt ist ein repräsentativer Immunoblot für drei unabhängige Experimente. Humanes β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Um die Funktion von Brn3a in Melanomzellen und mögliche Effekte einer Brn3a-Hemmung untersuchen zu können, wurden basierend auf den Algorithmen von Reynolds [86] und Uitei [87] spezifische siRNAs für verschiedene Sequenzabschnitte der Brn3a-mRNA entworfen und hergestellt. Diese wurden in metastatische 1205Lu-Melanomzellen transfiziert und die Effizienz der Brn3a-Hemmung mittels qRT-PCR untersucht. Dabei konnte die Brn3a-mRNA um bis zu 70% bezogen auf Kontroll-Ansätze reduziert werden (Abbildung 6 A). Die Hemmung von Brn3a wurde anschließend auf Proteinebene durch Immunoblotanalyse mit einem Brn3a-spezifischen Antikörper bestätigt. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion des Brn3a-Proteins in beiden Brn3a-siRNA-behandelten Ansätzen (Abbildung 6 B). Um das Risiko von *Off-target*-Effekten, also unspezifischen Effekten von siRNAs, die nicht auf der Hemmung des Zielgens beruhen, zu minimieren, wurden in allen zentralen Experimenten dieser Arbeit zwei verschiedene Brn3a-siRNA-Sequenzen (Brn3a-siRNA 1 und 2) verwendet.

3.2.2 Hemmung von Brn3a verringert die Vitalität von Melanomzellen *in vitro* und reduziert das Tumorwachstum *in vivo*

3.2.2.1 Untersuchungen an Melanomzelllinien *in vitro*

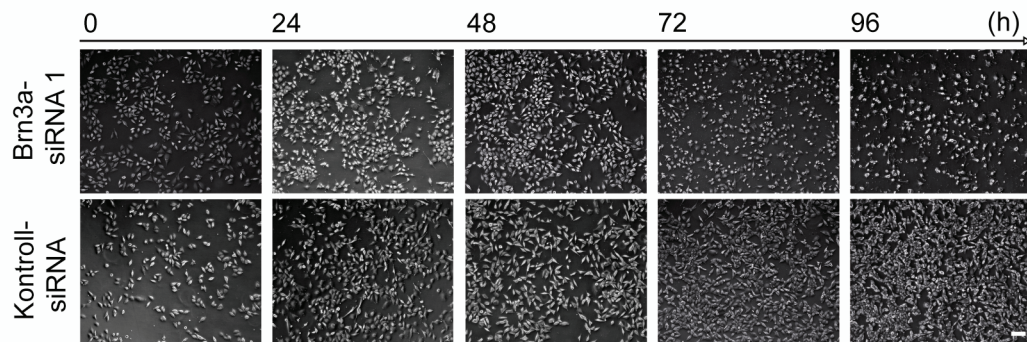
Um Brn3a-gehemmte Melanomzellen auf mögliche phänotypische Veränderungen zu untersuchen, wurden 1205Lu-Melanomzellen über einen Zeitraum von 4 Tagen (96h) mit den Brn3a-siRNAs 1 und 2 sowie einer Kontroll-siRNA transfiziert oder unbehandelt kultiviert. Zu Beginn des Experiments (t=0), als auch nach 24, 48, 72 und 96 h wurden die Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet und fotografiert (Abbildung 7 A). In den ersten 48 h konnten keine optischen Unterschiede in der Zellzahl oder der Zellmorphologie von siRNA-behandelten Zellen und Kontroll-Zellen beobachtet werden. Nach 72 h wurde in Brn3a-gehemmten Ansätzen ein vermindertes Wachstum festgestellt, deutlich erkennbar im Vergleich mit dem weitaus dichteren Zellrasen der Kontrollen. Nach insgesamt 96 h waren die Kontroll-Zellen bis zu 90% Konfluenz gewachsen, wohingegen Brn3a-gehemmte Zellen zu großen Teilen von der Oberfläche der Kulturschale abgelöst waren. Verbleibende adhärenente Zellen zeigten starke morphologische Veränderungen im Vergleich zu Kontrollen. Um den Anteil der überlebenden Zellen nach Brn3a-Hemmung zu quantifizieren, wurde die Vitalität verschiedener Melanomzelllinien 96h nach Transfektion mit Brn3a-siRNAs in einem fluoreszenzbasierten Zell-Vitalitäts-Test (Cell Titer Blue™, Promega) analysiert. Dabei wurde in den Zelllinien 1205Lu und WM1158 eine Reduktion der überlebenden Zellen um bis zu 80% festgestellt, in der Zelllinie WM1232 eine Reduktion um bis zu 50% (Abbildung 7 B). Versuche mit der Brn3a-negativen Zelllinie WM3211 und primären Melanozyten ergaben nach gleicher Behandlung keine veränderte Vitalität (Abbildung 7 C).

3.2.2.2 Untersuchungen im Mausmodell *in vivo*

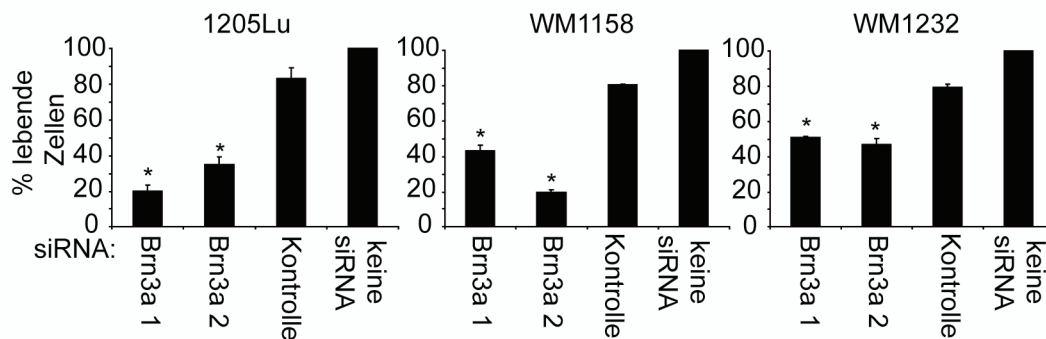
Um den Einfluß der Brn3a-Hemmung auf das Tumorwachstum *in vivo* zu testen, wurden 1205Lu-Melanomzellen subkutan in beide Flanken von 12 athymischen Nacktmäusen injiziert. Nachdem die Tumoren eine tastbare Größe erreicht hatten, wurde dreimal pro Woche mit 10 µg Brn3a-siRNA (n=6 Tiere) oder Kontroll-siRNA (n=6 Tiere) therapiert. Hierfür wurden Brn3a-siRNA und Kontroll-siRNA mit PEI (Polyethylenimin) F25-LMW nach Werth et al. komplexiert und intraperitoneal injiziert (Abbildung 8 A) [92]. Das Tumorwachstum wurde zu den Zeitpunkten der siRNA-Gabe gemessen. Am Tag 29, 18 h nach der letzten siRNA-Gabe wurden die Tiere getötet und die entnommenen Tumoren analysiert. Die Vermessung

der Tumoren ergab wie in Abbildung 8 B gezeigt eine statistisch signifikante ($p=0,0078$) Verminderung des Tumorwachstums bei Brn3a-siRNA-behandelten Tieren.

A



B



C

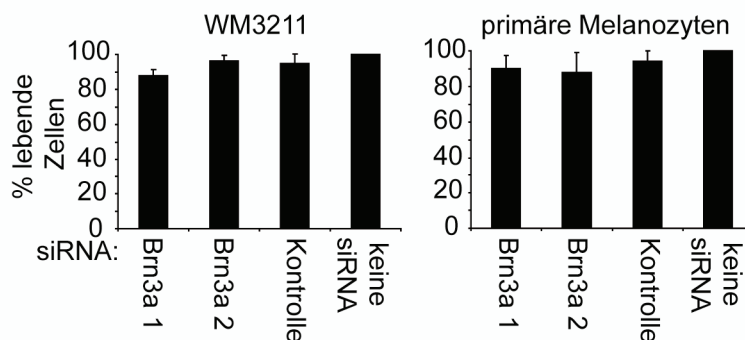


Abbildung 7: Hemmung von Brn3a reduziert die Vitalität von Melanomzellen

(A) Mikroskopische Untersuchungen an Melanomzellen 1205Lu-Melanomzellen wurden mit Brn3a-siRNA oder Kontroll-siRNA behandelt und im Zeitverlauf von 0 bis 96 h nach Transfektion fotografiert. Gleiche Zellzahlen wurden zu Beginn des Experiments ausgesäht und zum Zeitpunkt $t=0$ transfiziert. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μm .

(B) Untersuchung der Zellvitalität nach Brn3a-Hemmung 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert, und ihre Vitalität 96 h nach Transfektion analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. * bezeichnen einen signifikanten Unterschied zu Kontroll-siRNA-behandelten Ansätzen.

(C) Transfektion von Brn3a-siRNAs beeinträchtigt nicht die Vitalität von Brn3a-negativen Melanomzellen Brn3a-negative WM3211-Melanomzellen und primäre Melanozyten von drei verschiedenen Spendern wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und der Anteil der vitalen Zellen 96 h nach Transfektion ermittelt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Tumorgroße war verglichen mit Kontroll-siRNA-behandelten Tieren um ca. 40% reduziert (Abbildung 8 B). Der Nachweis der Brn3a-Hemmung *in vivo* wurde durch qRT-PCR aus der

aus den Tumoren isolierten mRNA durchgeführt. Es ergab sich eine Reduktion der Brn3a-mRNA in den Brn3a-siRNA-behandelten Tieren um ca. 50% verglichen mit den Kontroll-Tieren (Abbildung 8 C). Tierzucht, Tumorinokulation und siRNA-Applikation wurden durch die kooperierende Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Achim Aigner, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Phillips-Universität Marburg durchgeführt. Die RNA-Präparation aus den Tumoren als auch die anschließenden Untersuchungen *in vitro* wurden vom Autor durchgeführt.

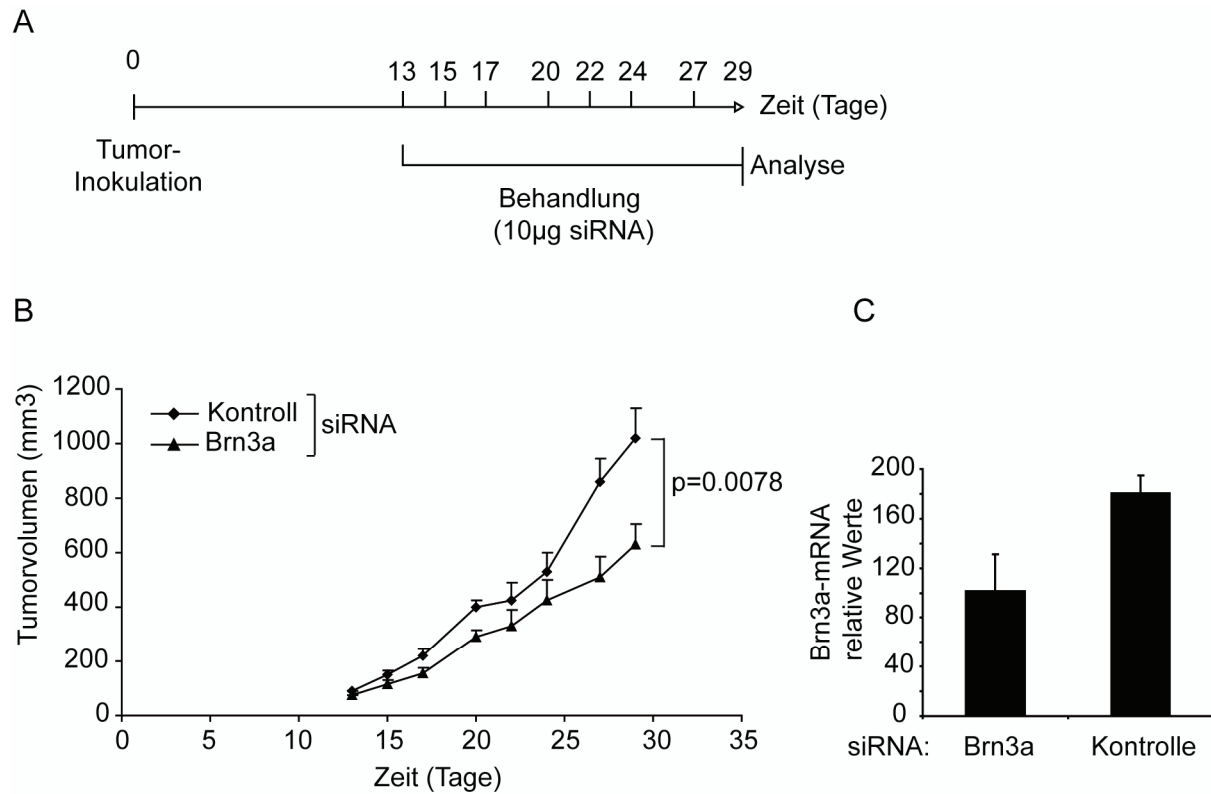


Abbildung 8: Die Hemmung von Brn3a verringert das Tumorwachstum *in vivo*

(A) Versuchsschema Zum Zeitpunkt $t=0$ wurden 1205Lu-Melanomzellen subkutan in beide Flanken von immundefizienten Nacktmäusen injiziert um Tumoren zu inokulieren. Nach Erreichen einer tastbaren Tumorgroße wurde am Tag 13 nach Inokulation mit der Therapie begonnen. Dazu wurden jedem Tier 10 µg in vivo-PEI-komplexierte Brn3a-siRNA (n=6 Tiere) oder Kontroll-siRNA (n=6 Tiere) intraperitoneal verabreicht. 18 h nach der letzten Gabe am Tag 29 nach Inokulation wurden die Tiere getötet und die Tumoren entnommen.

(B) Messung des Tumolvolumens An den Tagen der Behandlung wurden die Tumoren nach Länge, Breite und Tiefe vermessen und das Tumolvolumen berechnet. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war mit $p=0,0078$ signifikant (Wilcoxon-Test).

(C) Analyse der Hemmeffizienz der Brn3a-siRNA *in vivo* Aus den entnommenen Tumoren wurde RNA isoliert und die Hemmung von Brn3a durch qRT-PCR untersucht. Gezeigt sind Mittelwerte aus 2 Tumoren pro Tier, 6 Tiere pro Gruppe mit Standardfehler (SEM).

Diese Ergebnisse weisen auf eine essentielle Funktion von Brn3a in den Melanomzellen hin, da eine Inhibition dieses Faktors das Überleben der Tumorzellen *in vitro* deutlich beeinträchtigte und das Tumorwachstum *in vivo* signifikant reduzierte. Im nächsten Teil

dieser Arbeit sind nun die Effekte der Brn3a-Hemmung auf molekularer Ebene, die zu Reduktion von Vitalität und Tumorwachstums führten, dargestellt.

3.2.3 Brn3a fördert die Proliferation und das Überleben von Melanomzellen

3.2.3.1 Hemmung von Brn3a induziert einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase

Um Gründe für die deutlich verringerte Überlebensfähigkeit von Brn3a-gehemmten Melanomzellen zu finden, wurde zu festgelegten Zeitpunkten der DNA-Gehalt dieser Zellen mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dabei können nach Färbung mit Propidiumiodid (PI) Zellen mit einfachem Chromosomensatz von Zellen mit doppeltem Chromosomensatz oder von Zellen in der Synthese-Phase (Phase der DNA-Replikation) quantitativ unterschieden werden.

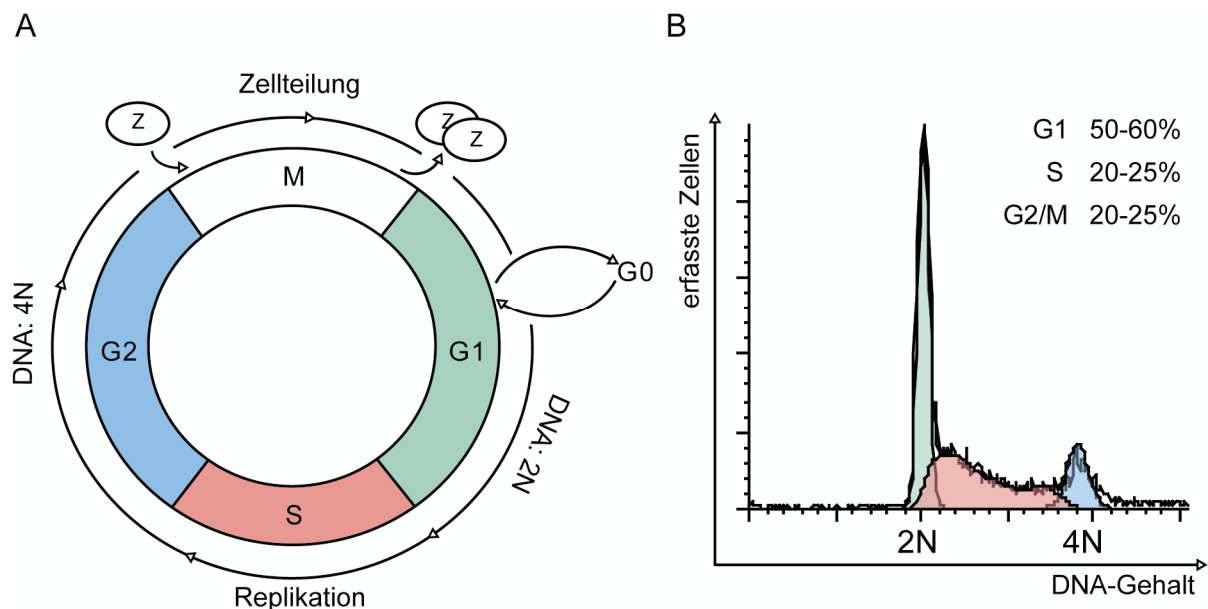


Abbildung 9: Zellzyklusanalyse

(A) Schematischer Ablauf des eukaryotischen Zellzyklus In der postmitotischen Gap1(G1)-Phase wächst die Zelle (Z) und bereitet sich auf die DNA-Replikation vor. Ausdifferenzierte oder nicht mehr teilungsfähige Zellen können in der G1-Phase verbleiben, diese wird dann als G0-Phase bezeichnet. In der Synthese (S)-Phase wird die DNA repliziert und in der darauf folgenden Gap2 (G2)-Phase die Mitose vorbereitet. In dieser prämitotischen Phase löst sich die Zelle vom Zellverbund und rundet sich ab. Es folgt die mitotische Zellteilung (M).

(B) Zellzyklusanalyse durch Propidiumiodidfärbung und Durchflusszytometrie (PI-FACS) Durch PI-FACS-Analyse kann die Verteilung einer Zellpopulation auf die verschiedenen Phasen des Zellzyklus anhand des DNA-Gehalts der Zellen analysiert werden. In einer Histogramm-Darstellung ergibt sich dabei ein starkes Signal (Maximum links, grün) für Zellen in der G0- und G1-Phase und ein schwächeres Signal (Maximum rechts, blau) für Zellen in der G2- oder M-Phase. Dazwischen (rot) befinden sich Zellen in der S-Phase des Zellzyklus, die gerade dabei sind, ihre DNA zu replizieren. In 1205Lu-Melanomzellen ergab sich in unbehandelten Ansätzen eine Verteilung von G1: 50-60%, S: 20-25% und G2/M: 20-25%.

In beiden Abbildungen bezeichnet 2N den einfachen Chromosomensatz und 4N den doppelten Chromosomensatz.

Abbildung 9 A zeigt zur Orientierung schematisiert die Phasen des eukaryotischen Zellzyklus. Kurz zusammengefasst tritt die eukaryotische Zelle nach der Teilung in den ersten Teil der Interphase, genannt Gap1 (G1)-Phase ein. Dort enthält sie den einfachen Chromosomensatz (2N). Die Zentriolen teilen sich und die Zelle bereitet sich auf die bevorstehende DNA-Replikation vor. Zellen können aus der G1-Phase in einen Ruhezustand, die G0-Phase, eintreten und von dort stimulusabhängig wieder in den Zellzyklus zurückkehren. In der G0-Phase befinden sich vornehmlich vollständig differenzierte Zelltypen, wie z.B. Nervenzellen oder Erythrozyten, bei denen antiproliferative Signale mitogene Signale überdecken und so die Zellteilung verhindern. In der folgenden Synthese (S)-Phase wird die DNA repliziert. Die Gap2 (G2)-Phase dient der Vorbereitung auf die folgende Mitose und der damit verbundenen Teilung der Zelle. Der Übergang der Zelle von einer Phase des Zellzyklus in die nächste wird über Kontrollpunkte (*checkpoints*) geregelt. In der G1-Phase beispielsweise wird die DNA auf eventuell vorhandene Schäden überprüft und die Entscheidung getroffen, ob die Zelle in die S-phase eintreten kann, oder nicht. Ist dies nicht der Fall wird der Zellzyklus an dieser Stelle arretiert, um der Zelle Zeit für die Reparatur der geschädigten DNA-Abschnitte zu geben. Nach erfolgreicher Reparatur kann die Zelle in die S-Phase übergehen. Liegen irreparable Schäden vor, wird die Zelle durch Apoptose aus dem Zellverbund entfernt. Abbildung 9 B zeigt beispielhaft das Ergebnis einer FACS-Analyse von PI-gefärbten 1205Lu-Melanomzellen. Typisch für diese Art der Analyse und Darstellung sind die beiden Maxima für die G1-Phase (linkes Maximum, grüne Fläche) und der G2/M-Phase (rechtes Maximum, blaue Fläche) sowie die dazwischen liegende Fraktion der Zellen in S-Phase (rot gefüllte Fläche). Die prozentuale Verteilung der verschiedenen Phasen wurde in unbehandelten und nicht synchronisierten Zellen experimentell ermittelt. Für die Berechnung des prozentualen Anteils wird die den Maxima zugrunde liegende Fläche verwendet. Abbildung 10 zeigt in einem Zeitverlauf von 0 bis 72 h nach siRNA-Transfektion den DNA-Gehalt von Brn3a-gehemmten Zellen und Kontroll-Ansätzen. Zwei deutliche Veränderungen in den Brn3a-gehemmten Zellen konnten in diesem Experiment beobachtet werden: Zum einen zeigte sich eine Reduktion von Zellen der S- und G2/M-Phase 48 h nach Transfektion (Abbildung 10, grüne Pfeile). Parallel zu dieser Beobachtung wurde ein Anstieg an Zellen in der G1-Phase gemessen. Dies weist auf einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase hin. Zum anderen war das Auftreten einer sub-G1-Population 72 h nach Transfektion (Abbildung 10, roter Pfeil) auffällig. Diese entsteht typischerweise durch die PI-Färbung von DNA-Fragmenten, die im Zuge des programmierten Zelltods, der Apoptose, entstehen können.

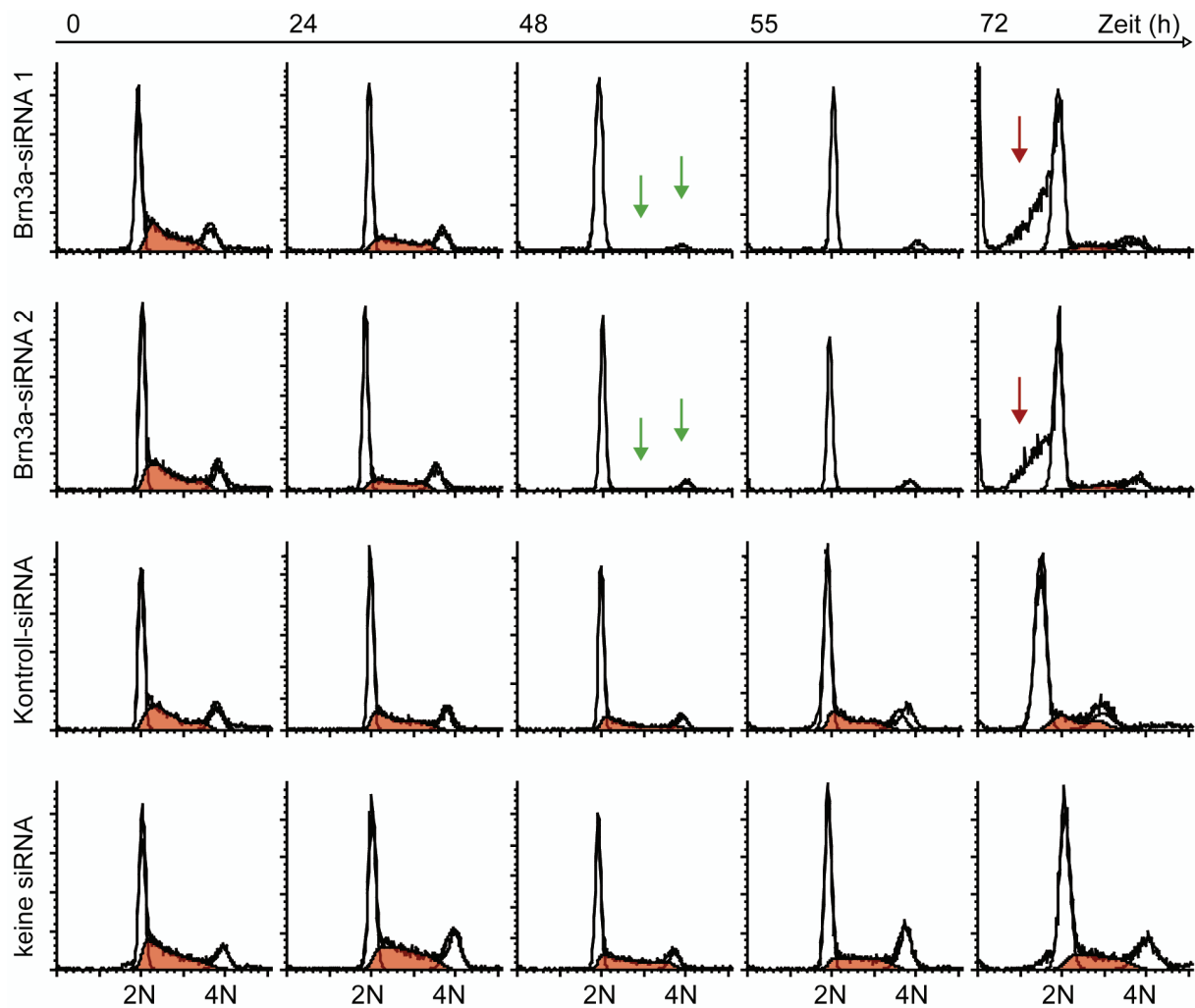
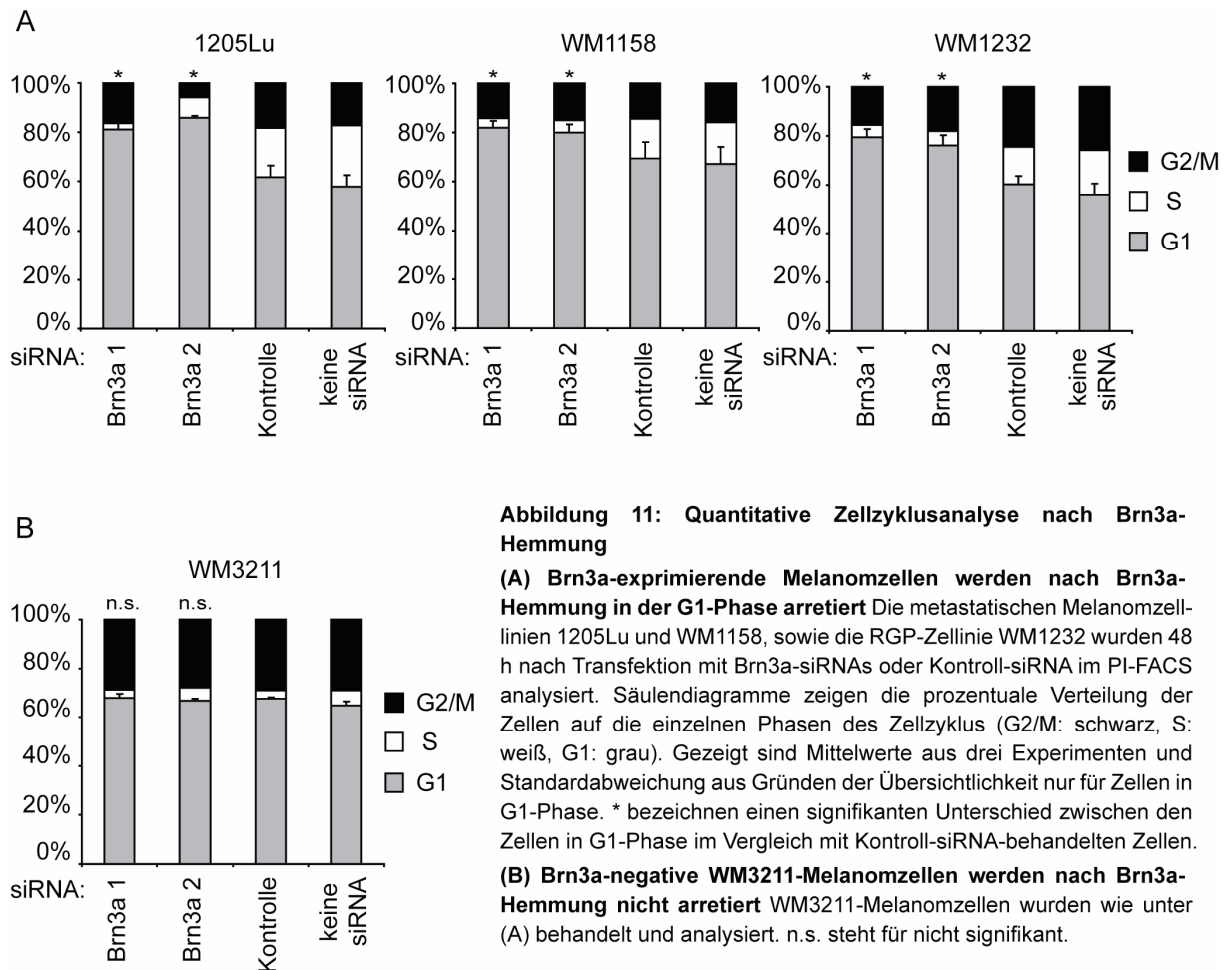


Abbildung 10: Die Hemmung von Brn3a führt zu einem Arrest in der G1-Phase

1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und vor Transfektion sowie 24, 48, 55 und 72 h nach Transfektion im PI-FACS analysiert. Grüne Pfeile zeigen die Abwesenheit von Zellen in S-Phase 48 h nach Brn3a-Hemmung, rote Pfeile das Auftreten einer sub-G1-Population von Zellen 72 h nach Hemmung von Brn3a. Gezeigt ist eine Histogrammanalyse repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Der beobachtete Zellzyklusarrest in der G1-Phase wurde in weiteren Melanomzelllinien bestätigt. Abbildung 11 A zeigt die prozentuale Verteilung der Zellen auf die einzelnen Phasen des Zellzyklus. In 1205Lu-, WM1158- und WM1232-Melanomzellen konnte nach Brn3a-Hemmung ein signifikanter Anstieg von Zellen in der G1-Phase beobachtet werden, Zellen in der S-Phase waren dagegen deutlich reduziert. In den Brn3a-negativen WM3211-Zellen zeigte sich diese Veränderung hingegen nicht (Abbildung 11 B).



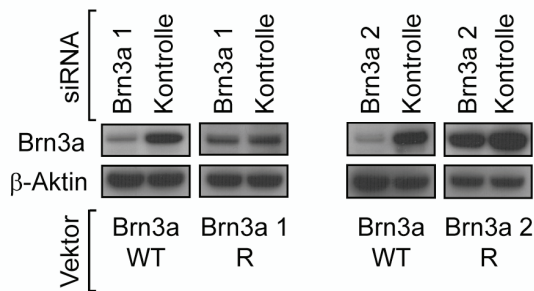
3.2.3.2 Ektopische Expression von mutiertem Brn3a-Protein verhindert den Zellzyklusarrest nach Brn3a-Hemmung

Um sicher zu stellen, dass der beobachtete Zellzyklusarrest auf der Hemmung von Brn3a beruht, wurde folgendes Kontroll-Experiment durchgeführt: Je eine der beiden verwendeten Brn3a-siRNAs wurde entweder zusammen mit einem Brn3a-exprimierenden Plasmid mit Wildtyp-Status (Brn3a WT) oder zusammen mit einem Brn3a-exprimierenden Plasmid mit zwei stillen Punktmutationen in der Bindesequenz der jeweiligen siRNA transfiziert (Brn3a 1 R und Brn3a 2 R). Die Mutationen in der siRNA-Bindesequenz verändern nicht die Funktion des mutierten Brn3a-Proteins, verhindern aber eine effiziente siRNA-Bindung und damit seine Hemmung (Abbildung 12 A). Die Effekte einer Brn3a-Hemmung können so durch diese Mutanten revertiert werden. Das exprimierte Wildtyp-Protein hingegen wird ebenso wie das endogene Brn3a der Melanomzellen gehemmt und kann beobachtete Effekte der Brn3a-Hemmung nicht verhindern. 48 h nach Transfektion wurden mit den in Abbildung 12 B angegebenen siRNAs und Vektoren transfizierte Zellen im Immunoblot analysiert. Dabei zeigte sich, dass die verwendeten siRNAs das ektopisch exprimierte Wildtyp-Brn3a-Protein deutlich reduzierten.

A

	Brn3a 1							Brn3a 2						
siRNA	GC	AAG	AGC	CAU	CCU	UUC	AA	CC	ACG	UAC	CAC	ACG	AUG	AA
mutiertes Brn3a	GC	AAG	AGT	CAC	CCT	TTC	AA	CC	ACG	TAT	CAT	ACG	ATG	AA
AS		Lys	Ser	His	Pro	Phe			Thr	Tyr	His	Thr	Met	
AS-Position		73	74	75	76	77			82	83	84	85	86	

B



C

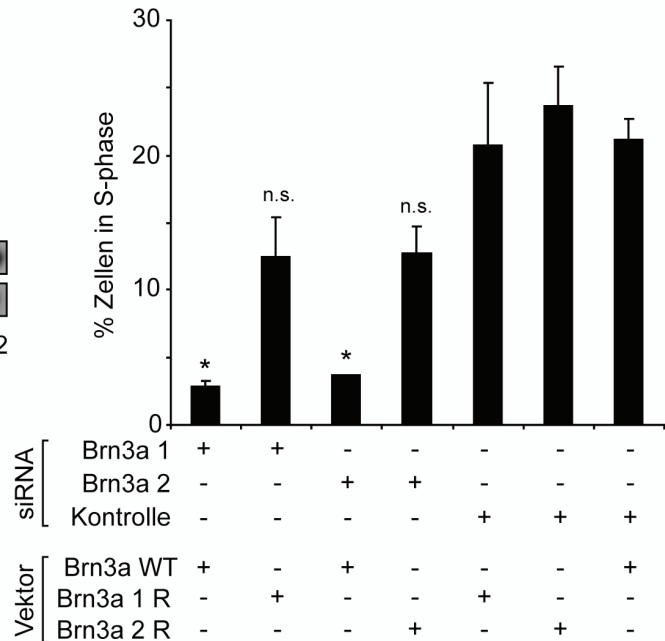


Abbildung 12: Ektopische Expression von Brn3a-Protein verhindert den Zellzyklusarrest nach Brn3a-Hemmung

(A) Änderungen in der Basenabfolge in den siRNA-Bindestellen von Brn3a siRNA 1 und Brn3a siRNA 2 Für Rescue-Experimente wurden je zwei Basen der Bindestellen von Brn3a siRNA 1 und Brn3a siRNA 2 durch gerichtete Mutagenese verändert und so die Rescue-Vektoren Brn3a 1 R und Brn3a 2 R generiert. Diese zentralen *Mismatches* verhindern eine effiziente Bindung der jeweiligen siRNA und damit die Hemmung von mutiertem Brn3a. Keine der Veränderungen führte dabei zu einer Änderung der Aminosäuresequenz von Brn3a.

(B) Untersuchung der Brn3a-Hemmung im Immunoblot 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen Vektoren und 24 h später mit den angegebenen siRNAs transfiziert. Nach weiteren 48 h wurde die Hemmung von Brn3a im Immunoblot untersucht. Humanes β-Aktin diente als Ladekontrolle. WT: Wildtyp, R: Rescue. Immunoblots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

(C) Zellzyklusanalyse: Zellen in der S-Phase 1205Lu-Melanomzellen wurden wie oben beschrieben behandelt und ihr Zellzyklus mittels PI-FACS-Analyse untersucht. * bezeichnen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu allen Kontroll-siRNA-behandelten Ansätzen. In mit n.s. gekennzeichneten Ansätzen ist dieser Unterschied nicht signifikant. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

In der Kombination mit den mutierten Brn3a-Vektoren wurde eine nur sehr geringe Reduktion des Brn3a-Proteins beobachtet (Abbildung 12 B). Um die Hemmung von Brn3a als die Ursache für den beobachteten Zellzyklusarrest zu bestätigen, wurde der DNA-Gehalt von wie oben beschrieben behandelten Zellen durch PI-FACS-Analyse untersucht. Abbildung 12 C zeigt den prozentualen Anteil von Zellen in der S-Phase nach Transfektion mit Brn3a-siRNAs oder Kontroll-siRNA in Kombination mit den Vektoren für Wildtyp-Brn3a und

mutiertem Brn3a-Protein. Wurden Brn3a-siRNAs zusammen mit Brn3a WT transfiziert, zeigte sich der schon beobachtete Zellzyklusarrest in der G1-Phase. Hier befanden sich nur noch bis zu 4% der Zellen in der S-Phase. Wurden die Brn3a-siRNAs zusammen mit den entsprechenden mutierten Vektoren transfiziert, wurden bis zu 15% Zellen in S-Phase gemessen. Der Zellzyklusarrest wurde durch Expression der mutierten Brn3a-Varianten also teilweise aufgehoben. Dies zeigt, dass die Reduktion von Brn3a tatsächlich für den Zellzyklusarrest verantwortlich ist, und schließt andere, unspezifische Effekte der verwendeten siRNAs auf den Zellzyklus weitgehend aus. Die nicht vollständige Aufhebung des Zellzyklusarrests (15% statt 22% in Kontrollen) könnte auf einer unvollständigen Aufhebung der Brn3a-Hemmung beruhen.

In weiteren Experimenten wurde anschließend die zweite biologische Folge der Brn3a-Hemmung, die Induktion von Apoptose, näher untersucht.

3.2.4 Hemmung von Brn3a führt zu mitochondrialer Apoptose

3.2.4.1 Intrinsische, mitochondriale Apoptose

Zelltod durch Apoptose ermöglicht dem Organismus die Integrität und Funktionalität von Geweben und Organen aufrecht zu erhalten, sich überschüssigem Zellmaterial oder beschädigter Zellen zu entledigen, sowie die Gesamtzellzahl des Körpers konstant zu halten. Im Zuge der embryonalen Entwicklung sorgt die Apoptose beispielsweise für den Abbau von Gewebe zwischen Fingern und Zehen. Virusinfizierte Zellen, Zellen, deren Erbgut nachhaltig geschädigt ist oder anderweitig unter starkem Stress stehende Zellen können durch Apoptose eliminiert werden, ohne das umliegende Gewebe zu schädigen. Im Gegensatz zur Nekrose kommt es zur gezielten Phagozytose der apoptotischen Zellen und damit in der Regel nicht zum Kontakt von zytoplasmatischem Material mit dem übrigen Zellverbund. Entzündliche Reaktionen im umliegenden Gewebe werden so verhindert. Das durch die Apoptose gesteuerte Prinzip der Gewebemöostase sorgt für eine konstante Zellzahl des ausgewachsenen Organismus. Kommt es zu einer Veränderung des Gleichgewichts zwischen sich teilenden und zu eliminierenden Zellen, können Krebserkrankungen entstehen [1]. Tumorzellen zeigen eine erhöhte Resistenz gegen apoptotische Stimuli, wie sie in der Strahlenbehandlung oder der Behandlung mit Chemotherapeutika eingesetzt werden. Diese Eigenschaft von neoplastischen Zellen stellt somit ein erhebliches Problem in der Behandlung von Krebserkrankungen dar. Daher setzen neue therapeutische Ansätze zur Behandlung von Tumoren neben einer Eingrenzung des Tumorwachstums vor allem auf eine Sensibilisierung der Tumorzellen gegen apoptoseauslösende Stimuli [93]. Apoptose kann in der Zelle über zwei verschiedene Signalwege initiiert werden: über den Rezeptor-

vermittelten, extrinsischen Weg [94, 95] oder über den mitochondrialen, intrinsischen Weg [96, 97].

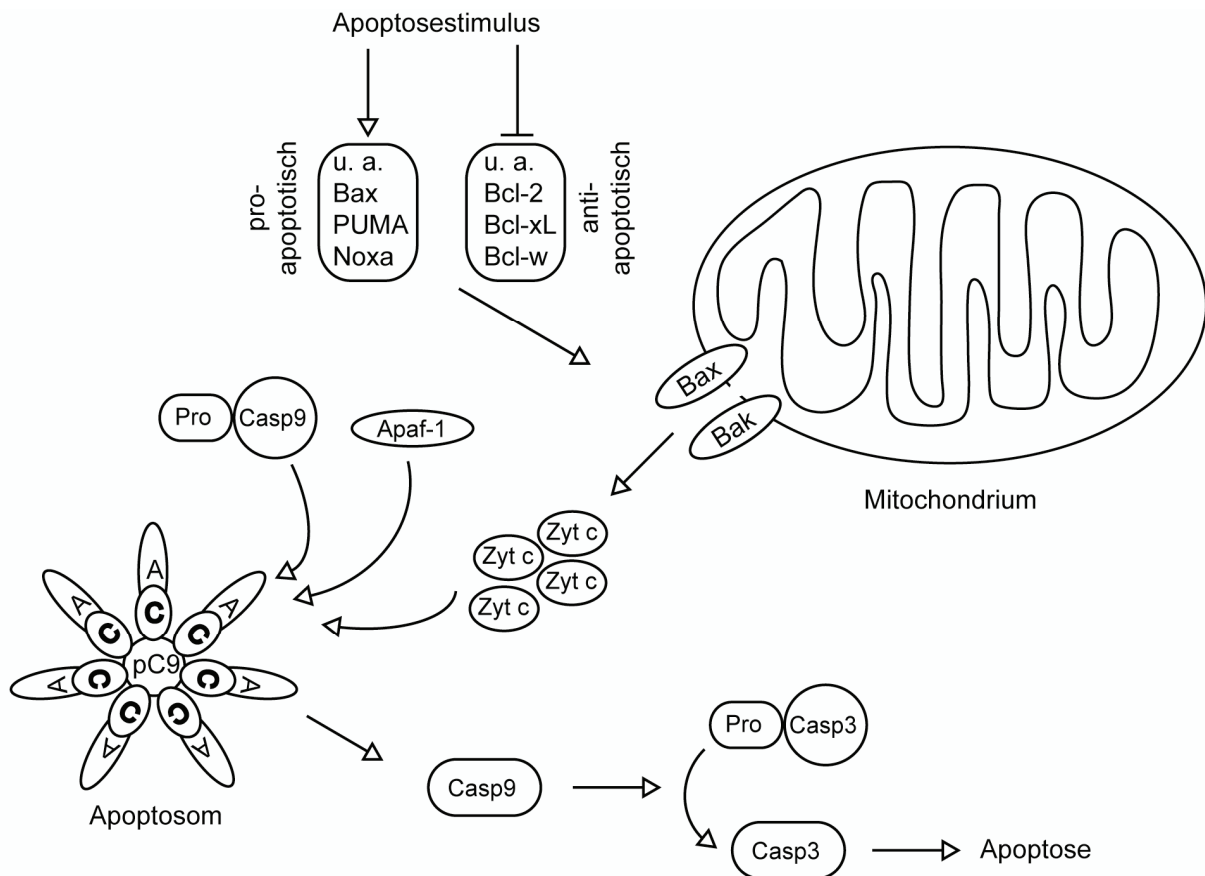


Abbildung 13: Schematische Darstellung des mitochondrialen Apoptosewegs

Apoptosestimuli wie beispielsweise die Erkennung eines viralen Angriffs oder eines irreparablen DNA-Schadens fördern die Expression von proapoptotischen Faktoren, während die von antiapoptotischen Faktoren vermindert wird. Das verstärkt exprimierte Bax wird an das Mitochondrium rekrutiert und bildet dort zusammen mit dem ebenfalls proapoptotischen Faktor Bak Poren, durch die Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum in das Zytosol der Zelle gelangen kann. Dort formiert sich das so genannte Apoptosom aus Cytochrom c (Zyt c, C), dem zytosolischen Adapter Apaf-1 (A) und der Pro-Form von Caspase 9 (Pro Casp9, pC9). Dies hat eine Aktivierung der regulatorischen Caspase 9 zur Folge, die wiederum die Aktivierung der Effektorcaspase 3 und damit den programmierten Zelltod herbeiführt.

Abbildung modifiziert nach Youle und Strasser, 2003

Einleitend zu den folgenden Ergebnissen ist in Abbildung 13 schematisch der mitochondriale Apoptoseweg dargestellt. Mitochondrien verleihen der Zelle die Fähigkeit durch aerobe Atmung Energie zu gewinnen und sind somit für das Überleben essentiell. Im intrinsischen Apoptoseweg tragen sie wesentlich zur Ausführung des apoptotischen Programms bei, indem sie wichtige Komponenten des sogenannten Apoptosoms freisetzen. Regulatoren der mitochondrialen Apoptose sind Moleküle der Bcl-2 Familie [98], die in pro- (Noxa, PUMA, Bax, Bak u.a.) und antiapoptotische (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w u.a.) Untergruppen eingeteilt werden. Erfolgt ein apoptoseauslösender Stimulus werden antiapoptotische Faktoren inaktiviert oder proapoptotische Faktoren aktiviert. Ergebnis ist unter anderem eine Konformationsänderung des proapoptotischen Bax (*Bcl-2-associated X protein*) und seine

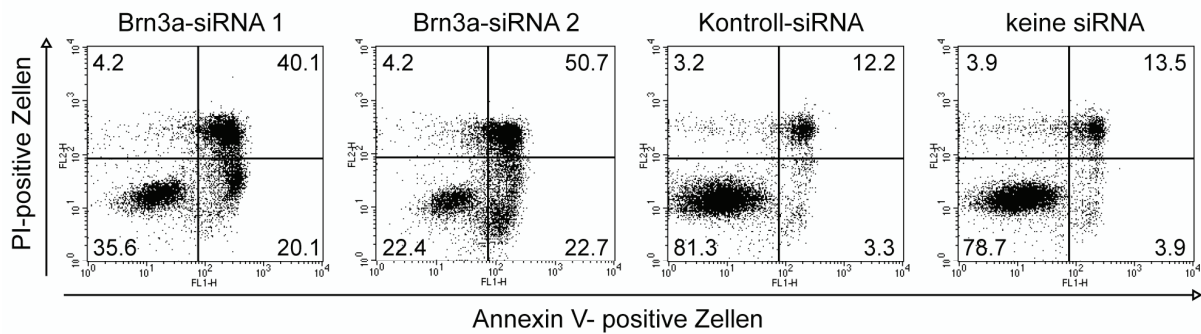
Rekrutierung an das Mitochondrium. Zusammen mit dem proapoptotischen Faktor Bak (*Bcl-2 homologous antagonist/killer*) bildet Bax Poren in der äußeren mitochondrialen Membran, durch welche Zytochrom c aus dem Intermembranraum in das Zytosol austreten kann. Dort formiert sich aus Zytochrom c, dem zytosolischen Adapter Apaf-1 (*apoptotic protease activating factor 1*) und der Proform von Caspase 9 ein Proteinkomplex, das sogenannte Apoptosom. Caspasen sind Cystein-Proteasen, die für die enzymatische Degradation der Zelle sorgen. Sie werden unterteilt in Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen. Die Bildung des Apoptosoms im Zytosol aktiviert die Initiatorcaspase 9, welche die Effektorcaspase 3 proteolytisch spaltet und damit aktiviert. In der Folge werden die für die Apoptose typischen Veränderungen der Zelle, die letztlich zu ihrem Absterben führen, eingeleitet. Dazu gehören unter anderem Schrumpfung und Abrundung der Zelle, ausgelöst durch caspaseabhängigen proteolytischen Verdau des Zytoskeletts, DNA-Fragmentierung sowie Bildung von mikroskopisch gut erkennbaren Bläschen an der Zelloberfläche (*blebbing*). Im Zuge der Membranveränderungen kommt es zu einem charakteristischen Wechsel des Phospholipids Phosphatidylserin (PS) von der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran auf die extrazelluläre Seite [99]. Dieses Signal dient Makrophagen zur Erkennung der apoptotischen Zelle und ermöglicht deren Phagozytose. Praktisch kann es für die Quantifizierung von apoptotischen Zellen genutzt werden, indem man diese durch Zugabe von fluoreszenzmarkiertem Annexin A5 (auch Annexin V, AN) markiert. Annexin V bindet spezifisch an das nun an der Oberfläche verfügbare PS und durch die Fluoreszenzmarkierung können apoptotische Zellen mittels FACS-Analyse quantifiziert werden.

3.2.4.2 Nachweis apoptotischer Zellen nach Hemmung von Brn3a

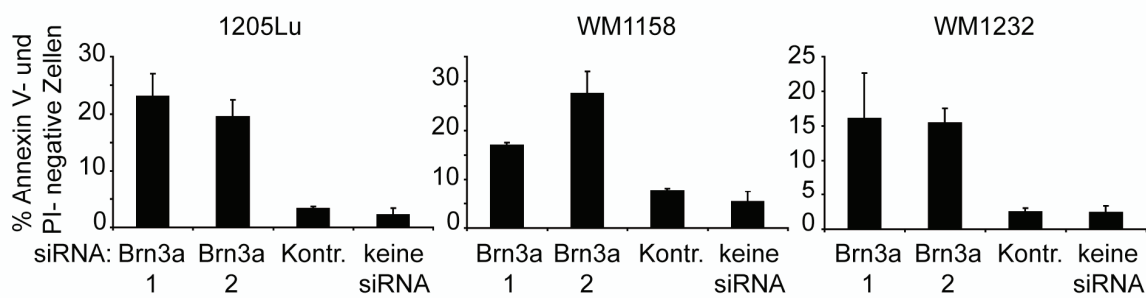
Abbildung 14 A zeigt eine repräsentative Annexin V/PI-FACS-Analyse als Punkt-Histogramm oder *dot plot*. Bei dieser Form der Darstellung sind entlang der X-Achse die AN-positiven Zellen und entlang der Y-Achse die PI-positiven Zellen dargestellt. Jeder Punkt entspricht dabei einer Zelle. Insgesamt wurden pro Bedingung 10.000 Melanomzellen (Brn3a-gehemmt oder Kontrollen) 96 h nach Transfektion analysiert. Deutlich erkennbar ist ein Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen (Quadrant rechts unten) von ca. 3 auf 20% in den Brn3a-gehemmten Ansätzen sowie ein Anstieg toter Zellen im rechten oberen Quadranten (Kontrollen ca. 13% gegen Brn3a-gehemmt ca. 45%). In Abbildung 14 B ist der Prozentsatz apoptotischer Zellen in verschiedenen Melanomzelllinien dargestellt. In den metastatischen Melanomzelllinien 1205Lu und WM1158 wurden 15% bis 30% apoptotische Zellen gemessen, in der RGP-Melanomzelllinie WM1232 wurden bis zu 20% apoptotische Zellen

detektiert. Der Gesamtanteil toter oder in Apoptose befindlicher Zellen ist in Abbildung 14 C dargestellt, wobei nach Brn3a-Hemmung ein Anstieg auf bis zu 80% beobachtet wurde.

A



B



C

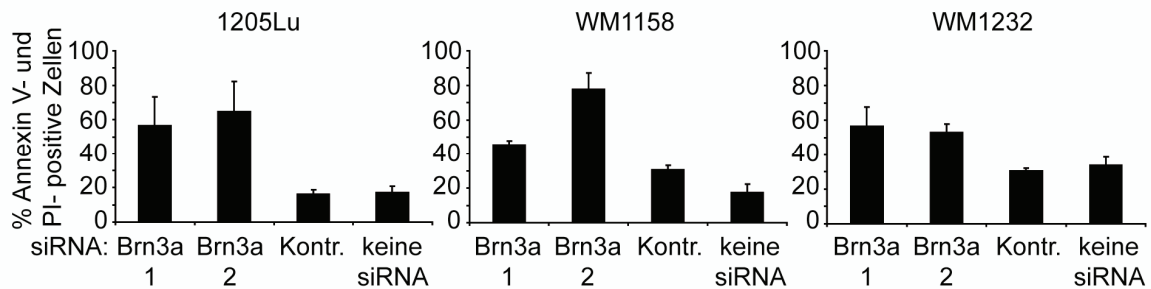


Abbildung 14: Hemmung von Brn3a induziert Apoptose in Melanomzellen

(A) Nachweis von Apoptose durch Annexin V/Propidiumiodid-FACS-Analyse 1205Lu-Melanomzellen wurden mit Brn3a-siRNAs transfiziert (Brn3a siRNA 1 und 2) und nach 4 Tagen (96 h) durchflusszytometrisch analysiert. Zahlen in den einzelnen Quadranten der Diagramme sind repräsentative Prozentangaben der gemessenen Zellen aus einem Experiment (links unten: intakte Zellen, AN- und PI-negativ, rechts unten: apoptotische Zellen, AN-positiv und PI-negativ, rechts oben: tote Zellen, AN- und PI-positiv).

(B) Quantifizierung der AN-positiven und PI-negativen Zellen nach Brn3a-Hemmung in verschiedenen Melanomzelllinien Die Quantifizierung der apoptotischen Zellen (AN-positiv, PI-negativ) erfolgte 96 h nach Transfektion mit den angegebenen siRNAs im AN/PI-FACS.

(C) Quantifizierung der AN- und PI-positiven Zellen nach Brn3a-Hemmung in verschiedenen Melanomzelllinien Die Quantifizierung der sterbenden bzw. toten Zellen (AN-positiv, PI-positiv) erfolgte 96 h nach Transfektion mit den angegebenen siRNAs im AN/PI-FACS.

(B) und (C) zeigen Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

Untersuchungen in der Brn3a-negativen Melanomzelllinie WM3211 ergaben keinen Anstieg der apoptotischen Population nach Transfektion mit Brn3a-siRNAs. Ebenso wenig konnte Apoptose in primären Melanozyten von drei unterschiedlichen Spendern beobachtet werden, die mit Brn3a-siRNAs oder Kontroll-siRNA transfiziert wurden (Abbildung 15).

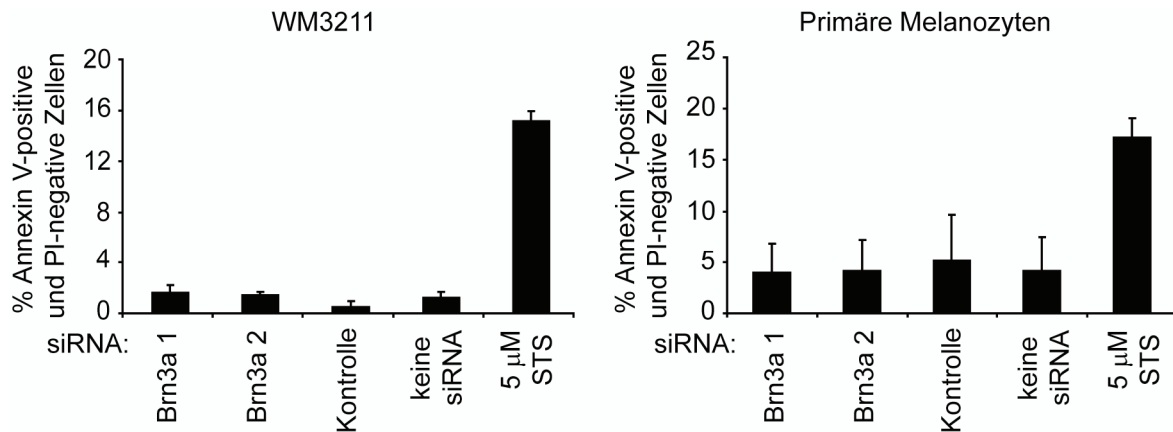


Abbildung 15: Brn3a-negative Zellen zeigen nach Transfektion mit Brn3a-spezifischen siRNAs keine Apoptose

Quantifizierung der Annexin V-positiven Zellpopulationen nach Transfektion von Brn3a-negativen WM3211-Melanomzellen oder primären humanen Melanozyten. Behandlung und Analyse erfolgten analog zu den Versuchen in Abbildung 14. Mit Staurosporin (STS) behandelte Zellen wurden 8 Stunden nach Zugabe von 5 µM STS analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Es wurden primäre humane Melanozyten von drei verschiedenen Spendern verwendet.

3.2.4.3 Darstellung des apoptotischen Mechanismus

Caspasen sind wichtige Faktoren im Ablauf des apoptotischen Programms. Charakteristisch ist dabei die Aktivierung verschiedener Initiatorcaspasen je nach Art des apoptotischen Signalwegs. Während in der rezeptorvermittelten Apoptose Caspase 8 eine wichtige Rolle spielt, wird bei der intrinsischen mitochondrialen Apoptose Caspase 9 durch das Apoptosom aktiviert (siehe Abbildung 13) [93]. In frühen Stadien der Apoptose kann so durch den Nachweis der Caspaseaktivierung eine Unterscheidung zwischen rezeptorvermittelter und mitochondrialer Apoptose getroffen werden. Abbildung 16 A zeigt den Nachweis der Aktivierung von Initiatorcaspasen und Effektorcaspasen durch deren proteolytische Spaltung 72 h nach Brn3a-Hemmung im Immunoblot. Es zeigte sich eine deutliche Aktivierung von Caspase 9, assoziiert mit mitochondrialer Apoptose. Caspase 8 konnte hingegen nur in ihrer Pro-Form, also in inaktivem Zustand, nachgewiesen werden. Als weiterer Nachweis des apoptotischen Phänotyps konnte die Aktivierung der Effektorcaspase 3 gezeigt werden. Ein weiteres wichtiges Charakteristikum der mitochondrialen Apoptose ist die Freisetzung von Zytochrom c aus dem Intermembranraum zwischen äußerer und innerer Mitochondrienmembran durch Bax/Bak-vermittelte Porenbildung. Abbildung 16 B zeigt im Zeitverlauf die vermehrte Anwesenheit von Zytochrom c im Zytosol 72 h nach Brn3a-Hemmung. In Kontroll-Zellen kam es dagegen zu keiner Zytochrom c-Freisetzung. Zahlreiche pro- und antiapoptotische Faktoren befinden sich in der proliferierenden, gesunden Zelle in einem Gleichgewicht, welches die Initiation des programmierten Zelltods steuert. Dieses Gleichgewicht muss streng reguliert sein, um Fehlentscheidungen mit

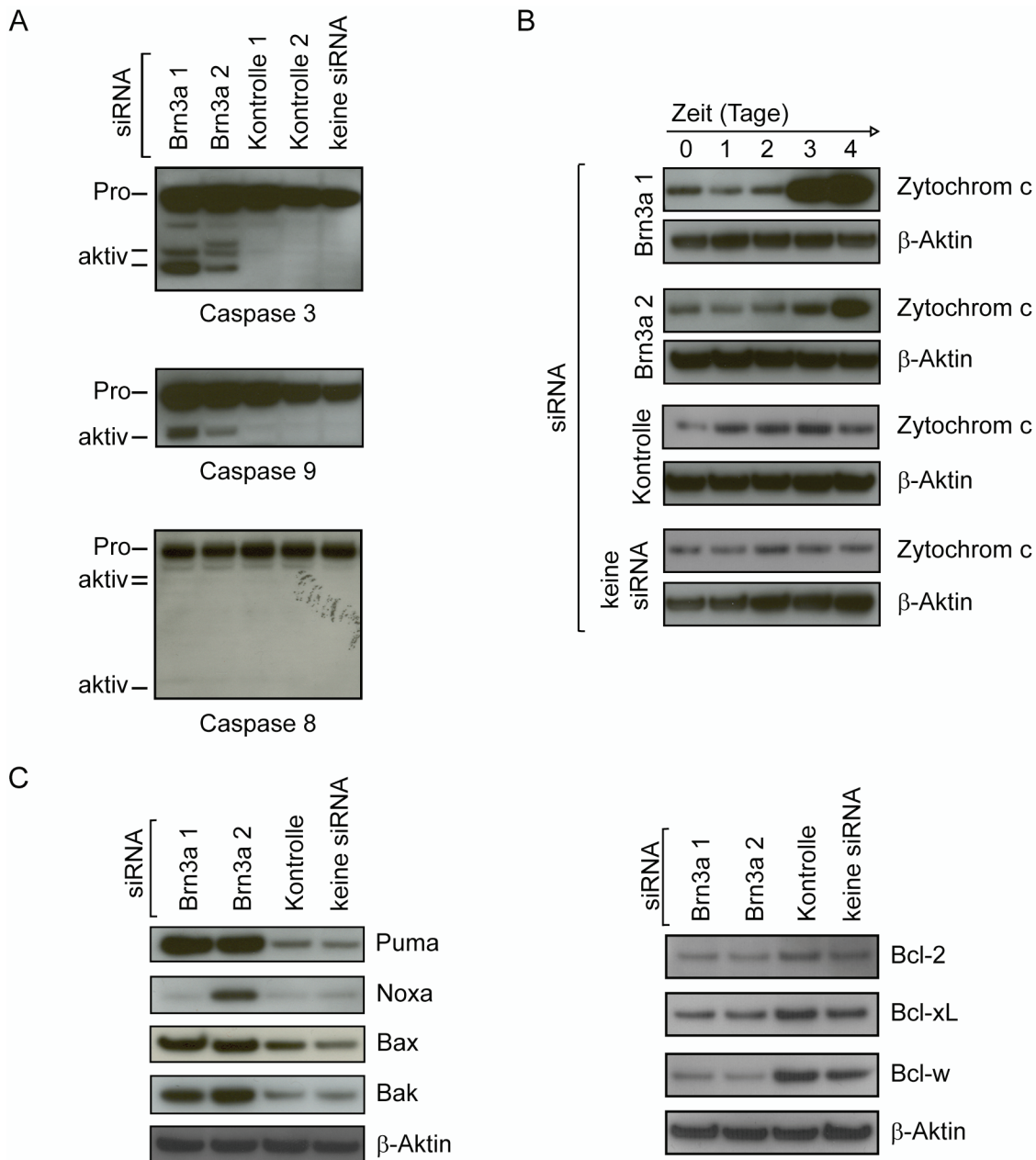


Abbildung 16: Aktivierung des mitochondrialen Apoptosewegs nach Brn3a-Hemmung

(A) Analyse des Aktivierungszustands von Caspasen nach Hemmung von Brn3a 1205Lu-Melanomzellen wurden mit Brn3a-siRNAs transfiziert und 72 h nach Transfektion im Immunoblot analysiert. Es wurden Antikörper verwendet, die sowohl die inaktive Pro-Form (Pro) der Caspasen als auch die durch proteolytische Spaltung entstehenden, prozessierten Fragmente der Caspasen (aktiv), die auf eine Aktivierung des Moleküls hinweisen, detektieren können.

(B) Analyse der Zytochrom c-Freisetzung aus Mitochondrien im Zuge der mitochondrialen Apoptose 1205Lu-Melanomzellen wurden zum Zeitpunkt t=0 mit den angegebenen siRNAs transfiziert. Zu den Zeitpunkten t=0, 1, 2, 3 und 4 Tagen wurden Zellen geerntet und Mitochondrien von der zytosolischen Fraktion getrennt. Zytosolische Überstände wurden im Immunoblot mit einem Zytochrom c-spezifischen Antikörper analysiert. Humanes β-Aktin diente als Ladekontrolle.

(C) Analyse pro- und antiapoptotischer Faktoren im Immunoblot nach Hemmung von Brn3a 1205Lu-Melanomzellen wurden mit Brn3a-spezifischen siRNAs transfiziert und 72 h nach Transfektion im Immunoblot analysiert. Immunoblots auf der linken Seite zeigen dabei die Aktivierung proapoptotischer Faktoren, Immunoblots auf der rechten Seite die verminderte Expression von antiapoptotischen Faktoren nach Hemmung von Brn3a. Humanes β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Alle gezeigten Immunoblots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

drastischem Ausgang zu vermeiden. Abbildung 16 C zeigt links die Deregulation der antiapoptotischen Vertreter der Bcl-2-Familie Bcl-2, Bcl-xL und Bcl-w (*BCL2-like 2*). Diese für die Apoptoseregulation wichtigen Bcl-2-Faktoren waren 72 h nach Brn3a-Hemmung in ihrer Expression deutlich reduziert. Im Gegensatz dazu zeigt Abbildung 16 C rechts proapoptotische Faktoren der Bcl-2-Familie, deren erhöhte Expression ebenfalls 72 h nach Brn3a-Hemmung nachgewiesen wurde.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse deutlich, dass Brn3a eng mit der Proliferation und dem Überleben von Melanomzellen assoziiert ist. Die Hemmung von Brn3a führte zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase gefolgt von der Induktion mitochondrialer Apoptose und dem daraus resultierenden Absterben der Tumorzellen. Während für die antiapoptotischen Faktoren Bcl-2 und Bcl-xL eine direkte Regulation durch Brn3a beschrieben ist, sind viele der hier deregulierten proapoptotischen Faktoren mögliche Zielgene des Tumorsuppressors p53. Dieses Molekül wurde sowohl als Zellzyklus- als auch als Apoptoseregulator beschrieben, so dass eine Verbindung zu den hier beobachteten biologischen Effekten der Brn3a-Hemmung sehr wahrscheinlich war. In den folgenden Experimenten wurde daher der Tumorsuppressor p53 genauer untersucht, um den Mechanismus aufzuklären, der zu Zellzyklusarrest und Apoptose nach Brn3a-Hemmung führt.

3.2.5 Hemmung von Brn3a aktiviert den Tumorsuppressor p53 in Melanomzellen

3.2.5.1 Der Tumorsuppressor p53

Onkogene fördern das Zellwachstum und sind essentiell für den natürlichen Grundumsatz an Zellen, indem sie an der Eliminierung und der Erneuerung von Zellen des Darmepithels, der Haut oder des Blutes beteiligt sind. Mutationen in Onkogenen können zu einer von Wachstumsstimuli unabhängigen, kontinuierlichen Zellteilung führen. Tumorsuppressorgene kontrollieren das Zellwachstum und die Zellteilung ebenso wie den Eintritt in den programmierten Zelltod, die Apoptose [100]. Kommt es zu einer Inaktivierung eines Tumorsuppressors, beginnt die Zelle sich unkontrolliert zu teilen, oder reagiert nicht mehr auf apoptoseauslösende Stimuli. Die Kombination aus einer aktivierenden Mutation eines Onkogens und einer Inaktivierung eines Tumorsuppressors ermöglicht die Bildung von Tumoren.

Das 1979 erstmals beschriebene TP53 Gen kodiert für den Tumorsuppressor p53 [101]. Grundlegende Aufgaben dieses Faktors sind die Regulation des Zellzyklus, der Apoptose

sowie der Angiogenese und die Aufrechterhaltung der genetischen Stabilität in der Zelle [102]. Diese für den Organismus überlebenswichtigen Vorgänge werden von p53 über die transkriptionelle Aktivierung und Repression von Zielgenen als auch durch die direkte Protein-Protein-Interaktion mit Ko-Faktoren in der Zelle geregelt. Eine Inaktivierung von p53 wurde in einer Vielzahl von Krebserkrankungen nachgewiesen. Diese kann direkt erfolgen, wie etwa durch Mutationen bedingte Aminosäureänderungen in den für die DNA-Bindung von p53 benötigten Sequenzabschnitten, als auch indirekt [103, 104]. Letzteres beinhaltet unter anderem die Inaktivierung durch Bindung viraler Proteine, die verstärkte Produktion von Faktoren, die den proteasomalen Abbau von p53 fördern, sowie die Translokation von p53 aus dem Nukleus in das Zytoplasma, wo es nicht in seiner Funktion als Transkriptionsfaktor wirken kann [103]. Das p53-Protein liegt in der gesunden Zelle im inaktiven Zustand vor und wird nur bei Stress oder Schädigung der Zelle aktiviert. Zellen mit veränderter DNA oder Zellzyklus-Kontrolle können über die Aktivierung von p53 in einen Reparaturprozess eintreten oder zum Schutz des Organismus über den Weg der Apoptose beseitigt werden. Dabei gehört das maligne Melanom zu den wenigen Tumoren, in denen p53 nur in seltenen Fällen durch Mutation inaktiviert ist [105, 106]. Eine Aktivierung von p53 mit dem Ziel, einen Zellzyklusarrest oder die Induktion von Apoptose zu erreichen ist daher ein Angriffspunkt vieler therapeutischer Ansätze für diesen Tumor.

In dieser Arbeit führte die Hemmung von Brn3a in Melanomzellen zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase, gefolgt von der Induktion mitochondrialer Apoptose. Da beide Phänotypen durch den Tumorsuppressor p53 reguliert werden können, wurde p53 nach Brn3a-Hemmung in Melanomzellen näher untersucht. Immunoblots in Abbildung 17 A zeigen deutlich erhöhte p53-Proteinmengen in Brn3a-gehemmten Zellen. Um Rückschlüsse auf eine mögliche erhöhte Aktivität des Faktors zu gewinnen wurde ein bekanntes Zielgen von p53, der Zellzyklusregulator p21 ebenfalls im Immunoblot untersucht. Wie für p53 konnte auch für p21 deutlich erhöhte Proteinmenge nach Hemmung von Brn3a nachgewiesen werden (Abbildung 17 A). Wie in Abbildung 17 B gezeigt, resultierte diese aus einer verstärkten Transkription des für p21 kodierenden CDKN1A-Gens. Um die erhöhte Aktivität von p53 nach Hemmung von Brn3a zu bestätigen, wurde in Kernextrakten seine DNA-Bindefähigkeit mittels Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA) untersucht. 48 h nach Brn3a-Hemmung war die DNA-Bindung und damit die Aktivität von p53 als Transkriptionsfaktor verglichen mit Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen signifikant um das 3- bis 5-fache erhöht.

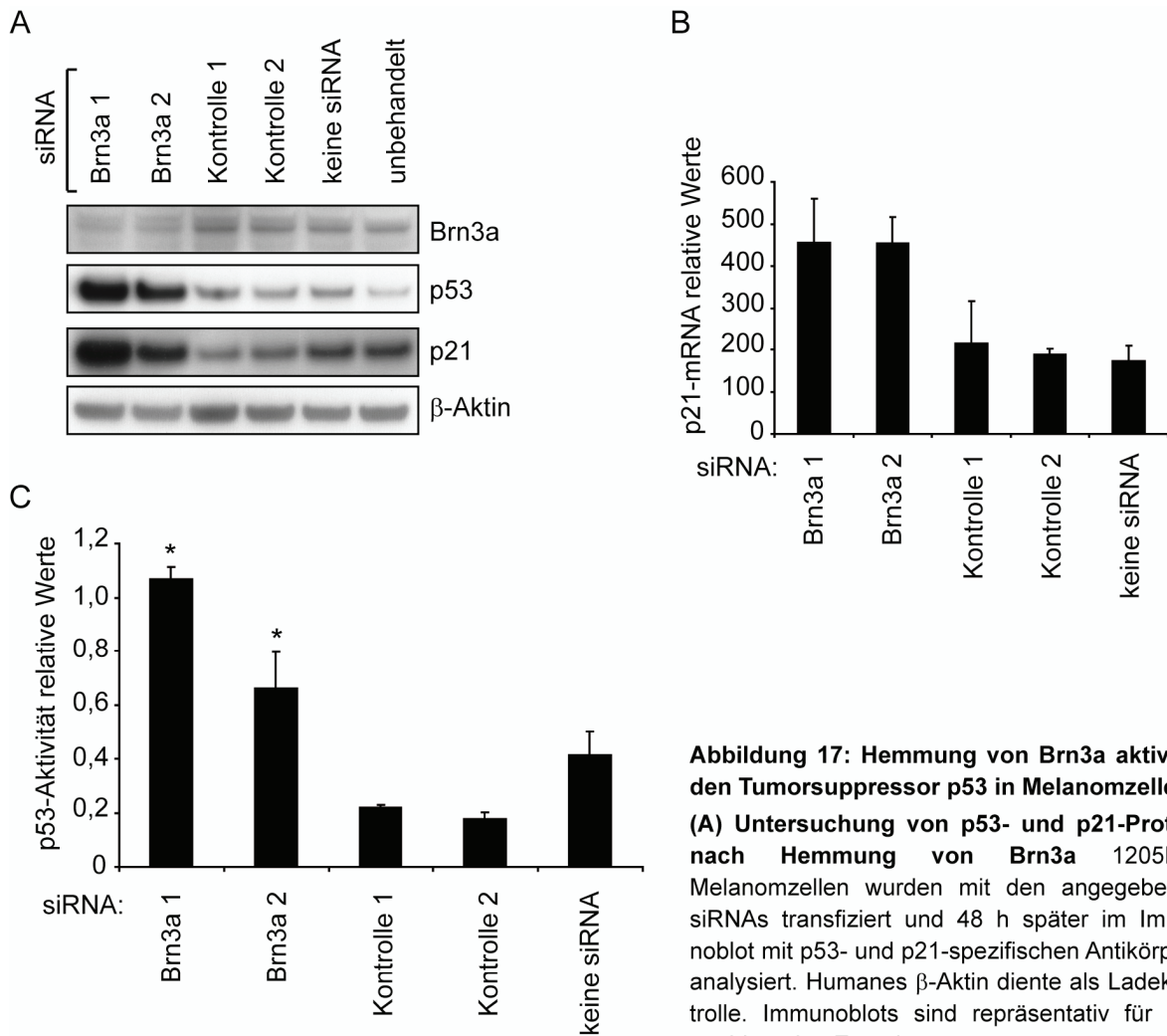


Abbildung 17: Hemmung von Brn3a aktiviert den Tumorsuppressor p53 in Melanomzellen
(A) Untersuchung von p53- und p21-Protein nach Hemmung von Brn3a 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und 48 h später im Immunoblot mit p53- und p21-spezifischen Antikörpern analysiert. Humanes β-Aktin diente als Ladekontrolle. Immunoblots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

(B) Untersuchung von p21-mRNA nach Hemmung von Brn3a 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und 48 h später mittels qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

(C) Nachweis der p53-Aktivierung im ELISA 48 h nach Transfektion von 1205Lu-Melanomzellen mit den angegebenen siRNAs wurden Zellkerne präpariert und nukleäres Protein in einem ELISA für die DNA-Bindung von p53 analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. * bezeichnen einen signifikanten Unterschied im Vergleich mit Kontroll-siRNA-behandelten Zellen.

3.2.5.2 p53 vermittelt den G1-Arrest nach Brn3a-Hemmung

Nach Bestätigung der transkriptionellen Aktivität von p53 in Brn3a-gehemmten Zellen sollte untersucht werden, ob der beobachtete Zellzyklusarrest direkt durch p53 vermittelt wurde. Dazu wurde ein Experiment etabliert, bei dem Brn3a und p53 sowohl allein als auch zusammen durch spezifische siRNAs gehemmt wurden. Abbildung 18 A zeigt sowohl die verstärkte Transkription der p21-mRNA (rechts), als auch den daraus resultierenden Anstieg von p21 Protein im Immunoblot nach alleiniger Brn3a-Hemmung allein (links). Wurde Brn3a zusammen mit p53 durch spezifische siRNAs gehemmt, wurde die Aktivierung von p21 auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene vollständig verhindert. Im nächsten Schritt wurde

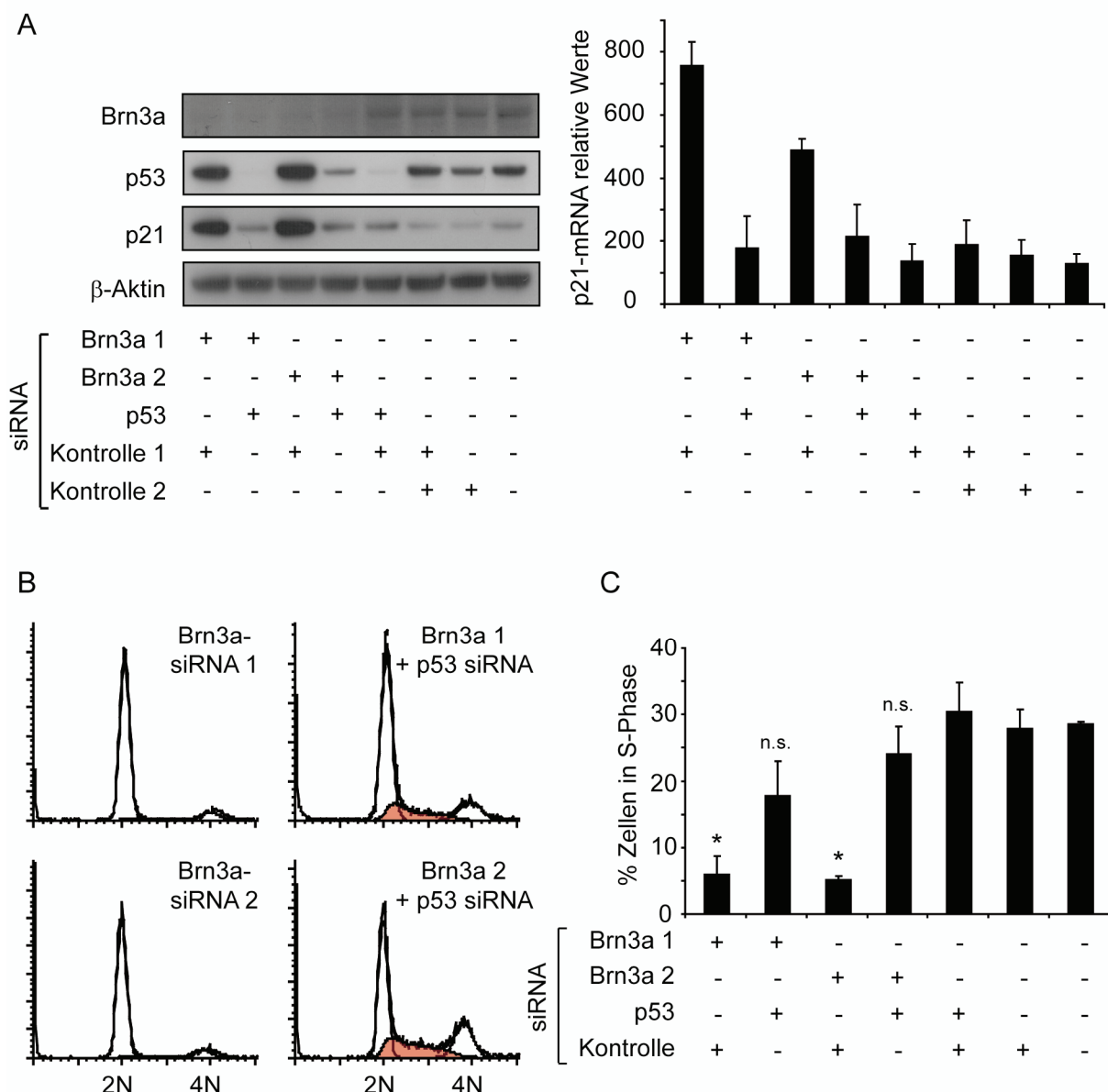


Abbildung 18: Der Zellzyklus-Arrest nach Brn3a-Hemmung ist abhängig von p53

(A) Nachweis der p53-Abhängigkeit der transkriptionellen Aktivierung von p21 nach Hemmung von Brn3a 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und nach 48 h entweder Gesamtzellprotein oder RNA präpariert. In Ansätzen, in denen zwei verschiedene Gene gehemmt wurden, wurde jede siRNA 20 nM eingesetzt. In Ansätzen, in denen nur ein Gen gehemmt wurde, wurde 20 nM spezifische siRNA und 20 nM Kontroll-siRNA eingesetzt. siRNA- und Kontroll-behandelte Zellen wurden mittels Immunoblot und qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind Immunoblots repräsentativ für drei unabhängige Experimente und für RNA-Analysen Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

(B) Zellzyklusanalyse von Brn3a-gehemmten und Brn3a/p53-gehemmten 1205Lu-Melanomzellen 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und nach 48 h im PI-FACS analysiert. Histogramm-Analysen sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

(C) Quantifizierung der Zellen in S-Phase nach Hemmung von Brn3a oder Brn3a/p53-Hemmung Zellen wurden wie unter (B) behandelt und analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. * bezeichnen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Kontroll-siRNA behandelten Ansätzen. n.s. steht für nicht signifikant.

der Zellzyklus von Brn3a- und Brn3a/p53-gehemmten 1205Lu-Melanomzellen mittels PI-FACS-Analyse untersucht. Bei alleiniger Brn3a-Hemmung wurde der oben beschriebene

Arrest in der G1-Phase beobachtet. Wurde zusätzlich zu Brn3a auch p53 gehemmt, wurde dagegen eine weitgehend normale Zellzyklusverteilung festgestellt. Abbildung 18 B zeigt dieses Ergebnis beispielhaft in Histogrammform, Abbildung 18 C den quantifizierten prozentualen Anteil von Zellen in der S-Phase nach Transfektion mit den angegebenen siRNAs. In Brn3a-gehemmten Ansätzen wurden ca. 3-5% der Zellen in S-Phase detektiert, in Kontroll-Ansätzen dagegen 25-30%. Bei der Ko-Inhibition von Brn3a und p53 wurde mit 15-25% Zellen in S-Phase ein annähernd normaler Prozentsatz gemessen. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Hemmung von Brn3a in Melanomzellen zur Aktivierung des Tumorsuppressors p53 führt, und dass dieser Faktor für den beobachteten Zellzyklusarrest nach Brn3a-Hemmung verantwortlich war.

3.2.5.3 p53 wird nach Hemmung von Brn3a auf Proteinebene stabilisiert

Um den Grund für die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 nach der Hemmung von Brn3a zu untersuchen wurde geprüft, ob der Anstieg an p53-Protein auf einer erhöhten Transkription des TP53-Gens beruhte. Wie in Abbildung 19 A dargestellt, hatte die Hemmung von Brn3a keine Auswirkung auf die Quantität von transkribierter p53-mRNA. Da hiermit eine direkte Aktivierung von p53 durch Brn3a als Transkriptionsfaktor ausgeschlossen werden konnte, wurde eine mögliche Stabilisierung von p53 auf Proteinebene untersucht. Hierfür wurden Brn3a-gehemmte Melanomzellen mit dem Translationshemmer Cycloheximid (CHX) behandelt und nach 30 min sowie 1, 2, 4, 6 und 8 h das Gesamtprotein der Zellen im Immunoblot analysiert. Durch die Zugabe von CHX zu den Brn3a-gehemmten und Kontroll-behandelten Zellen wurde die Synthese von neuem p53-Protein gestoppt. In den Brn3a-gehemmten Zellen zeigte sich ein deutlich verlangsamter Abbau des p53-Proteins im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Während die Menge an p53-Protein nach Brn3a-Hemmung bis 4 h nach CHX-Zugabe konstant blieb und erst nach 8 h eine leichte Abnahme beobachtet werden konnte, war dies im Kontroll-siRNA-Ansatz bereits nach 1 h der Fall.

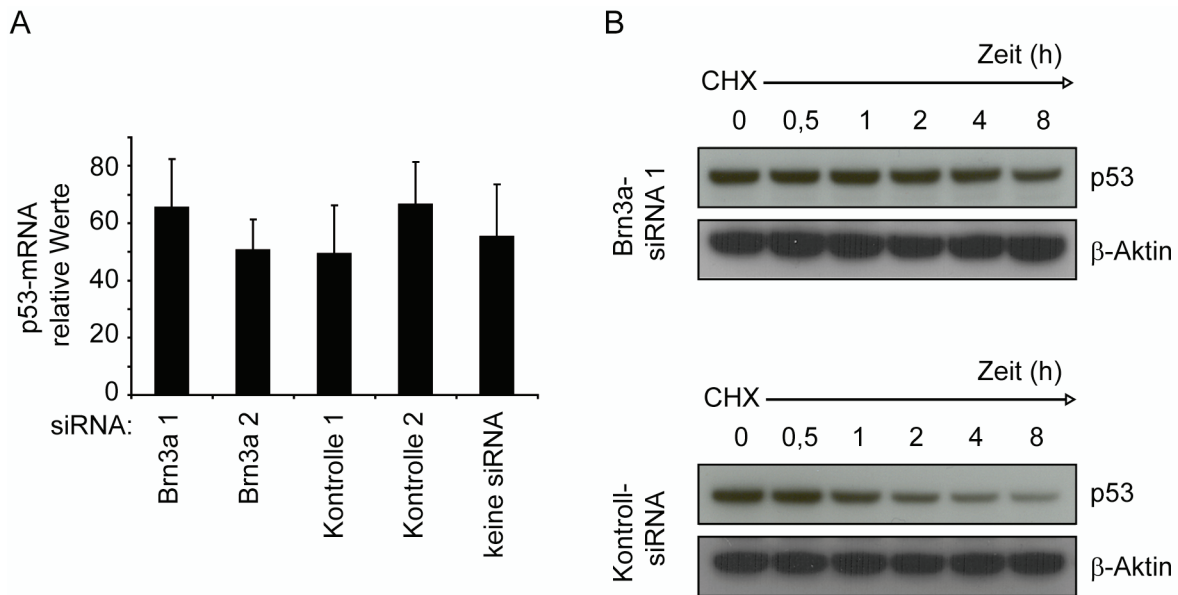


Abbildung 19: p53 wird nach Brn3a-Hemmung auf Proteinebene stabilisiert

(A) Untersuchung der p53-mRNA nach Hemmung von Brn3a 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und 48 h später die p53-mRNA durch qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

(B) Blockade der Proteinsynthese in Brn3a-gehemmten Zellen und Kontroll-Zellen 1205Lu-Melanomzellen wurden mit Brn3a-siRNA 1 oder Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 48 h wurde das Medium gewechselt und zum Zeitpunkt t=0 mit 25 µg/ml Cycloheximid (CHX) versetzt, um die Neusynthese von Proteinen zu verhindern. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben genommen und Protein isoliert. Der Abbau des p53-Proteins wurde im Immunoblot analysiert. Humanes β-Aktin diente als Ladekontrolle. Immunoblots repräsentieren drei unabhängige Experimente.

3.2.5.4 p53 wird durch ein DNA-Schaden-Signal aktiviert

Mögliche Ursache für einen p53-vermittelten Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase ist die Aktivierung des DNA-Schaden-Kontrollpunkts, einer Schaltstelle am Ende der G1-Phase, die die Replikation von geschädigter DNA und ein Voranschreiten des Zellzyklus verhindert. Bereits ein einziger Bruch in der doppelsträngigen DNA der Zelle, beispielsweise durch ionisierende Strahlung, kann zu einer Aktivierung von p53 und in der Folge zu einem Zellzyklusarrest führen [102]. Ausschlaggebend für erhöhte Mengen an p53-Protein ist dabei unter anderem die Modifikation von p53 über Phosphorylierung an einem oder mehreren Serinen des Proteins. Diese Veränderung führt dazu, dass Ubiquitinligasen wie MDM2 das p53-Protein nicht mehr für den proteasomalen Abbau markieren können [107]. Dadurch kommt es zur Stabilisierung des p53-Proteins. Der Weg zur Stabilisierung und Aktivierung von p53 nach DNA-Doppelstrangbrüchen beinhaltet die Aktivierung einer klar definierten Abfolge von Sensoren und Kinasen, die über eine Vielzahl von Spezies konserviert sind [108]. Dazu gehören vor allem der MRN-Komplex, bestehend aus den Faktoren Mre11 (*meiotic recombination 11*), Rad50 und NBS1 (Nibrin), sowie die Kinasen ATM (*ataxia*

telangiectasia mutated) und Chk2 (*checkpoint kinase 2*). Der MRN-Komplex bindet an die durch den Doppelstrangbruch entstandene Lücke in der DNA und rekrutiert die Kinase ATM an den Ort des DNA-Schadens [109]. Es kommt zur Autophosphorylierung von ATM und zur Phosphorylierung von weiteren Kinasen des Signalwegs wie etwa Chk2, um das Schadensignal zu verstärken und weiterzuleiten [110]. Sowohl ATM als auch Chk2 können p53 an verschiedenen Serinen phosphorylieren und so eine MDM2-abhängige Degradation verhindern. Im Zuge der p53-Aktivierung kommt es durch die Funktion des p53-Proteins als Transkriptionsfaktor zur Aktivierung zellzyklusinhibierender Faktoren wie p21 und dem nur in arretierten Zellen möglichen Versuch der Reparatur des DNA-Schadens.

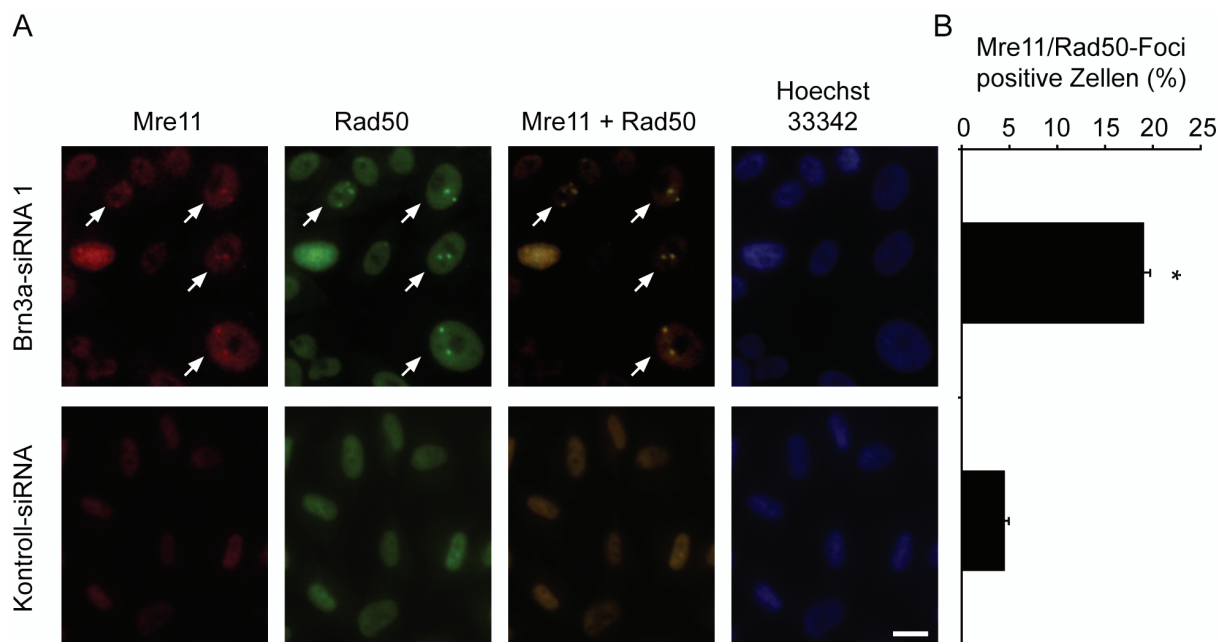


Abbildung 20: p53 wird durch ein DNA-Schaden-Signal aktiviert

(A) Untersuchung von Mre11/Rad50-Foci in Brn3a-gehemmten Zellen und Kontroll-Zellen Mre11/Rad50-beinhaltende Foci wurden 40 h nach Transfektion von 1205Lu-Melanomzellen mit Brn3a-siRNA 1 oder Kontroll-siRNA immunzytochemisch nachgewiesen. Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt.

Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

(B) Quantifizierung von Foci-positiven Zellkernen Die Quantifizierung von Foci-positiven Zellkernen erfolgte mikroskopisch in drei unabhängigen Experimenten. * bezeichnet einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Kontroll-siRNA behandelten Zellen.

Um den Auslöser für die p53-Aktivierung nach Hemmung von Brn3a zu untersuchen, wurden Faktoren des DNA-Schaden-Signalwegs analysiert. Zunächst wurde der Aktivierungszustand wichtiger Komponenten des MRN-Komplexes in Brn3a-gehemmten und mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen immunzytochemisch untersucht. Die Faktoren Mre11 und Rad50 sind in gesunden Zellen nach immunzytochemischer Färbung als diffuses Signal im ganzen Kern sichtbar. Im Fall eines Doppelstrangbruchs der DNA formiert sich der oben genannte MRN-Komplex und bindet an die geschädigte DNA. Dies kann anhand der Ausbildung von Mre11- und Rad50-Foci im Zellkern beobachtet werden [111]. In Brn3a-gehemmten Zellen konnten 40 h nach Transfektion deutlich Mre11- und Rad50-Foci (Abbildung 20 A, Pfeile) in den

Zellkernen beobachtet werden, wohingegen in Kontroll-Ansätzen weiterhin nur ein diffuses Signal im Kern der Zelle sichtbar war. In übereinander gelegten Aufnahmen der Mre11- und Rad50-Färbungen wurde eine deutliche Kolokalisation der beiden Faktoren und damit die Bildung des für das DNA-Schaden-Signal wichtigen MRN-Komplexes nachgewiesen.

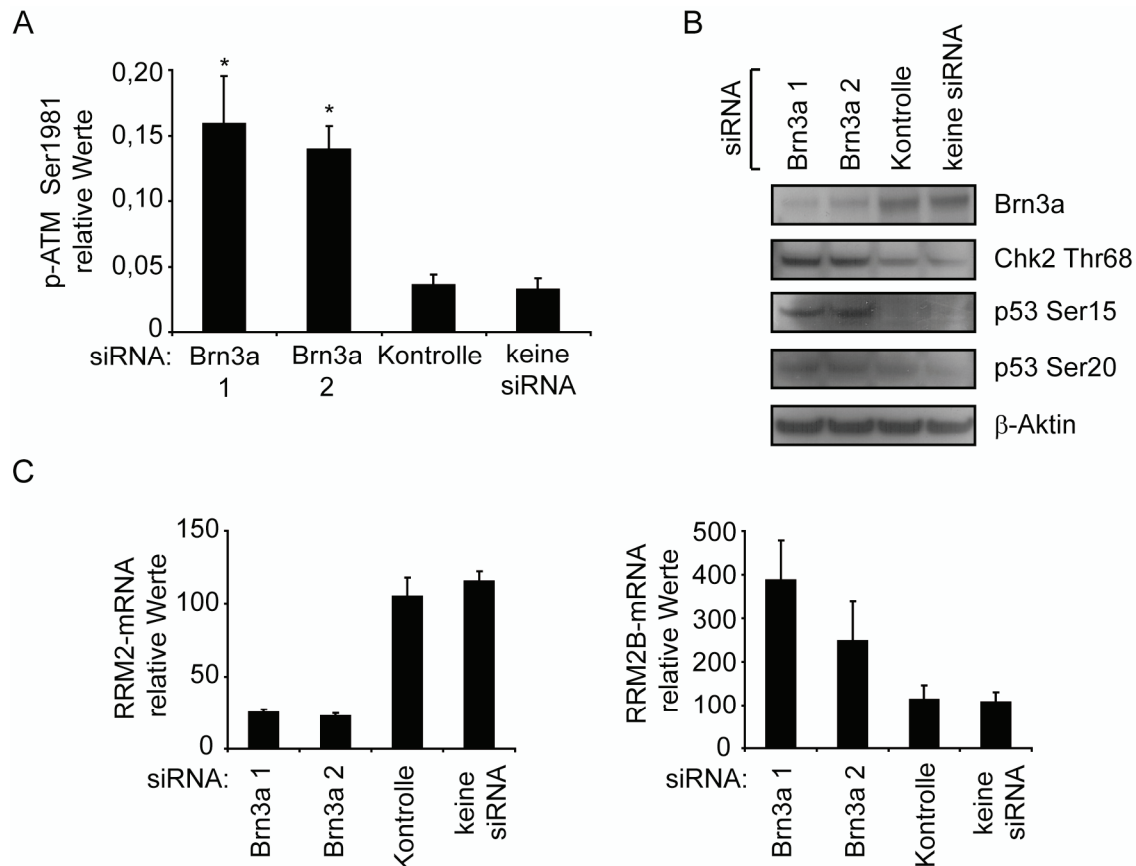


Abbildung 21: p53 wird durch ein DNA-Schadensignal aktiviert, Teil 2

(A) Aktivierung der Kinase *Ataxia telangiectasia mutated* (ATM) 48 h nach Hemmung von Brn3a wurde die Aktivierung von ATM aus Gesamtzellprotein von 1205Lu-Melanomzellen mittels ELISA für die Phosphorylierung von ATM an Serin 1981 nachgewiesen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. * bezeichnen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Kontroll-siRNA-behandelten Ansätzen.

(B) Phosphorylierung von Checkpoint Kinase 2 (Chk2) und p53 an DNA-Schaden-assoziierten Aminosäureresten 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und 48 h später im Immunoblot mit phosphospezifischen Antikörpern für Chk2 und p53 analysiert. Humanes β-Aktin diente als Ladekontrolle. Immunoblots repräsentieren drei unabhängige Experimente.

(C) Veränderte Expression von Ribonukleotid-Reduktasen nach Hemmung von Brn3a 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und 48 h später die mRNA der Ribonukleotid Reduktasen M2 (DNA Synthese) und M2B (DNA Reparatur, p53-abhängig) durch qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Die Färbungen wurden in drei unabhängigen Experimenten wiederholt, und für jede Bedingung (Brn3a-siRNA 1, Kontroll-siRNA und Transfektionsreagenz alleine) ca. 4.500 Zellen auf die Bildung von MRN-Foci untersucht. In Brn3a-gehemmten Ansätzen zeigten bis zu 18% der gezählten Zellen Foci, in Kontroll-siRNA-behandelten Zellen dagegen nur 4% (Abbildung 20 B). In unbehandelten Zellen wurden identische Werte wie in Kontroll-siRNA-

transfizierten Zellen erreicht (Daten nicht gezeigt). Neben der Bildung des MRN-Komplexes spielt die Aktivierung der Kinase ATM eine wichtige Rolle in der Erkennung von Doppelstrangbrüchen und der Weiterleitung von Signalen zur Einleitung der DNA-Reparatur. In unbeschädigten Zellen liegt ATM als nicht-funktioneller Homo-Dimer oder Multimer vor. Im Falle eines Doppelstrangbruchs kommt es zur Autophosphorylierung von ATM an Serin 1981, zur Auflösung von höheren ATM-Strukturen und damit zur Bildung von funktionellen ATM-Monomeren [112]. Die Autophosphorylierung von ATM wurde mittels ELISA für die Phosphorylierung an Serin 1981 gemessen. Dabei zeigte sich in Brn3a-gehemmten Zellen eine signifikante, bis zu vierfach erhöhte Phosphorylierung verglichen mit Kontroll-Zellen (Abbildung 21 A). Aktiviertes ATM kann den Tumorsuppressor p53 sowohl direkt an Serin 15, als auch indirekt über Chk2 an Serin 20 phosphorylieren [113, 114]. Abbildung 21 B zeigt die Phosphorylierung von Chk2 an Threonin 68, dem relevanten Aminosäurerest für die Phosphorylierung durch ATM, sowie die Phosphorylierung von p53 an den Serinen 15 und 20. Die Stabilisierung und Aktivierung von p53 und dessen zellzyklusinhibierende Aktivität über den Faktor p21 wurde so als Folge eines DNA-Schaden-Signals bestätigt. Um diese Ergebnisse zu stützen, wurde untersucht, ob in Brn3a-gehemmten Zellen p53-abhängige Reparaturmechanismen zur Behebung des DNA-Schadens aktiviert sind. Die Ribonukleotid Reduktase RRM2B (*p53R2*, *ribonucleotide reductase M2 B (TP53 inducible)*) ist eine direkt von p53 regulierte Untereinheit des Ribonukleotid Reduktase-Komplexes und verantwortlich für die Bereitstellung von Ribonukleotiden im Fall eines DNA-Schadens. Sie wird vom Zytoplasma in den Nukleus der Zelle transportiert um vor Ort für die Ribonukleotidsynthese zu sorgen [115]. Die für die Ribonukleotidproduktion in der S-Phase des Zellzyklus verantwortliche Ribonukleotid Reduktase-Untereinheit R2 (*ribonucleotide reductase M2*) hingegen befindet sich stets im Zytoplasma. Von ihr für die DNA-Replikation bereitgestellte Ribonukleotide müssen daher in den Zellkern diffundieren. RRM2 ist nur während der S-Phase aktiv und ihre mRNA-Spiegel sinken in den anderen Phasen des Zellzyklus. 48 h nach der Hemmung von Brn3a wurde die Aktivierung von p53 und der damit verbundene Zellzyklusarrest beobachtet. Als Folge des G1-Arrests und des damit unterbundenen Eintritts in die S-Phase war die mRNA der zytoplasmatischen Ribonukleotid Reduktase-Untereinheit RRM2 als Folge der Brn3a-Hemmung zu diesem Zeitpunkt stark reduziert (Abbildung 21 C links). Parallel dazu erfolgte eine Aktivierung der p53-induzierbaren, für die DNA-Reparatur benötigten Untereinheit RRM2B (Abbildung 21 C rechts). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Hemmung von Brn3a zu DNA-Schäden in Form von Doppelstrangbrüchen führt, aus denen über die Aktivierung des DNA-Schaden-Signalwegs die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 folgt.

3.2.6 Identifizierung von Zielgenen des Transkriptionsfaktors Brn3a

Um transkriptionelle Zielgene von Brn3a zu identifizieren, die direkt für die Aktivierung von p53 als Folge eines DNA-Schadens nach Brn3a-Hemmung verantwortlich sind, sollte das Transkriptom von Brn3a-gehemmten Melanomzellen mit dem von Kontroll-Zellen verglichen werden. Voraussetzung hierfür war der Nachweis der transkriptionellen Aktivität von Brn3a in Melanomzellen.

3.2.6.1 Nachweis der transkriptionellen Aktivität von Brn3a

Immunzytochemische Färbungen von 1205Lu-Melanomzellen zeigten eine deutliche Kernlokalisierung des Brn3a-Proteins und damit einen Hinweis auf die Funktion von Brn3a als Transkriptionsfaktor (Abbildung 22 A). Da die transkriptionelle Aktivität von POU-Faktoren jedoch durch gewebespezifische Ko-Faktoren moduliert werden kann, musste die Aktivität von Brn3a als Transkriptionsfaktor in Melanomzellen zunächst verifiziert werden [116]. Um dies zu prüfen, wurden in Genreporterexperimenten Melanomzellen mit Vektoren transfiziert, die unter Kontrolle eines Prolaktin-Minimalpromotors mit drei kanonisch angeordneten Brn3a-Konsensus-Bindestellen das Firefly-Luziferasegen exprimierten (pGI2-Brn3a-luc) [89]. Als Kontrolle wurde ein Vektor mit Prolaktin-Minimalpromotor, aber ohne Brn3a-Bindestellen verwendet (pGI2-K-luc). Dabei zeigte sich eine deutliche Aktivierung der Luziferaseexpression in Zellen, die mit pGI2-Brn3a-luc transfiziert wurden, nicht aber bei Transfektion des Kontroll-Vektors pGI2-K (Abbildung 22 B). Je nach Zelllinie konnte eine 100-fache (1205Lu) bis zu 500-fache (WM1158) Induktion der Luziferaseexpression gemessen werden. Die Brn3a-negative Melanomzelllinie WM3211 zeigte dagegen keine Induktion der Luziferaseexpression. In weiteren Experimenten wurde Brn3a in 1205Lu-Melanomzellen durch siRNAs gehemmt und anschließend die transkriptionelle Aktivität von Brn3a durch Transfektion mit pGI2-Brn3a-luc gemessen. Abbildung 22 C zeigt die Reduktion der Lichtemission nach Brn3a-Hemmung um bis zu 90% für beide Brn3a-siRNAs.

3.2.6.2 Identifizierung von Brn3a-regulierten Genen durch Microarrayanalyse

Nach der Bestätigung der transkriptionellen Aktivität von Brn3a in Melanomzellen wurde ein genomweites Microarrayexperiment durchgeführt, um Brn3a-regulierte Gene zu identifizieren. Da aus den vorhergegangenen Experimenten die Aktivierung des Tumorsuppressors p53 durch Brn3a-Hemmung bekannt war, wurde dieser Faktor im experimentellen Ansatz berücksichtigt. Zusätzlich zu den beiden siRNAs Brn3a 1 und Brn3a 2 sowie einem Referenzansatz mit Kontroll-siRNA wurde ein Ansatz mit einer Ko-Hemmung von Brn3a (siRNA Brn3a 1) und p53 mitgeführt.

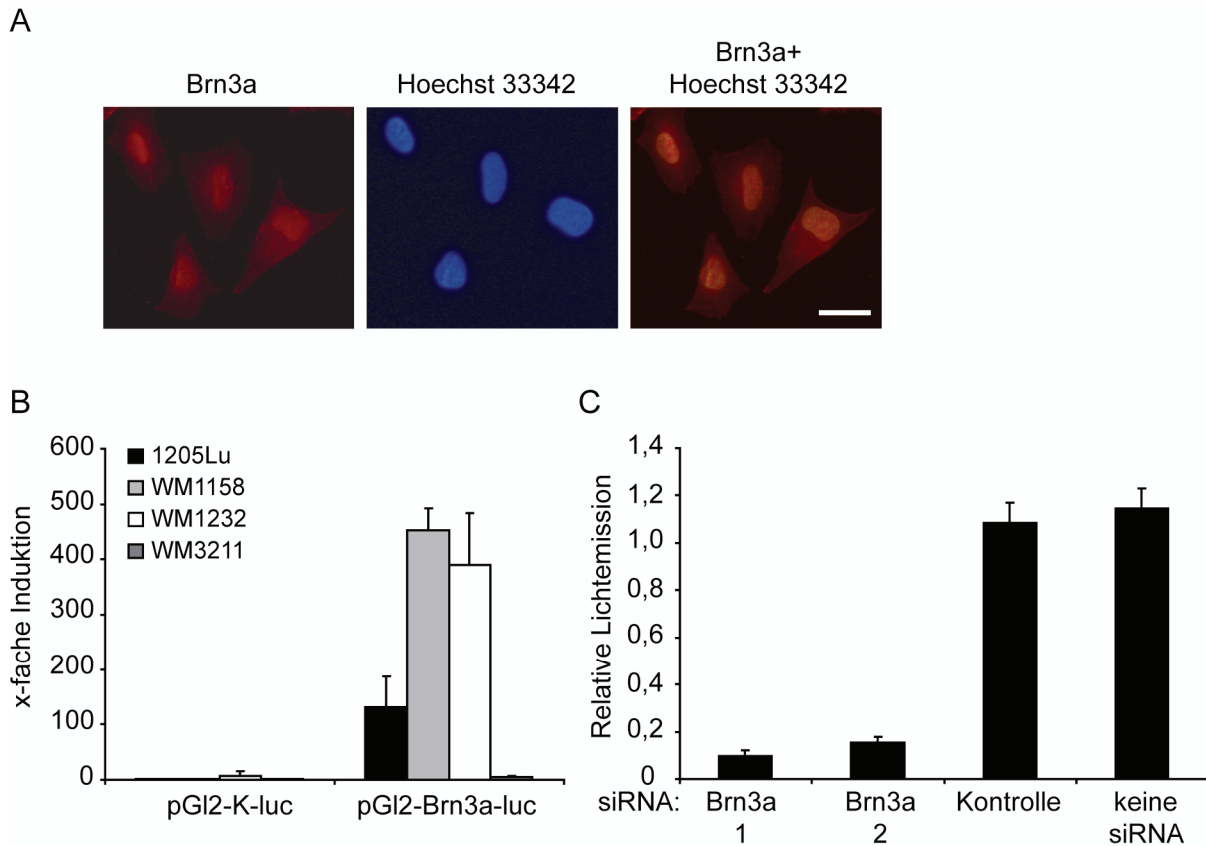


Abbildung 22: Untersuchung der transkriptionellen Aktivität von Brn3a in Melanomzellen

(A) Brn3a ist in Melanomzellen im Kern lokalisiert 1205Lu-Melanomzellen wurden unter Verwendung eines Brn3a-spezifischen Antikörpers immunzytochemisch gefärbt. Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

(B) Brn3a ist in Melanomzellen transkriptionell aktiv 1205Lu, WM1158, WM1232 und Brn3a-negative WM3211 wurden mit den luziferaseexprimierenden Vektoren pGI2-K-luc oder pGI2-Brn3a-luc transfiziert und nach 48 h luminometrisch analysiert. pGI2-Brn3a-luc trägt 3 kanonisch angeordnete Brn3a-Konsensus-Bindestellen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

(C) Brn3a-siRNAs reduzieren die transkriptionelle Aktivität von Brn3a 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und mit dem Vektor pGI2-Brn3a-luc transfiziert. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen luminometrisch analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Bisherige Experimente zeigten, dass diese Ko-Inhibition geeignet ist, die Aktivierung von p53 bei Brn3a-Hemmung zu verhindern. Beispielsweise wurde so die p53-vermittelte Induktion von p21 unterbunden (siehe Abbildung 18 A). Es wurden insgesamt vier experimentelle Ansätze unterschieden: 1. Brn3a-siRNA 1 und Kontroll-siRNA, 2. Brn3a-siRNA 2 und Kontroll-siRNA, 3. Brn3a-siRNA 1 und p53-siRNA und 4. Kontroll-siRNA in doppelter Konzentration. Da in Ansatz 3 zwei verschiedene siRNAs je 20 nM verwendet wurden, wurde in allen anderen Ansätzen Kontroll-siRNA zugegeben, um den Konzentrationsunterschied auszugleichen. Zwei unabhängig hergestellte Ansätze wurden an das Institut für Experimentelle Genetik (IEG) am Helmholtzzentrum München übergeben. Qualitätsanalysen, Voramplifikation und reverse Transkription wurden von Mitarbeitern des IEG durchgeführt und die Ergebnisse des Microarrayexperiments wurden in Form eines

Microsoft Excel-Datenblattes übermittelt. Die Liste der deregulierten Gene wurde anhand der sogenannten linearen Ratio (ratio lin.) sortiert. Sie beschreibt die Veränderung der Expressionsstärke des jeweiligen Gens im Vergleich zu einem Referenzwert (Kontroll-siRNA-behandelte Zellen). Werte zwischen 0 und 1 können so als eine Reduktion der Expression im Vergleich zur Referenz gelesen werden und Werte > 1 als Anstieg in der Expression. Im ersten Schritt wurden Gene selektiert, die durch die Brn3a-siRNA 1 dereguliert waren. Dabei wurden nur Gene berücksichtigt, die um mindestens die Hälfte reduziert, bzw. um das Doppelte induziert waren (ratio lin. $< 0,5$ oder $> 2,0$). Dies resultierte in einer Liste von 1281 deregulierten Genen. Anschließend wurden p53-regulierte Gene entfernt, indem die deregulierten Gene mit dem Brn3a/p53-gehemmten Ansatz verglichen wurden. Nur Gene, die in diesem Ansatz gleichermaßen dereguliert waren (ratio lin. $< 0,5$ oder $> 2,0$) wurden berücksichtigt. Von den verbleibenden 332 Genen wurden nur die Gene weiter untersucht, die auch durch die Brn3a-siRNA 2 in gleicher Weise dereguliert waren (ratio lin. $< 0,5$ oder $> 2,0$). Dies resultierte in einer Liste von 86 Genen. Gensymbole, denen kein konkretes, in der Literatur beschriebenes Gen oder Genprodukt zugeordnet werden konnte, wurden vernachlässigt, so dass die Sortierung der Daten zuletzt 79 potentielle Brn3a-Zielgene enthielt. Im Folgenden wurden die Promotoren dieser 79 Gene auf die Anwesenheit von potentiellen Brn3a DNA-Bindestellen untersucht.

3.2.6.3 Promotoranalyse der deregulierten Gene

Der neuronale Transkriptionsfaktor Brn3a bindet sequenzabhängig regulatorische DNA-Elemente als Monomer oder Homodimer, um die Transkription zu aktivieren oder zu reprimieren. Um potentielle transkriptionelle Zielgene dieses Faktors im malignen Melanom zu identifizieren, wurden Promotorregionen von nach Brn3a-Hemmung deregulierten Genen auf die Anwesenheit von in der Literatur beschriebenen Brn3a-Bindestellen durchsucht (Tabelle 7). Zusätzlich wurde die Software MatInspector der Firma Genomatix verwendet, um potentielle Bindestellen durch die Verwendung von zwei degenerierten Matrizes (Brn3.01 und Brn3.02 für alle Brn3-Faktoren) in diesen Promotorsequenzen zu identifizieren. Bei den in Tabelle 7 in Matrix-Form dargestellten Sequenzen ist zu beachten, dass unterstrichene Zeichen für einen hohen Informationsgehalt stehen und als hoch konserviert anzusehen sind. In Großbuchstaben stehende Zeichen gehören zu der von der Software verwendeten Kernsequenz, die auf den angegebenen Quellen beruht. Andere Zeichen als A, T, G und C wurden in der Promotoranalyse als beliebige Zeichen und ohne Gewichtung verwendet.

Tabelle 7: Brn3a DNA-Bindesequenzen zur Promotoranalyse

	Name	Sequenz	Literatur
Genomatix softwarebasiert	Brn3.01	nnstcat <u>waATT</u> atnn	Gruber et al. 1997
	Brn3.02	nncywt <u>TAAT</u> tanwtnn	Smith et al. 1998, Perez-Sanchez et al. 2002, Ma et al. 2003, Trieu et al. 2003
literaturbasiert	Brn3a	TTAATGAG	Xiang et al. 1995
		ATTAATTAT	Gruber et al. 1997
		GAAGATTGATG	Smith et al. 1998
		ATTTATTAT TTAATTCAT ATTAATTAA	Trieu et al. 2003

Tabelle 8 zeigt als Ergebnis der Microarrayanalyse die 15 Gene, die nach Brn3a-Hemmung p53-unabhängig dereguliert waren, und deren proximaler Promotorbereich, also die Promotorsequenz unmittelbar oberhalb des Gens, eine oder mehrere aus der Literatur bekannte Brn3a-Bindestellen oder die von Genomatix erstellten Matrices enthielt. Sie zeigt außerdem die im Microarray gemessenen Veränderungen der Genexpression in Bezug zur Kontrolle (lineare Ratio). Oben (grün unterlegt) sind Gene dargestellt, deren Expression nach Brn3a-Hemmung herunterreguliert war, während unten (rot unterlegt) sich die Gene befinden, deren Expression nach Brn3a-Hemmung hochreguliert war. Zur Orientierung sind die beiden durch siRNAs gehemmten Faktoren Brn3a (POU4F1) und p53 (TP53), sowie der als funktionelle Kontrolle verwendete Zellzyklusregulator p21 (CDKN1A) mit dargestellt.

Tabelle 8: Potentielle Brn3a-Zielgene als Ergebnis der Microarray-Analyse

Gen-symbol	siRNA			Definition	
	Brn3a 1	Brn3a 2	Brn3a 1+p53		
KIF11	0,2	0,1	0,5	Homo sapiens kinesin family member 11, mRNA	nach Brn3a-Hemmung nach unten reguliert
EIF3A	0,3	0,2	0,5	Homo sapiens eukaryotic translation initiation factor 3, subunit A, mRNA	
ACSL3	0,3	0,4	0,5	Homo sapiens acyl-CoA synthetase long-chain 3, trans.v1, mRNA	
RNF138	0,3	0,5	0,4	Homo sapiens ring finger protein 138, trans.v1, mRNA	
NUDCD1	0,4	0,5	0,5	Homo sapiens NudC domain containing 1, mRNA	
UGP2	0,4	0,5	0,4	Homo sapiens UDP-glucose pyrophosphorylase 2, trans.v1, mRNA	
GBP2	6,4	4,2	3,0	Homo sapiens guanylate binding protein 2, mRNA	nach Brn3a-Hemmung nach oben reguliert
ADAM10	4,2	4,2	2,4	Homo sapiens ADAM metalloproteinase domain 10, mRNA	
MRPS10	3,5	2,8	3,4	Homo sapiens mitochondrial ribosomal protein S10, mRNA	
ETV5	3,2	2,8	2,2	Homo sapiens ets variant gene 5 (ets-related molecule), mRNA	
CNIH	2,8	2,0	3,3	Homo sapiens cornichon homolog (Drosophila), mRNA	
F12	2,8	2,1	2,0	Homo sapiens coagulation factor XII (Hageman factor), mRNA	
C1RL	2,5	2,0	2,2	Homo sapiens complement component 1, mRNA	
NEUROG2	2,4	2,0	2,4	Homo sapiens neurogenin 2, mRNA	
ABHD3	2,2	2,0	2,2	Homo sapiens abhydrolase domain containing 3, mRNA	
TP53	0,9	0,9	0,6	Homo sapiens tumor protein p53, mRNA.	inhibierte Gene
POU4F1	0,3	0,3	0,4	Homo sapiens POU class 4 homeobox 1 (POU4F1), mRNA.	
CDKN1A	3,2	2,9	0,7	Homo sapiens cyclin-dep. kinase inhibitor 1A (p21,Cip1), trans.v1, mRNA	Kontroll-Gen

lineare Ratio vs.
Kontroll siRNA

3.2.7 Untersuchungen zum transkriptionellen Brn3a-Zielgen KIF11

3.2.7.1 Das Spindelmotorprotein Kif11 (Eg5)

Aus der Liste der 15 deregulierten Gene wurde das Kinesin 11 (Kif11, Eg5) für weitere Untersuchungen ausgewählt, da seine Funktion eng mit Zellproliferation und Zellzyklusregulation verbunden ist. Kinesine sind mikrotubuliabhängige Motorproteine, die essentielle Aufgaben während der Mitose und Zellteilung bewältigen. Die Trennung der Chromosomen während der Mitose obliegt der bipolaren mitotischen Spindel, bestehend aus Mikrotubuli und ihren assoziierten Proteinen. Der Aufbau und die Ausrichtung der mitotischen Spindel, beides Voraussetzungen für die korrekte Chromosomensegregation, werden von Motorproteinen wie Kif11 ausgeführt [117, 118]. Im Fall von Kif11 handelt es sich um einen als Homotetramer agierenden, sogenannten Plus-Ende Motor.

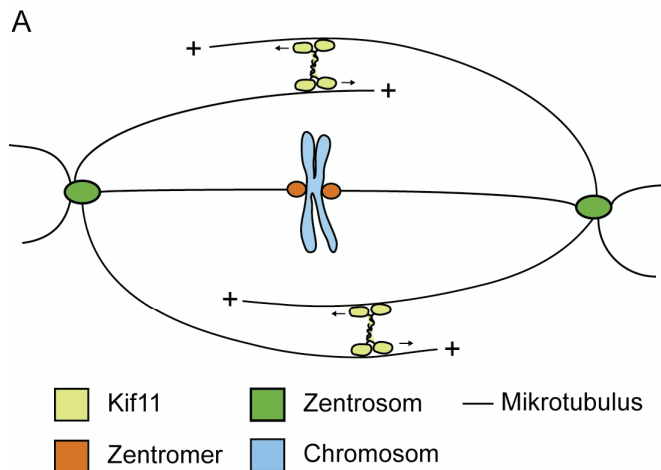
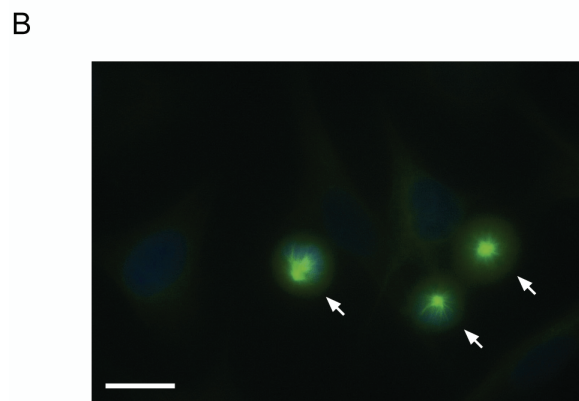


Abbildung 23: Das Spindelmotorprotein Kif11

(A) Funktionsweise von Kif11 Das Spindelmotorprotein Kif11 bindet als Homotetramer mit seiner Motordomäne an überlappende Mikrotubuli. Unter Energieaufwand durch ATP-Hydrolyse wandern die Motordomänen in Richtung des Plus (+)-Endes des gebundenen Mikrotubulus. Im Zusammenspiel mit Minus-Ende gerichteten Motoren wie Dynein wird so die bipolare mitotische Spindel in der Zelle ausgebildet. Dies ist Voraussetzung für eine effiziente Ausrichtung und Segregation der Chromosomen und damit für eine erfolgreiche Zellteilung.

Abbildung modifiziert nach Kapitein et al., 2005



(B) Inhibition von Kif11 führt zu monastraler Mikrotubulianordnung

Spindelinhhibitoren wie Monastrol stören selektiv die ATPase-Aktivität der Kif11-Motordomänen. In der Folge kann während der Mitose keine bipolare mitotische Spindel ausgebildet werden. Das Ergebnis ist eine sternförmige oder monastrale Anordnung der Mikrotubuli. Dieser Effekt kann ebenfalls durch die Hemmung von Kif11 durch spezifische RNA-Interferenz erreicht werden. Das Bild zeigt 1205Lu-Melanomzellen 48 h nach Transfektion mit Kif11-siRNA. Grün: α -Tubulin, blau: DNA, gefärbt mit Hoechst 33342. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

Das heißt seine aminoterminalen katalytischen Motordomänen wandern unter Energieverbrauch in Richtung des Plus-Endes von Mikrotubuli (siehe Abbildung 23 A) [119]. Über das Kinetochor mit den Spindelmikrotubuli assoziierte Chromosomen werden so beispielweise in der Metaphase der Mitose in der Metaphaseplatte ausgerichtet oder in der Anaphase segregiert. Inhibition von Kif11 durch RNA-Interferenz oder durch sogenannte *Small-molecule*-Inhibitoren wie Monastrol führt durch den Verlust der bipolaren Spindel zu einer Missegregation der Chromosomen während der Mitose und einem daraus resultierenden Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase des Zellzyklus [120, 121]. Charakteristischer Phänotyp für die fehlende Funktion von Kif11 ist die Ausbildung einer sogenannten Monoaster an Stelle einer bipolaren mitotischen Spindel mit einer typisch sternförmigen Anordnung der Mikrotubuli (Abbildung 23 B). Da Tumorzellen auf einen verlängerten G2/M-Arrest oft mit der Induktion von Apoptose reagieren, wird aktuell eine Vielzahl von neuen Kinesin-Inhibitoren, darunter selektive Inhibitoren für Kif11, entwickelt und für eine klinische Verwendung getestet [122-124]. Die durchgeführten Microarrayanalysen zeigten eine Reduktion der Kif11-mRNA durch die beiden Brn3a-siRNAs Brn3a 1 und 2 um 80% bzw. um 90% (siehe Tabelle 8). Die Ko-Inhibition von Brn3a und p53 führte zu einer Reduktion von Kif11 um 50%. Zudem ergab eine Analyse des Bereichs bis 1.000 Basen vor dem Startcodon ATG (+1) des KIF11-Gens die Anwesenheit von zwei potentiellen Brn3a-DNA-Bindestellen, die den von Genomatix generierten Brn3-Binde-

Matrices Brn3.01 und Brn3.02 entsprachen. Im Folgenden wurde das Verhältnis von Brn3a und Kif11 näher untersucht.

3.2.7.2 Untersuchung der transkriptionellen Regulation von Kif11 durch Brn3a

Im nächsten Schritt wurde zunächst das Ergebnis der Microarrayanalyse durch qRT-PCR bestätigt. Analog zum Vorgehen beim Microarray wurden 1205Lu-Melanomzellen mit Brn3a-siRNAs allein und in Kombination mit p53 transfiziert und Veränderungen der Kif11-mRNA 48 h nach Transfektion analysiert. Dabei zeigte sich eine starke Reduktion der Kif11-mRNA nach Hemmung von Brn3a und wie im Microarray ebenfalls eine wenn auch geringere Reduktion bei gleichzeitiger Hemmung von Brn3a und p53 (Abbildung 24 A).

Um die transkriptionelle Regulation des KIF11-Gens weiter zu untersuchen, wurden die im KIF11-Promotor identifizierten potentiellen Brn3a-Bindestellen in den Vektor pGL2-K-luc inseriert. Es wurden zwei Vektoren hergestellt: pGl2-Brn3.01-luc und pGl2-Brn3.02-luc. Dazu wurden zwei 56 Basen lange, komplementäre Oligonukleotide synthetisiert, zusammengelagert und über flankierende Restriktionsschnittstellen in den Prolaktin-Promotor des Reportervektors pGl2-K-luc integriert. Jedes Oligonukleotid enthielt zwei aufeinander folgende Kopien der Bindestellen Brn3.01 oder Brn3.02. Das Schema in Abbildung 24 B zeigt die Sequenzen und die Positionen der im KIF11-Promotor gefundenen Brn3-DNA-Bindestellen. Unterstrichen sind dabei mit den Genomatix-Kernsequenzen identische Basen. 1205Lu-Melanomzellen wurden zunächst mit Brn3a-spezifischen siRNAs oder Kontroll-siRNA behandelt und 24 h später mit einem der beiden Genreporterplasmide transfiziert. Die Analyse der Luziferaseexpression erfolgte nach weiteren 24 h. Für beide Vektoren konnte eine signifikante Reduktion der Luziferaseaktivität um etwa 50% gemessen werden (Abbildung 24 B). Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Brn3a sein Zielgen KIF11 über zwei Brn3a-DNA-Bindestellen im KIF11-Promotor regulieren kann.

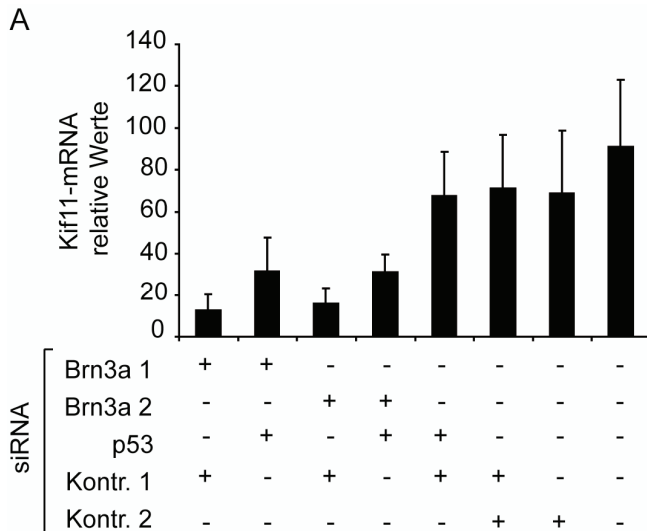
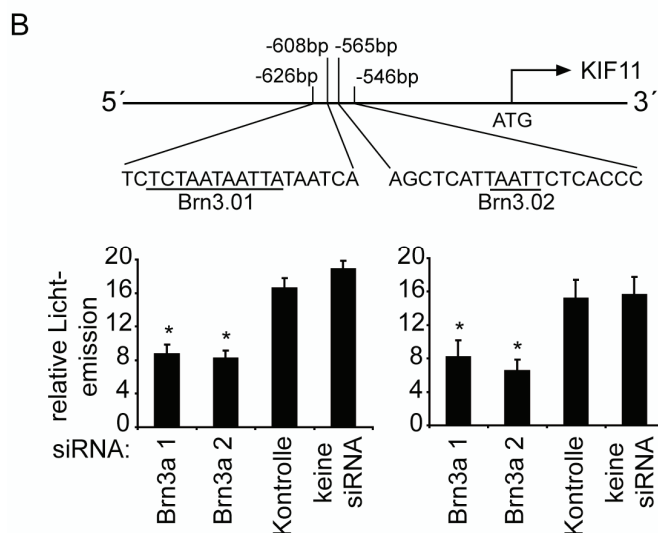


Abbildung 24: KIF11 ist ein neues transkriptionelles Zielgen von Brn3a

(A) Kif11-mRNA wird nach Hemmung von Brn3a p53-unabhängig reduziert 1205Lu-Zellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und Kif11- mRNA nach 48 h durch qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.



(B) Brn3a-siRNAs verhindern die Expression von Luziferase unter Kontrolle von Brn3a-DNA-Bindestellen aus dem KIF11-Promoter

1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und mit den Vektoren pGI2-Brn3.01-luc oder pGI2-Brn3.02-luc transfiziert. pGI2-Brn3.01-luc oder pGI2-Brn3.02-luc enthalten je zwei Kopien der Brn3-DNA-Bindestellen Brn3.01 oder Brn3.02 aus dem proximalen Promoter des KIF11-Gens (siehe Schema, unterstrichen: Genomatrix Kernsequenz). Nach weiteren 24 h wurden die Zellen luminometrisch analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. * bezeichnen einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Ansätzen behandelt mit Kontroll-siRNA.

3.2.7.3 Funktionelle Parallelen nach Hemmung von Brn3a oder Kif11

Die Hemmung von Brn3a reduzierte die Expression des Spindelmotorproteins Kif11 in Melanomzellen. In Brn3a-gehemmten Melanomzellen kam es außerdem zu einer Akkumulation und Aktivierung des Tumorsuppressors p53 und einem daraus resultierenden Zellzyklusarrest sowie nachfolgend zu mitochondrialer Apoptose. Um zu untersuchen, ob die Reduktion von Kif11 nach Brn3a-Hemmung zu diesem Phänotyp beiträgt, wurde eine Kif11-spezifische siRNA entworfen. Untersuchungen zur Hemmeffizienz der Kif11-siRNA mittels qRT-PCR zeigten eine Reduktion der Kif11-mRNA um bis zu 85%, verglichen mit Kontroll-Ansätzen. Die direkte Inhibition von Kif11 war dabei signifikant größer als die Reduktion der Kif11-mRNA nach Hemmung von Brn3a zu diesem Zeitpunkt (Abbildung 25 A).

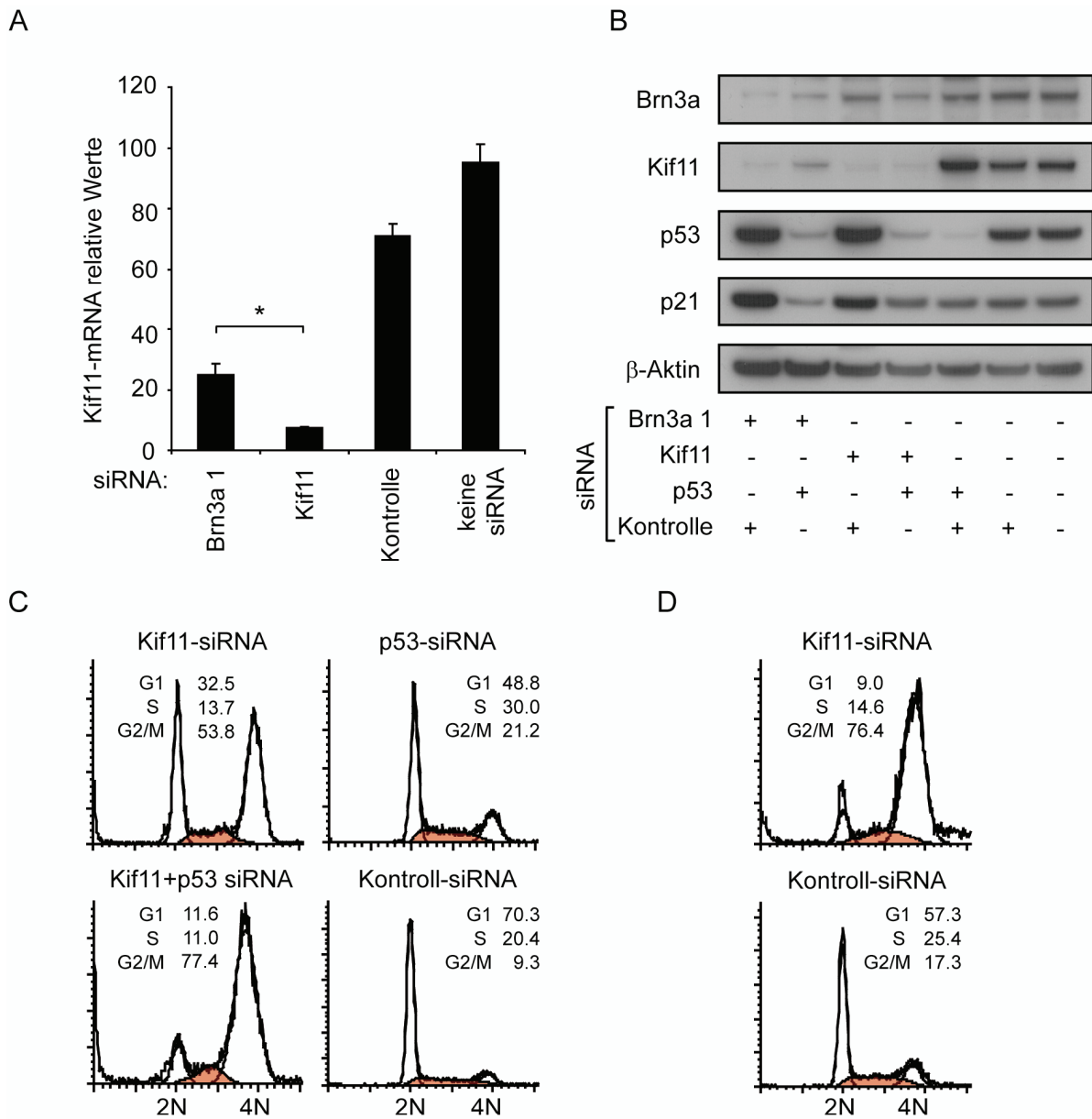


Abbildung 25: Die Hemmung von Kif11 führt zur Aktivierung von p53 und Zellzyklusarrest in der G1- und G2/M-Phase

(A) Analyse der Kif11-mRNA nach Hemmung von Brn3a und Hemmung von Kif11 durch spezifische siRNAs 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und die Kif11-mRNA nach 48 h durch qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. * bezeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen den gekennzeichneten Ansätzen.

(B) Hemmung von Brn3a und Hemmung von Kif11 durch spezifische siRNAs führt zur Aktivierung von p53 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und 48 h später das Gesamtzell-protein im Immunoblot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. Humanes β -Aktin diente als Ladekontrolle. Immunoblots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

(C) Zellzyklusanalyse nach Hemmung von Kif11 oder Kif11 und p53 in Melanomzellen 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und nach 48 h im PI-FACS analysiert. Histogramm-Analysen und Prozentangaben sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

(D) Zellzyklusanalyse nach Hemmung von Kif11 in HeLa-Zellen p53-defiziente HeLa-Zellen wurden wie unter (C) beschrieben behandelt.

Immunoblot-Analysen zeigten ebenfalls eine starke Reduktion des Kif11-Proteins nach Transfektion mit Kif11-spezifischer siRNA. Abbildung 25 B zeigt außerdem die Reduktion von Kif11 nach Brn3a-Hemmung auf Proteinebene. Wie die Hemmung von Brn3a führte auch die Hemmung von Kif11 zu erhöhtem p53- und p21-Protein in Melanomzellen. Die Ko-Inhibition von Kif11 und p53 verhinderte zudem die Aktivierung des p53-Zielgens p21 (Abbildung 25 B).

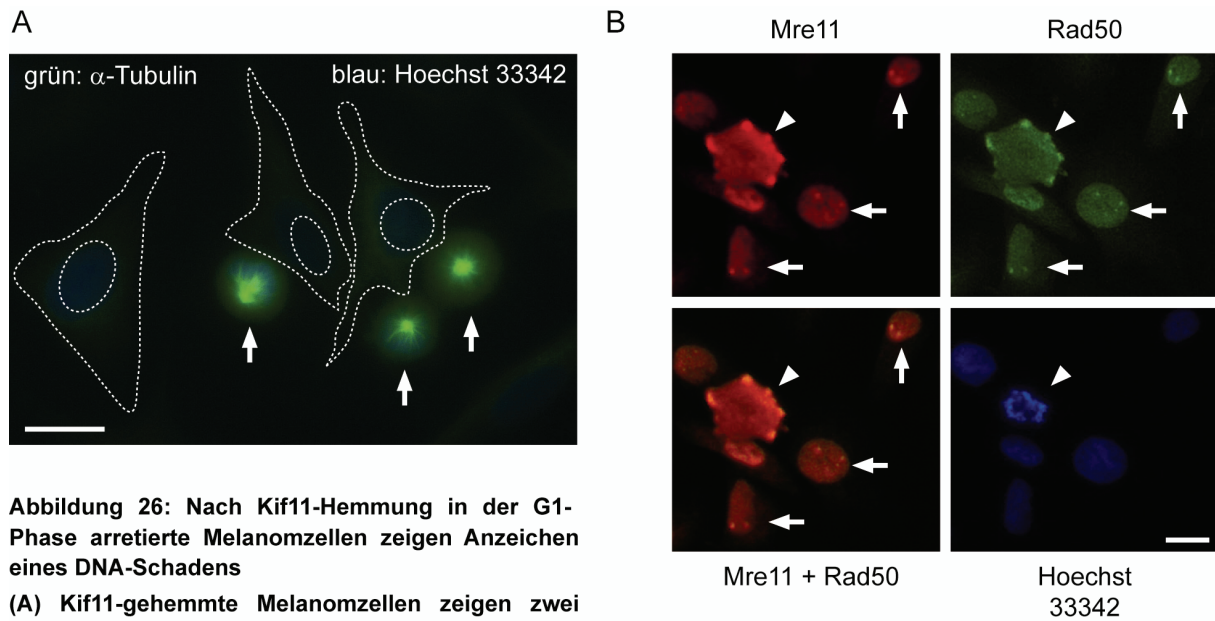
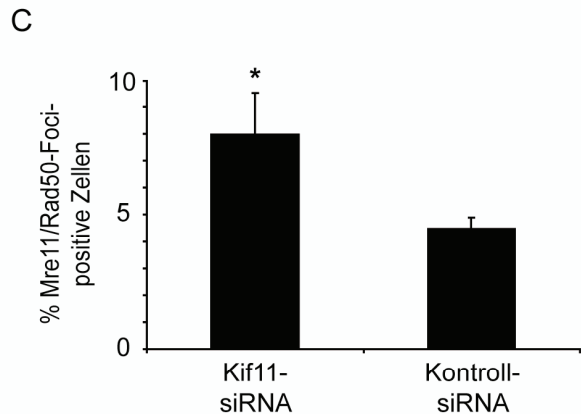


Abbildung 26: Nach Kif11-Hemmung in der G1-Phase arretierte Melanomzellen zeigen Anzeichen eines DNA-Schadens

(A) Kif11-gehemmte Melanomzellen zeigen zwei charakteristische Phänotypen 1205Lu-Melanomzellen wurden mit Kif11-siRNA transfiziert und nach 48 h in eiskaltem Methanol fixiert. Mikrotubuli (grün) wurden mit einem FITC-gekoppelten α -Tubulin Antikörper gefärbt, Zellkerne mit Hoechst 33342 (blau). Unterbrochene Linien markieren abgeflachte Zellen (Phänotyp 1), Pfeile markieren Zellen mit monastralen Mikrotubuli (Phänotyp 2). Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

(B) Bildung von Mre11/Rad50-Foci in Melanomzellen nach Hemmung von Kif11 Mre11/Rad50-Foci positive Zellkerne wurden 40 h nach Transfektion von 1205Lu-Melanomzellen mit Kif11-siRNA immunocytochemisch nachgewiesen. Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 gefärbt. Pfeile zeigen Foci-positive Zellen, der Pfeilkopf eine Zelle mit monastralem Phänotyp. Der Maßstabsbalken entspricht 50 μ m.

(C) Quantifizierung von Foci-positiven Zellkernen nach Hemmung von Kif11 1205Lu-Melanomzellen wurden wie unter (B) beschrieben behandelt. Die Quantifizierung von Foci-positiven Zellkernen erfolgte mikroskopisch in drei unabhängigen Experimenten. * bezeichnet einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu Kontroll-siRNA behandelten Zellen.



Analysen des Zellzyklus von 1205Lu-Melanomzellen nach Kif11 Hemmung zeigten zum einen den aus der Literatur bekannten Zellzyklusarrest in der G2/M-Phase, zum anderen einen p53-abhängigen Arrest in der G1-Phase (Abbildung 25 C). Eine Ko-Inhibition von Kif11

und p53 reduzierte den Anteil der Zellen in G1-Phase signifikant. p53-defiziente HeLa-Zellen zeigten keinen Arrest in der G1-Phase, sondern arretierten fast vollständig in der G2/M-Phase (Abbildung 25 D) [125].

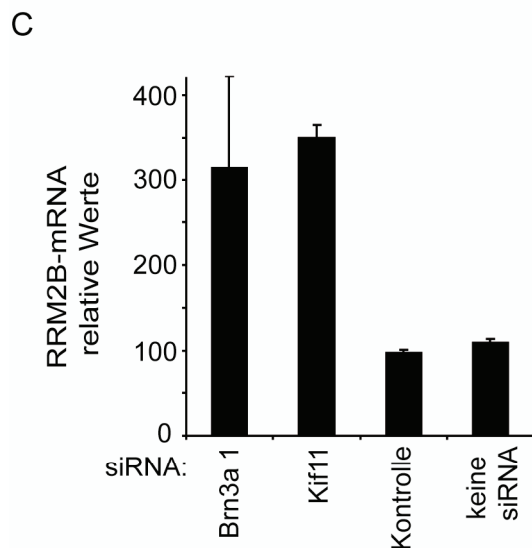
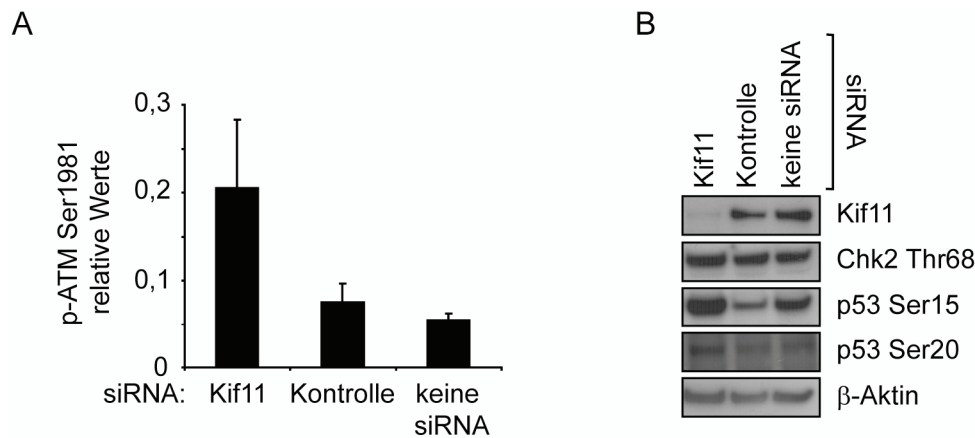


Abbildung 27: Aktivierung des DNA-Schaden-Signalwegs nach Hemmung von Kif11 in Melanomzellen

(A) Aktivierung der Kinase *Ataxia telangiectasia mutated* (ATM) 48 h nach Hemmung von Kif11 oder Kontrollbehandlung wurde die Aktivierung von ATM aus Gesamtzellprotein von 1205Lu-Melanomzellen mittels ELISA für die Phosphorylierung von ATM an Serin 1981 nachgewiesen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus zwei unabhängigen Experimenten.

(B) Phosphorylierung von Checkpoint Kinase 2 (Chk2) und p53 an DNA-Schaden-relevanten Aminosäureresten 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und ihr Gesamtzellprotein 48 h später im Immunoblot mit phosphospezifischen Antikörpern für Chk2 und p53 analysiert. Humanes β -Aktin diente als Ladekontrolle. Immunoblots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

(C) Analyse der Expression der mit DNA-Reparatur assoziierten Ribonukleotid Reduktase RRM2B nach Hemmung von Brn3a oder Kif11 1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und 48 h später Veränderungen in der Expression der Ribonukleotid Reduktase M2B (DNA Reparatur, p53-abhängig) durch qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

Anschließend wurden Kif11-gehemmte 1205Lu-Melanomzellen auf die Aktivierung des DNA-Schaden-Signalwegs analysiert. Wie in Abbildung 26 A dargestellt waren nach Hemmung von Kif11 mikroskopisch zwei unterschiedliche Zellmorphologien auffällig: die bereits beschriebenen Monoastern (Pfeile), und flach anliegende Zellen mit deutlich erkennbaren großen Zellkernen (unterbrochene Linien). Letztere Zellpopulation setzt sich vermutlich zusammen aus natürlich in der G1-Phase vorkommenden Zellen und Zellen, die durch p53 in der G1-Phase arretiert wurden. Diese abgeflachten Zellen wurden mikroskopisch auf die Bildung von Mre11/Rad50-Foci untersucht (Abbildung 26 B, Pfeile). G2/M-arretierte, als Monoaster vorliegende Zellen konnten aufgrund ihrer Morphologie (Abbildung 26 B,

Pfeilkopf) nicht bewertet werden. Abbildung 26 C zeigt die Auszählung der Mre11/Rad50-positiven Zellen. Ein signifikanter Anstieg von Foci in Kif11-gehemmten Ansätzen um 50% wurde nach Auszählung von ca. 4.500 Zellen pro Bedingung nachgewiesen (Kif11-siRNA: 8,5% positiv, Kontroll-siRNA: 4,3% positiv). Wie in Brn3a-gehemmten Zellen wurde ebenfalls nach Kif11-Hemmung die Aktivierung der Kinase ATM festgestellt (Abbildung 27 A). Außerdem zeigt Abbildung 27 B die Phosphorylierung von Chk2 sowie von p53 an den relevanten Serinen im Immunoblot. Die mit DNA-Reparatur assoziierte Ribonukleotid Reduktase RRM2B war nach Kif11-Hemmung auf mRNA-Ebene in ähnlichem Maß erhöht wie nach Hemmung von Brn3a (Abbildung 27 C).

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Hemmung von Kif11 zu einem ähnlichen Phänotyp in Melanomzellen führt wie die Hemmung von Brn3a. Wie nach der Hemmung von Brn3a entstehen auch hier Doppelstrangbrüche, die über ein aktiviertes DNA-Schaden-Signal vermittelt durch ATM und Chk2 zur Phosphorylierung und Aktivierung des Tumorsuppressors p53 führen. Neben einem durch Defekte in der mitotischen Spindel hervorgerufenen Arrest in der G2/M-Phase kommt es nach Kif11-Hemmung auch zu einem p53-vermittelten Arrest in der G1-Phase.

3.3 Untersuchung des transformierenden Potentials von Brn3a

In den bisherigen Experimenten wurde die essentielle Funktion von Brn3a für das Überleben von Melanomzellen evaluiert. Die folgenden Experimente zielten darauf ab, die Rolle von Brn3a bei der Tumorentstehung zu untersuchen. Dazu wurde Brn3a in primären Zellen der Haut exprimiert. Zur dauerhaften und stabilen Expression von Brn3a in primären Fibroblasten und Melanozyten wurde Brn3a mit einem lentiviralen Expressionssystem stabil in das Genom dieser Zellen integriert. Zur Herstellung des lentiviralen Expressionsvektors pLenti-Brn3a wurde der offene Leserahmen (*Open reading frame*, ORF) des Brn3a-Gens aus dem Vektor Brn3a WT durch Restriktionsverdau entfernt und in den Polylinker des Vektors pLenti6-V5-D-TOPO der Firma Invitrogen integriert. Die Virenproduktion und die Infektion von primären Zellen der Haut erfolgten wie unter 2.2.14 beschrieben.

Mit pLenti-Brn3a oder Leervektor (pLenti-K) infizierte primäre Fibroblasten oder Melanozyten wurden 5 Tage nach Infektion im Immunoblot auf die Expression von Brn3a und seines Zielgens KIF11 analysiert. Immunoblots zeigten eine deutliche Expression von Brn3a in allen lentiviral transduzierten Zellen (Abbildung 28 A). Außerdem konnte eine erhöhte Expression von Kif11-Protein im detektiert werden. Für den Test des ankerunabhängigen Wachstums wurden pLenti-Brn3a-infizierte Zellen und Kontroll-Zellen (infiziert mit pLenti-K) in einem *Soft-agar*-Assay (Cell Biolabs, San Diego) analysiert. 1205Lu-Melanomzellen wurden als Positivkontrolle mitgeführt.

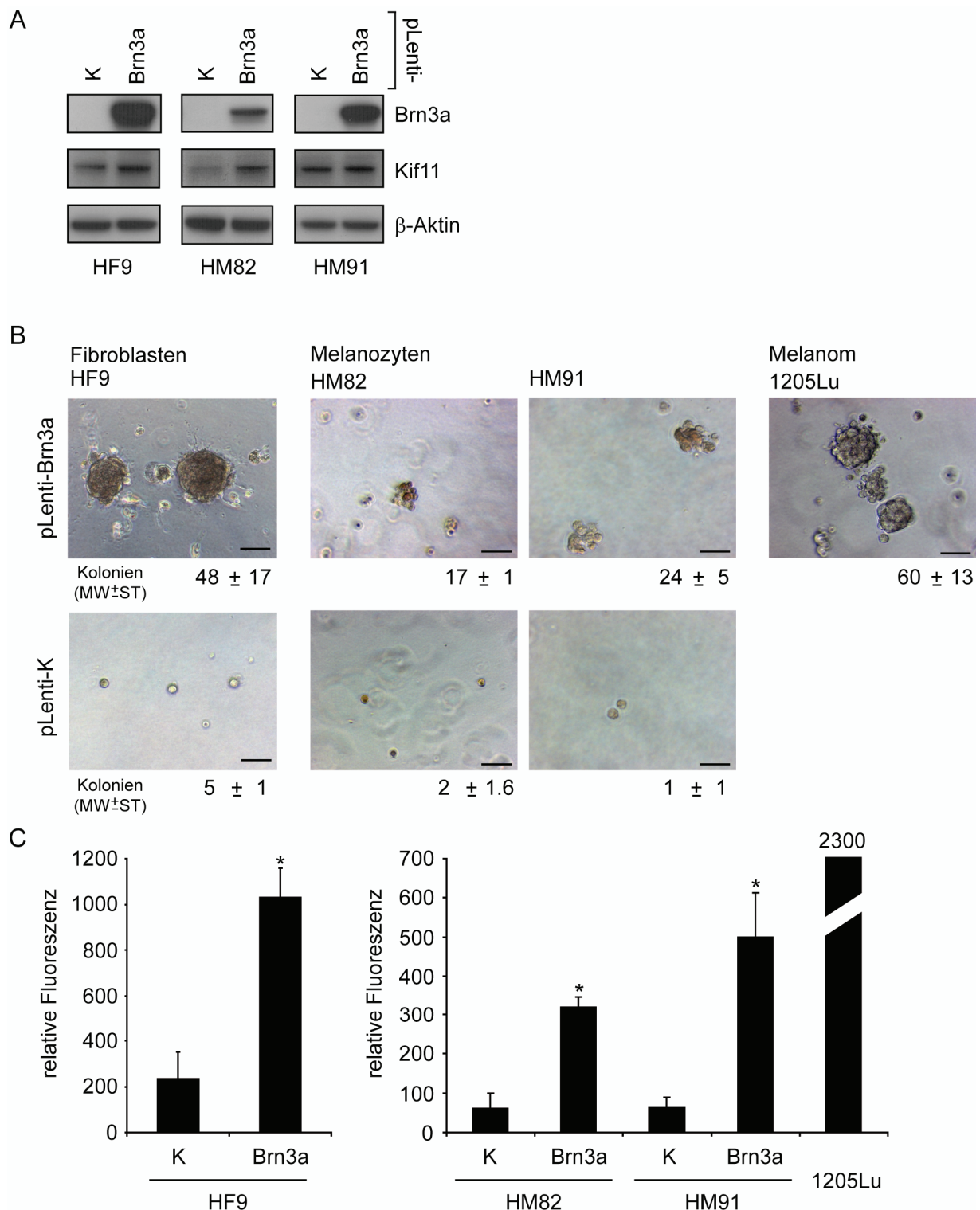


Abbildung 28: Die Expression von Brn3a verleiht primären Hautzellen ankerunabhängiges Wachstum

(A) Ektopische Expression von Brn3a in primären Zellen der Haut Primäre Fibroblasten (HF) und Melanozyten (HM) wurden mit lentiviralen Vektoren zur Brn3a-Expression infiziert. 5 Tage nach Transduktion wurde die Expression von Brn3a und Kif11 im Immunoblot analysiert. Humanes β -Aktin diente als Ladekontrolle.

(B) Untersuchung von primären Zellen der Haut im Soft-agar-Experiment Primäre Fibroblasten (HF) und Melanozyten (HM) wurden 24 h nach Transduktion mit pLenti-Brn3a oder pLenti-K in Agar-Suspension gegossen und nach 10 Tagen wurden Kolonien gezählt und fotografiert. Der Maßstabsblaken entspricht 100 μ m.

(C) Wachstum von primären Zellen der Haut im Soft-agar-Experiment Das Wachstum von unter (B) beschriebenen Zellen wurde am Tag 10 des Experiments fluorimetrisch quantifiziert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. * bezeichnen einen signifikanten Unterschied zwischen pLenti-Brn3a- und pLenti-K-infizierten Zellen.

Am Tag 10 des Experiments wurden entstandene Kolonien mikroskopisch untersucht, gezählt und fotografiert. Es zeigte sich eine deutliche Koloniebildung in Brn3a-infizierten Ansätzen. In Kontroll-Ansätzen waren dagegen fast ausschließlich einzelne Zellen erkennbar. Die Zählung der Kolonien ergab einen signifikanten Anstieg in der Koloniezahl in Brn3a-exprimierenden Ansätzen. Primäre Fibroblasten erreichten dabei mit einer durchschnittlichen Koloniezahl von 48 einen deutlich höheren Wert als primäre Melanozyten (HM82: 17, HM91: 24 Kolonien), 1205Lu-Melanomzellen zeigten mit durchschnittlich 60 Kolonien den höchsten Wert (Abbildung 28 B). Abschließend erfolgte die fluorimetrische Quantifizierung der gesamten Zellmenge in den einzelnen Ansätzen. Entsprechend der Koloniezahl wurde der höchste Wert bei 1205Lu-Melanomzellen gemessen (MW: 2300, unterbrochene Säule). Etwa die Hälfte davon erzielten primäre Fibroblasten (MW: 1030) gefolgt von primären Melanozyten (HM82: 320, HM91: 500, Abbildung 28 C). In allen Messungen war das Wachstum in Brn3a-infizierten Ansätzen signifikant höher als in Kontroll-Ansätzen. Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Infektion primärer Hautzellen mit Brn3a-exprimierenden Konstrukten ankerunabhängiges Wachstum fördert und so zur Tumorbildung beitragende Eigenschaften vermittelt.

4 Diskussion

Diese Arbeit beschreibt zum ersten Mal die Expression des neuronalen Transkriptionsfaktors Brn3a in Zellen des malignen Melanoms und charakterisiert seine Funktion in Zellen dieses Tumors.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Expression von Brn3a untersucht. Während gesunde primäre Zellen der Haut, darunter Keratinozyten, Fibroblasten und vor allem Melanozyten keine oder nur sehr geringe Mengen an Brn3a zeigten, war die Expression dieses Faktors in mehr als 75% der untersuchten Melanomzelllinien sehr deutlich erhöht, und sowohl in Zellen aus frühen Tumorstadien als auch in metastatischen Zelllinien nachweisbar. Zudem wurde durch immunhistochemische Analysen von Patientengewebe die Expression von Brn3a in primären Melanomen *in situ* gezeigt. In melanozytären Nävi hingegen war keine oder nur sehr vereinzelt Expression von Brn3a feststellbar.

Im zweiten Teil wurde die Funktion von Brn3a in Melanomzellen untersucht. Die Hemmung von Brn3a durch spezifische siRNAs führte zu DNA-Schäden und einer daraus resultierenden Aktivierung des Tumorsuppressors p53. Der anschließend beobachtete, p53-vermittelte Zellzyklusarrest in der G1-Phase mündete in der Induktion von mitochondrialer Apoptose. Dies bewirkte eine drastische Reduktion der Vitalität von Melanomzellen, von denen nur 20-50% nach Brn3a-Hemmung überlebten. *In vivo* führte die Hemmung von Brn3a im Mausmodell zu einer 40-45%igen Reduktion des Tumorwachstums.

Im dritten Teil der Arbeit wurden durch Microarrayanalysen transkriptionelle Zielgene von Brn3a charakterisiert. Hier wurde das mitotische Spindelmotorprotein Kif11 als durch Brn3a reguliert identifiziert. Weiterführende Untersuchungen zeigten dass die Reduktion von Kif11 ähnlich wie die Hemmung von Brn3a zu DNA-Schäden und einem p53-vermittelten Zellzyklusarrest in Melanomzellen führt. Dies deutet darauf hin, dass Kif11 an dem nach Brn3a-Hemmung beobachteten Phänotyp beteiligt ist.

Im vierten Teil wurden über die lentivirale Transduktion von primären Zellen der Haut mit Brn3a-exprimierenden Konstrukten tumorigene Eigenschaften dieses Moleküls dargestellt.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse zur Expression und Funktion von Brn3a in humanen Melanomzellen sollen hier diskutiert werden. Darüber hinaus soll auf die potentielle Bedeutung von Brn3a als prognostischen Marker oder als therapeutische Zielstruktur für das maligne Melanom eingegangen, und einige Möglichkeiten der Weiterführung dieses Projekts genannt werden.

4.1 Expressionsanalyse von Brn3a beim malignen Melanom

Die Expression von Brn3a konnte weder in gesunden primären Zellen der Haut noch in melanozytären Nävi nachgewiesen werden, wohl aber bereits in frühen Melanomstadien wie der radiären Wachstumsphase. Im Folgenden konnte kein Unterschied in der Expressionsstärke von Brn3a zwischen Zelllinien aus Früh- oder aus Spätstadien des Tumors festgestellt werden. Überraschend war dabei der hohe Anteil an Brn3a-exprimierenden Zellen (z.B. war erhöhtes Brn3a-Protein in allen untersuchten Melanomzellen bis auf die Zelllinie WM3211 nachweisbar). Insgesamt scheint die Expression von Brn3a den Übergang von der ruhenden benignen Zelle zur malignen proliferierenden Zelle im Zuge der malignen Transformation zu bezeichnen.

Der grundlegende Unterschied zwischen Melanozyten oder Nävuszellen und Melanomzellen liegt in der gesteigerten Proliferation der Tumorzellen. Gründe für diese gesteigerte Proliferation von Melanomzellen sind unter anderem die eingangs erwähnten Mutationen in den Faktoren BRAF oder N-RAS, die über eine konstitutive Aktivierung des MAPK-Signalwegs zu verstärktem Wachstum führen [11, 12]. Diese Mutationen wurden allerdings mit ähnlicher Häufigkeit auch in nicht proliferierenden Nävi gefunden [126]. Nach initialem Wachstum begeben sich diese Zellen in einen Ruhezustand, genannt Seneszenz. Als Ursache hierfür werden durch Replikationsstress hervorgerufene DNA-Schäden genannt, ein Phänotyp der starke Parallelen zu dem nach Brn3a-Hemmung beobachteten Phänotyp aufweist [127]. Zudem kann eine Inaktivierung des Tumorsuppressors p53 nach RAF/RAS-Aktivierung den seneszenten Zustand vermeiden und zur Tumorbildung führen [128, 129]. Wertet man z.B. die Mutation von BRAF als erste genetische Veränderung im Sinne des unter 1.1.1 beschriebenen *Two-hit*-Modells der Entstehung von Tumoren, könnte die Expression von Brn3a die für die Transformation nötige zweite Veränderung der Zelle darstellen. Essentielle Faktoren für DNA-Replikation und Zellteilung waren bei Brn3a-Hemmung reduziert, darunter Kif11, Topoisomerase 2 α oder Thymidilatsynthase S (siehe Abbildung 29 B im Anhang und 4.2.2.2). Für Kif11 wurde dabei die direkte Regulation durch Brn3a gezeigt. Es ist vorstellbar, dass Brn3a wichtige akzessorische Moleküle zur Verfügung stellt, um das RAS/RAF-induzierte Proliferationssignal umzusetzen und so onkogenvermittelte DNA-Schäden sowie die Aktivierung von p53 in Melanomzellen vermeidet. Experimente zur funktionellen Charakterisierung von Brn3a, die dieser Theorie zugrunde liegen, werden im Folgenden diskutiert.

4.2 Funktionelle Charakterisierung von Brn3a in Melanomzellen

4.2.1 Hemmung von Brn3a aktiviert den Tumorsuppressors p53

In neuronalen Zellen, vor allem in der neuronalen Zelllinie ND7, wurden verschiedene Möglichkeiten der Interaktion von Brn3a mit dem Tumorsuppressor p53 beschrieben. Die direkte transkriptionelle Regulation des antiapoptotischen Bcl-2 durch Brn3a zum Beispiel kann durch die Expression des Tumorsuppressors p53 verhindert werden, wobei Brn3a und p53 durch Protein-Protein-Interaktion interagieren [69]. Diese Zusammenhänge zwischen Brn3a und p53, sowie die Eingangs beschriebene Verwandtschaft von neuronalen Zellen und Melanozyten waren der Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Charakterisierung von Brn3a in Zellen des malignen Melanoms.

Obwohl das maligne Melanom ein sehr Chemo- und Strahlenresistenter Tumor ist, ist p53 hier selten durch Mutationen inaktiviert. Eine Möglichkeit zur Erklärung dieser Diskrepanz wäre eine Inaktivierung von p53 durch Brn3a über Protein-Protein-Wechselwirkung. Als erster Ansatz zur Aufklärung des Zusammenhangs zwischen Brn3a und p53 in Melanomzellen wurde daher versucht, durch Ko-Immünpräzipitation die Bindung von Brn3a an p53 in unbehandelten Melanomzellen nachzuweisen. Versuche mit einem p53-spezifischen Antikörper zeigten eine effiziente Präzipitation des Antikörper-Protein-Komplexes und eine selektive Entfernung von p53-Protein aus dem Gesamtzelllysat in zwei unabhängigen Experimenten (Daten nicht gezeigt). Im Immunoblot konnte jedoch zu keinem Zeitpunkt Brn3a in der separierten p53-Fraktion nachgewiesen werden. Die direkte Bindung von Brn3a an p53 in Melanomzellen konnte somit nicht bestätigt werden und wurde daher in den folgenden Untersuchungen nicht mehr berücksichtigt.

Die primäre Reaktion von Melanomzellen auf die Hemmung von Brn3a war wie oben beschrieben ein p53-abhängiger Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus. Als eine mögliche Ursache hierfür wurde in der Folge ein indirekter Zusammenhang zwischen Brn3a und p53 in Form eines aus der Hemmung von Brn3a resultierenden DNA-Schadens untersucht. Tatsächlich wurde nach der Hemmung von Brn3a in 1205Lu-Melanomzellen die Aktivierung von Schlüsselmolekülen des DNA-Schaden-Signalwegs beobachtet. Dazu gehörten unter anderem die Bildung von Mre11- und Rad50-beinhaltenen Komplexen (Foci) zur Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen, die daran anknüpfende Phosphorylierung der Kinasen ATM und Chk2 und schließlich die Phosphorylierung von p53 an den mit DNA-Schäden assoziierten Serinen 15 und 20. Phosphorylierungen des p53-Proteins gehören zu den Modifikationen, die eine Interaktion mit Mdm2 und damit den proteasomalen Abbau von p53 verhindern können. Eine Akkumulation von p53 in der Zelle war die Folge (siehe Abbildung 19 B).

Zusammengefasst zeigt dieser Teil der Arbeit neue, indirekte Zusammenhänge zwischen Brn3a und p53, die sich von den bisher in der Literatur beschriebenen Interaktionen unterscheiden. Es ist anzumerken, dass die Experimente bezüglich der Aktivierung von p53 durch ein DNA-Schaden-Signal jedoch rein deskriptiver Art sind. Ein kausaler Zusammenhang, wie zum Beispiel durch die Hemmung von Faktoren wie ATM oder Chk2, die zur Signaltransduktion nötig sind, wurde nicht nachgewiesen, da es sich um einen klassischen, bereits eingehend beschriebenen Signalweg handelt. Es wurde stattdessen versucht, einen Zusammenhang zwischen der Hemmung von Brn3a und der daraus resultierenden Entstehung eines DNA-Schadens in der Zelle zu finden. Dabei wurde der beschriebenen Funktion von Brn3a als Transkriptionsfaktor Rechnung getragen.

4.2.2 Identifikation von transkriptionellen Brn3a-Zielgenen in Melanomzellen

4.2.2.1 Transkriptionelle Aktivität von Brn3a und Microarrayanalyse

Die transkriptionelle Aktivität von Brn3a wurde in Genreporterassays in verschiedenen Melanomzelllinien bestätigt. Der Einsatz von Brn3a-siRNAs verhinderte die transkriptionelle Aktivität um bis zu 90% (Abbildung 22 C). Basierend auf diesen Ergebnissen erschien die Durchführung einer genomweiten Microarrayanalyse sinnvoll. Dabei wurden Brn3a-siRNA-behandelte Zellen mit Kontroll-siRNA-behandelten Zellen verglichen. Es zeigte sich, dass der Anteil von Genen, die indirekt über p53 reguliert waren sehr hoch war. Um diese Gene auszuschließen wurden Ansätze mitgeführt, bei denen Zellen mit Brn3a- und p53-siRNA behandelt waren. Dieser Versuchsansatz erwies sich als erfolgreich um Veränderungen in der Transkription von p53-regulierten Genen auszuschließen. Beispielsweise wurde so die p53-vermittelte Induktion von p21 vollständig verhindert (siehe Abbildung 18 A und Tabelle 8). Nach der Sortierung von deregulierten Genen anhand ihrer veränderten Expression wurden zusätzlich ihre proximalen Promotorregionen auf das Vorkommen von potentiellen Brn3a-DNA-Bindestellen untersucht. Dabei wurde nach Sequenzen gesucht, für die eine Brn3a-Bindung bereits in der Literatur beschrieben worden war. Zusätzlich wurden zwei Brn3a-Matrizes der Genomatix Software MatInspector verwendet, die aus einer Anzahl von konservierten und austauschbaren Nukleotiden zusammengesetzt waren. Dennoch stützten sich auch diese Sequenzen auf die in der Literatur beschriebenen Bindestellen und setzen sich aus Variationen dieser Sequenzen zusammen. Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Anzahl an Brn3a-regulierten Genen wesentlich höher ist als in dieser Arbeit aufgezeigt, da die durchgeführte Promotoranalyse sich im Prinzip auf bereits publizierte Bindestellen beschränkte. Des Weiteren wurden nur proximale Promotorsequenzen auf die Anwesenheit von Brn3a-Bindestellen untersucht. Regulatorische Sequenzen wie Enhancer-Elemente oder

mögliche intronische Promotoren wurden nicht berücksichtigt. Ebenso wurden Gensymbole, denen bislang kein Genprodukt zugeordnet werden konnte, oder die nicht in der Literatur beschrieben worden waren, aus der endgültigen Kandidatenliste gestrichen. Es ist durchaus möglich, dass sich auch unter diesen unbekanntem ORFs oder hypothetischen Proteinen interessante Faktoren befinden könnten. Primäres Ziel des Experimentes war es jedoch, Brn3a-Zielgene sicher zu identifizieren. Überraschend war die Tatsache, dass keines der in der Literatur beschriebenen Brn3a-Zielgene zum Zeitpunkt der Analyse signifikant dereguliert war. Dies weist trotz der Verwandtschaft zwischen Melanozyten und neuronalen Zellen auf eine starke gewebe- oder zelltypabhängige Aktivität des Transkriptionsfaktors Brn3a hin.

4.2.2.2 Identifizierung des Brn3a-Zielgens KIF11 in Melanomzellen

Das Gen KIF11 kodiert für ein Spindelmotorprotein der Kinesinfamilie, welches wichtige Aufgaben hinsichtlich der Spindeldynamik in der eukaryotischen Zelle übernimmt. Das Kif11-Protein ist verantwortlich für die Anordnung und Separation der Chromosomen durch die Ausrichtung von Mikrotubuli während der Mitose, sowie für die Ausbildung einer bipolaren mitotischen Spindel. Eine Hemmung von Kif11 resultiert in einer defekten Migration des Zentrosoms und einer monoastralen Anordnung der Mikrotubuli. In einer Vielzahl von Tumoren, darunter Brust-, Darm- und Lungenkrebs sowie in Neoplasien des Uterus und der Ovarien wurde eine erhöhte Expression von Kif11 nachgewiesen, konform mit der Annahme, dass proliferierende Zellen erhöhte Mengen dieses Faktors für eine erfolgreiche Zellteilung benötigen [130]. Spezifische Inhibitoren für Spindelmotorproteine werden daher nach wie vor entwickelt und auf ihre Wirksamkeit in der Tumorthherapie getestet. So wurde 2008 auch über eine klinische Phase II-Studie mit dem Spindelinhistor Ispesinib bei Melanompatienten berichtet, die allerdings ohne sichtbaren Erfolg beendet wurde [131]. Wie Kif11 reguliert wird, ist somit eine wichtige Fragestellung bei Tumoren. Über die Regulation von Kif11 in Tumorzellen als auch in ihren gesunden Vorläufern ist aber wenig bekannt. Zwei Publikationen beschreiben indirekte Regulationsmechanismen [132, 133]. Diese Arbeit zeigt somit erstmals einen direkten Weg der transkriptionellen Regulation dieses Moleküls.

Experimentell konnte nachgewiesen werden, dass Kif11 nach Brn3a-Hemmung sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene deutlich reduziert war. Weiterhin konnte durch Genreporteranalysen gezeigt werden, dass Brn3a die Expression von Luziferase über zwei DNA-Bindestellen im KIF11-Promotor initiieren kann. Dennoch könnten andere Versuchsanordnungen verwendet werden, um die hier beschriebenen Vorgänge zu belegen. Denkbar wäre es, den kompletten KIF11-Promoter vor ein Reporter gen zu klonieren und Mutationen in die Brn3a-Bindestellen einzufügen. Der hier verwendete Ansatz weist in Hinblick auf die Aussage, dass KIF11 ein direktes transkriptionelles Zielgen von Brn3a ist, den

Nachteil auf, dass er die direkte Bindung des Brn3a-Proteins an die genannten DNA-Abschnitte nicht beweisen kann. Eine wirksame Strategie wäre hier das Verfahren der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP). Dabei wird die DNA der Zelle mit daran gebundenen Proteinen durch Aminogruppenmodifikation vernetzt. Anschließend wird ein spezifischer Antikörper verwendet um das Protein, z.B. Brn3a, und damit auch die daran gebundene DNA zu präzipitieren. Nach Aufreinigung des Komplexes und der Trennung von Protein und DNA könnte durch spezifische PCR untersucht werden, ob beispielsweise Brn3a-Protein und die Brn3a-Bindestellen des KIF11-Promotors zusammen im Komplex vorlagen. Der Beleg einer Bindung durch ChIP gelang allerdings nicht, da derzeit keine dafür geeigneten, kommerziell erhältlichen Brn3a-Antikörper verfügbar sind. Die ChIP-Analyse setzt voraus, dass der verwendete Antikörper das zu bindende Protein auch und gerade dann erkennt, wenn es in seiner DNA-bindenden Konformation vorliegt. Zudem konnte der im Immunoblot verwendete Antikörper das Brn3a-Protein erst effektiv erkennen, nachdem die Membran mit den darauf geblotteten Proteinen in Guanidiniisothiocyanat denaturiert wurde. Eine Möglichkeit die ChIP-Methode dennoch erfolgreich anzuwenden, wäre die Verwendung eines ektopisch exprimierten Brn3a-Proteins, welches ein zusätzliches Epitop enthält, beispielsweise einen sogenannten *Flag-tag*. Diese Aminosäuremodifikation am N- oder C-Terminus des Proteins ermöglicht die Bindung des markierten Proteins mit einem für die Markierung spezifischen Antikörper und umgeht so die Notwendigkeit eines ChIP-gerechten Antikörpers. Diese Methodik setzt jedoch voraus, dass das markierte Protein nicht durch die Markierung in seinen natürlichen Aufgaben behindert wird.

Bezüglich der Einordnung des Kif11-Proteins in den hier vorgeschlagenen Signalweg durch Phänokopieexperimente ergab sich ein weitgehend klares Bild: Sowohl die Hemmung von Brn3a, als auch die Hemmung von Kif11 in Melanomzellen resultierte in DNA-Schäden und der Aktivierung des Tumorsuppressors p53. Ein Unterschied zeigte sich allerdings im Muster des daraus resultierenden Zellzyklusarrests. Während Brn3a-gehemmte Zellen in der G1-Phase arretiert wurden, zeigten sich nach Kif11-Hemmung Ansammlungen von Zellen in der G1- als auch in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Es ist bekannt, dass die Inhibition von Kif11 in p53-defizienten Zellen wie HeLa einen G2/M-Arrest bewirkt. Die Ergebnisse dieser Arbeit stellen die Auswirkungen einer Kif11-Hemmung in p53-kompetenten Melanomzellen dar: einen durch DNA-Schäden ausgelösten, p53-abhängigen Arrest in der G1-Phase und den in der Literatur beschriebenen Arrest in der G2/M-Phase. Eine naheliegende Erklärung für diesen Phänotyp wäre, dass durch die Reduktion von Kif11 nach Brn3a-Hemmung eine weitere Mitose der Zelle möglich ist, diese aber zu DNA-Schäden aufgrund von Fehlern in der Chromosomenanordnung und -segregation führt, die im beobachteten G1-Arrest durch p53 enden. Das allerdings kein G2/M-Arrest nach Brn3a-Hemmung beobachtet wurde, könnte an einer Dosisabhängigkeit des Effektes liegen, der nach einer Reduktion oder

Hemmung von Kif11 in der Zelle beobachtet wurde. Abbildung 25 A zeigt, dass die Kif11-mRNA nach der Brn3a-Hemmung signifikant weniger reduziert war, als nach der Hemmung von Kif11 durch die Kif11-spezifische siRNA. Dies zeigte sich in abgeschwächter Form auch im Immunoblot für das Kif11-Protein (Abbildung 25 B), wobei anzunehmen ist, dass die wesentlich höhere Sensitivität der qRT-PCR eine genauere Aussage zulässt. In p53-defizienten Zellen oder in Experimenten, in denen Kif11 und p53 zusammen inhibiert wurden, konnten DNA-geschädigte Zellen dagegen vermutlich erneut in die S-Phase des Zellzyklus eintreten und wurden dann aufgrund der andauernden Hemmung von Kif11 schließlich in G2/M arretiert. Wie aber der DNA-Schaden nach Brn3a- bzw. Kif11-Hemmung im Detail zustande kommt, muss in weiteren Experimenten untersucht werden.

Eine andere Erklärung für den nach Brn3a-Hemmung auftretenden G1-Arrest könnte sein, dass Brn3a eine Vielzahl von Genen in Melanomzellen reguliert, die diesen Phänotyp modulieren. Besonders interessant erscheinen hier Gene, die für die DNA-Replikation der Zelle essentiell sind. Hier fiel die p53- und Kif11-unabhängige Reduktion der mRNA der Gene TOP2A (Topoisomerase 2 α) und TYMS (Thymidilatsynthase S) auf, wie ergänzend in Abbildung 29 B Anhang gezeigt. Da für diese beiden Gene allerdings keine bekannten Brn3a-DNA-Bindestellen in ihren proximalen Promotoren gefunden werden konnten, wurden sie vorerst nicht weiter untersucht.

4.3 Transformierende Eigenschaften von Brn3a

In gesundem Gewebe sorgt ein Gleichgewicht aus wachstumsfördernden und wachstumshemmenden Signalen für eine gleichbleibende Zellzahl. Durch diese Gewebemöostase wird unkontrolliertes Wachstum und damit Tumorbildung verhindert. Die antiproliferativen Signale schließen dabei neben löslichen Faktoren auch solche ein, die in immobilisierter Form die Zelle umgeben: Bestandteile der extrazellulären Matrix und membranständige Moleküle benachbarter Zellen [1]. Von ihnen ausgehende Signale werden über Transmembranrezeptoren aufgenommen und über intrazelluläre Signalkaskaden weitergeleitet. Wachstumshemmende Signale von außerhalb der Zelle können dabei unterschiedliche Effekte haben. Zellen können einerseits in die Ruhephase G0 des Zellzyklus übergehen, aus der sie durch wachstumsfördernde Signale wieder in den Zellzyklus zurückkehren können. Eine andere Möglichkeit ist der Übergang in das postmitotische Stadium der terminalen Differenzierung unter Ausbildung typischer zellulärer Strukturen, wie im Fall von Melanozyten zum Beispiel die Ausbildung von Dendriten. Eine dritte Möglichkeit ist die Induktion von Apoptose, ausgelöst durch den Verlust von Zell-Zell- oder Zell-Matrix-Kontakten, genannt Anoikis [134]. Tumorzellen haben einen Weg gefunden sowohl Zellzyklusarrest, terminale Differenzierung als auch die Induktion von Apoptose nach

dem Verlust der Substratbindung zu umgehen. Das sogenannte ankerunabhängige Wachstum ist dabei ein Merkmal der malignen Transformation. Weiterhin gehören dazu serumunabhängiges Wachstum oder die Ausbildung von Tumoren *in vivo*.

Die Transduktion von primären Zellen der Haut mit Brn3a-exprimierenden Lentiviren führte zu erhöhtem Wachstum und Koloniebildung in *Soft-agar*, einem Medium welches keine Adhäsion von Zellen zulässt. Dies wurde in primären Melanozyten und in primären Fibroblasten gezeigt. Die Koloniezahl und das fluorimetrisch quantifizierte Wachstum erreichten dabei allerdings nie die Dimensionen der als Kontrolle mitgeführten 1205Lu-Melanomzellen. Es ist daher zu vermuten, dass zusätzliche Faktoren für die Tumorbildung erforderlich sind. Die Erfolgsaussichten eines Versuchs, bei dem Brn3a-exprimierende Fibroblasten oder Melanozyten zur Untersuchung der Tumorbildung in immundefiziente Mäuse injiziert werden, scheinen daher eher gering. Tatsächlich gelingt es auch unter Verwendung von Melanomzellen aus der radiären oder sogar vertikalen Wachstumsphase nur selten, solide Tumoren in Nacktmäusen zu induzieren [135]. Vielversprechender scheint es dagegen proliferationsfördernde Faktoren wie BRAF oder N-RAS zusammen mit Brn3a stabil in primäre Zellen einzubringen. Synergistische Expression von BRAF und Brn3a könnte den Übergang der Zellen in onkogenvermittelte Seneszenz durch proliferativen Stress verhindern und so zur Bildung von Tumoren führen. Die bereits 1993 von Theil et al. erhobenen Daten zur Tumorbildung in Nacktmäusen durch synergistisches Wirken von Brn3a und H-RAS lassen den Erfolg eines solchen Experiments noch realistischer erscheinen [49].

4.4 Klinisches Potential von Brn3a

4.4.1 Brn3a als möglicher Biomarker für das maligne Melanom

Das maligne Melanom exprimiert eine Vielzahl von Faktoren, die auch in Tumoren epithelialen, mesenchymalen, hämatologischen oder neuronalen Ursprungs gefunden werden. Über immunhistochemische Untersuchungen kann anhand der Expressionsmuster von Tumor- bzw. Gewebemarkern zwischen verschiedenen Tumorarten oder auch zwischen benignen und malignen Tumoren unterschieden werden [136]. Der am weitesten verbreitete Biomarker zum Nachweis des malignen Melanoms ist das Protein S100 [137]. Da der Nachweis dieses Proteins eine sehr hohe Sensitivität aufweist, aufgrund der Expression dieses Faktors in Nervenscheidenzellen-, Myoepithelialzellen, Langerhanszellen und Adipozyten als auch in malignen Varianten dieser Zellen aber eine eingeschränkte Spezifität zeigt, werden in der Praxis weitere Proteine nachgewiesen. Dazu gehören unter anderem HMB45 (das prä-melanosomale Glykoprotein gp100), MART-1 (*Melanoma antigen*

recognized by T-cells, Melan-A) und der Proliferationsmarker Ki67, welcher für die Unterscheidung zwischen ruhenden benignen Zellen, z.B. in melanozytären Nävi und proliferierenden malignen Zellen, wie im Melanom herangezogen werden kann [138]. Gerade aber die Unterscheidung zwischen melanozytären Nävi und frühen Melanomen ist bis heute nur eingeschränkt möglich. Zusätzliche Möglichkeiten der Unterscheidung werden daher benötigt. Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten eine signifikant erhöhte Expression von Brn3a in 77% (mRNA) respektive 92% (Protein) der untersuchten Melanomzelllinien. Kultivierte primäre Zellen der Haut, darunter Keratinozyten, Fibroblasten und Melanozyten von jeweils 3 bzw. 5 verschiedenen Spendern zeigten keine oder nur sehr geringe Expression von Brn3a auf mRNA-Ebene. Im Immunoblot war Brn3a-Protein in primären Melanozyten kaum detektierbar. Immunhistochemische Analysen an Patientenproben zeigten eine Expression von Brn3a in 4 von 6 (67%) untersuchten primären Melanomen *in situ*, aber keine Expression in melanozytären Nävi (0 von 4). Diese Ergebnisse weisen auf ein mögliches Potential für die Verwendung von Brn3a als neuen Tumormarker für das maligne Melanom hin. Weitere immunhistochemische Untersuchungen mit einer größeren Anzahl von Proben sind jedoch unbedingt erforderlich um diese Vermutung zu belegen. Unterstützend für die im Zuge dieser Arbeit gewonnenen Daten wurden über die frei zugängliche internetbasierte Datenbank Geo Profiles (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) Microarraydatensätze hinsichtlich der Expression von Brn3a im malignen Melanom analysiert [139]. Hierbei handelt es sich nicht um thematisch mit Brn3a verbundene Daten, sondern beispielsweise um vergleichende Untersuchungen des Transkriptoms von Proben aus gesunder Haut, melanozytären Nävi und Tumormaterial, die vor dem Hintergrund anderer Fragestellungen von anderen Arbeitsgruppen generiert wurden. Diese Datensätze können über eine Eingabemaske in einfacher Weise bezüglich bestimmter Gene durchsucht werden. Die mit einer Anzahl von 77 Proben umfangreichste Untersuchung zum Melanom von Talantov et al. (2005) (GEO Accession GDS1375) zeigte eine Expression von Brn3a in 58% (26 von 45) der untersuchten Melanombiopsien und eine wesentlich geringere Expression in benignen melanozytären Nävi (17%, 3 von 18) und in gesunder Haut (14%, 1 von 7) [140]. Eine weitere Studie mit allerdings deutlich geringerer Probenanzahl zeigte eine Brn3a-Expression in 50% der untersuchten Melanombiopsien (GEO Accession GDS 1965) [141]. In Übereinstimmung mit den eigenen Daten konnte auch hier keine Korrelation der Brn3a-Expression mit dem Progressionsstadium des Tumors gefunden werden. Ein Einsatz dieses Faktors zur Unterscheidung von benignen und malignen Zellen wäre also für das Melanom denkbar.

4.4.2 Bedeutung der tumorspezifischen Expression von Brn3a für neue therapeutische Ansätze

Ein zielgerichteter Angriff auf Moleküle, die essentiell für die Zellteilung oder das Überleben der Tumorzelle sind, oder aber die Invasion von Fremdgewebe und damit die Tumormetastasierung fördern, verspricht eine selektive und effektive Therapie der Tumorerkrankung [142, 143]. Dies setzt voraus, dass möglichst kein gesundes Gewebe in Mitleidenschaft gezogen wird, wie dies bei fast allen gängigen Chemotherapeutika der Fall ist. Neben der Erprobung neuer Chemotherapeutika und Kombinationen mit immunologischen Komponenten sollte also die Entwicklung von Therapeutika, die spezifische Strukturen von Tumorzellen angreifen besonders verfolgt werden.

Ergebnisse dieser Arbeit zu Brn3a im malignen Melanom geben Anlass zur Hoffnung, mit diesem Faktor eine neue therapeutische Zielstruktur entdeckt zu haben, die einen relativ gewebespezifischen Eingriff in die Erkrankung erlaubt. Expressions- und Funktionsanalysen zeigten, dass eine Inhibition dieses Faktors nur Zellen des Tumors beeinträchtigen dürfte, da kultivierte primäre Zellen der Haut und ruhende, melanozytäre Nävi nachweislich kein Brn3a exprimierten. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Brn3a-Hemmung durch siRNAs nur in Brn3a-exprimierenden Tumorzellen Effekte zeigt, wohingegen Brn3a-negative Zellen von einer Brn3a-Inhibition nicht beeinträchtigt sind (siehe Abbildungen 7 C und 15). Die Vitalität von WM3211-Melanomzellen, die kein Brn3a exprimierten und auch keine transkriptionelle Aktivität von Brn3a zeigten, wurde nicht durch die Transfektion mit Brn3a-spezifischen siRNAs beeinflusst. Eine prinzipielle Transfizierbarkeit dieser Zelllinie mit siRNAs und Plasmid-DNA wurde mehrfach nachgewiesen und ist ergänzend im Anhang in Abbildung 30 dargestellt. Zusätzlich zur Brn3a-negativen Zelllinie WM3211 wurden auch primäre Melanozyten mit Brn3a-spezifischen siRNAs behandelt. Auch hier konnte keine Reduktion der Zellvitalität oder eine Induktion von Apoptose beobachtet werden. Da Melanozyten allerdings als schwer durch Lipofektion transfizierbar gelten, hat dieses Experiment eher ergänzenden Charakter.

4.4.3 Bewertung des therapeutischen Effekts der Brn3a-Hemmung

Wie oben erwähnt reduzierte die Hemmung von Brn3a in drastischer Weise die Vitalität von Melanomzellen *in vitro*. Dabei wurden je nach Zelllinie bis zu 80% tote Zellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen registriert. Auf dem Weg von der Entdeckung einer neuen therapeutischen Zielstruktur bis hin zur Entwicklung eines spezifischen Therapeutikums stellen diese Ergebnisse jedoch erst eine initiale wenn auch eine grundlegende Stufe dieses Prozesses dar. Zudem muss der Nachweis einer ausreichenden Wirkung des neuen Therapeutikums in präklinischen Modellen *in vivo* getestet werden. Im Rahmen eines

solchen *in vivo*-Experiments (siehe Abbildung 8) wurde bei Brn3a-siRNA-behandelten Tieren eine statistisch signifikante Reduktion des Tumorwachstums um 40-45% festgestellt. Ebenso konnte durch qRT-PCR nachgewiesen werden, dass Brn3a-mRNA in Tumoren von Brn3a-siRNA behandelten Tieren erfolgreich um bis zu 50% reduziert wurde. Obgleich keine vollständige Reduktion der Tumoren erzielt werden konnte, ist das Ergebnis dieses ersten Versuchs durchaus vielversprechend. Die systemische Applikation von siRNAs *in vivo* ist aufgrund des schnellen Abbaus oder frühzeitiger Ausscheidung des Wirkstoffes mit Schwierigkeiten verbunden. Trotzdem konnte eine Reduktion des Tumorwachstums und die Hemmung des Zielmoleküls im Zielgewebe nachgewiesen werden. Angesichts der Brn3a-Hemmung von 70% *in vitro* (Abbildung 6 A) erscheint eine Hemmung von 50% *in vivo* zudem als relativ effektiv. In weiteren Studien müssen jedoch weitere Brn3a-spezifische siRNAs und weitere Kontrollen, wie etwa eine Gruppe ohne Oligonukleotid-Behandlung, eingeschlossen werden. Darüber hinaus könnten eine systemische Gabe über die Schwanzvene der Tiere, sowie chemische Modifikationen zur Erhöhung der Stabilität der siRNAs Möglichkeiten darstellen, die Ergebnisse dieses Versuchs zu optimieren.

4.4.4 Verwendung von siRNAs für funktionelle Untersuchungen und die Entwicklung therapeutischer Ansätze

Die Hemmung von Brn3a in Brn3a-exprimierenden Melanomzellen führte nach Zellzyklusarrest und Induktion von Apoptose zu einer erheblichen Reduktion der Vitalität dieser Zellen. Eine unerwünschte unspezifische Wirkungsweise durch Immunstimulation, wie etwa die Induktion von Typ-1-Interferonen nach Transfektion mit Brn3a-siRNAs oder Kontroll-siRNAs wurde durch qRT-PCR ausgeschlossen (Anhang Abbildung 29 A). Ein grundsätzliches Problem bei der Verwendung von siRNAs ist die Spezifität der Genhemmung [144]. Sogenannte *Off-target*-Effekte beschreiben die zusätzliche, unerwünschte Hemmung von mRNA-Sequenzen anderer Gene als der des Zielgens durch die verwendeten siRNAs. Die Spezifität der verwendeten siRNAs soll in der gängigen Praxis durch verschiedene Maßnahmen gewährleistet werden. Jede siRNA-Sequenz wird durch internetbasierte, genomweite DNA-Datenbanken (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) auf die Einzigartigkeit ihrer Bindung an die Ziel-mRNA überprüft. Trotzdem können teilweise bindende Abschnitte der siRNA zu unerwünschten Hemmungen anderer Gene führen. Wichtige Kontrollen sind deshalb 1. die Verwendung von mindesten zwei verschiedenen siRNA-Sequenzen gerichtet gegen das gleiche Gen, 2. die Kontrolle der Genhemmung mit einem oder mehreren Kontroll-RNA-Oligonukleotiden (Kontroll-siRNA), 3. die oben genannte Prüfung einer Immunantwort nach Transfektion der siRNA und 4. die Verwendung der geringsten wirksamen siRNA-Konzentration. Eine aufwändige, aber sehr hochwertige Kontrolle ist die ektopische

Expression von siRNA-resistenten Mutanten des Zielgens in den mit siRNAs zu behandelnden Zellen [145, 146], gezeigt in den in Abbildung 12 dargestellten *Rescue*-Versuchen. Hebt die Expression des mutierten Zielproteins die Wirkung der siRNAs auf, ist die Relevanz des Zielmoleküls bewiesen. Diese Kontrolle wurde für beide Brn3a-siRNA-Sequenzen durchgeführt, womit die Rolle von Brn3a in Bezug auf den Zellzyklusarrest klar bewiesen wurde. Aufgrund der in dieser Arbeit mitgeführten Kontrollen ist eine unspezifische Wirkung der Brn3a-Hemmung durch RNA-Interferenz nach heutigen wissenschaftlichen Standards sehr unwahrscheinlich.

Zusammengefasst birgt die Hemmung von Brn3a sowohl durch ihre Wirkung als auch durch ihre Spezifität großes Potential für die Entwicklung eines therapeutischen Ansatzes für die Behandlung des malignen Melanoms. Da therapeutische Ansätze unter Verwendung von siRNAs jedoch zum einen mit den oben genannten Problemen behaftet sind, zum anderen hinsichtlich ihrer Stabilität und Bioverfügbarkeit bei systemischer Gabe schlecht abschneiden, wäre die Entwicklung und Erprobung alternativer Hemmstrategien für Brn3a ein lohnendes Ziel. Alternativen zur Hemmung durch siRNAs stellen beispielsweise *Decoy*-Oligonukleotide (dt.: Lockvogel) dar, die zur Hemmung von Transkriptionsfaktoren eingesetzt werden können. Es handelt sich dabei um doppelsträngige DNA-Oligonukleotide mit einem einfachen, aber effektiven Wirkmechanismus: Transkriptionsfaktoren binden sequenzabhängig an bestimmte Basenabfolgen der DNA. Werden *Decoy*-Oligonukleotide mit eben dieser Zielsequenz in die Zelle eingebracht, so steigt die Anzahl der für den Transkriptionsfaktor vorhandenen Bindungsmöglichkeiten mit steigender Konzentration des Oligonukleotids in der Zelle an, und seine Bindung an Sequenzen der genomischen DNA der Zelle sinkt. Durch diese Konkurrenz der Bindestellen kommt es zu einer deutlich verringerten Regulation von transkriptionellen Zielgenen des Transkriptionsfaktors. Auch zur Entwicklung von Tumortherapeutika werden *Decoy*-Oligonukleotide z.B. gegen den Transkriptionsfaktor STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*) entwickelt. Hier konnte eine effektive Inhibition der transkriptionellen Aktivität von STAT3 und eine damit zusammenhängende Reduktion seiner antiapoptotischen, proliferations- und angiogenesefördernden Zielgene nachgewiesen werden [147]. Im unmittelbaren Vorfeld einer klinischen Studie mit diesem Wirkstoff wurde das STAT3-*Decoy*-Oligonukleotid vor kurzem bereits in nichthumanen Primaten der Gattung *Cynomolgus* in Hinsicht auf Toxizität nach lokaler und systemischer Gabe getestet [148]. Erste Versuche mit Brn3a-*Decoy*-Oligonukleotiden in Melanomzellen, basierend auf der von Gruber et al. (1997) veröffentlichten Brn3a-Konsensussequenz zeigten eine sequenzspezifische und effektive Induktion von Apoptose und eine daraus resultierende stark verminderte Vitalität von Melanomzellen (Daten nicht gezeigt). Die Untersuchung des hier neu beschriebenen

transkriptionellen Brn3a-Zielgens KIF11 in *Decoy*-transfizierten Zellen wäre eine Möglichkeit, dieses Projekt weiterzuführen.

Eine weitere Möglichkeit wären Versuche mit dem *Small-molecule*-Inhibitor DB293, entwickelt von einer französischen Gruppe um Dr. David-Cordonnier am Institut de Recherches sur le Cancer de Lille. DB293 kann als Monomer oder Dimer sequenzspezifisch an bestimmte DNA-Abschnitte binden. Dadurch wurde die DNA-Bindung und Aktivität der POU-Faktoren Pit-1 und Brn3 (Brn3a, -b und -c) unterbunden [149]. Trotz dieser Einschränkung hinsichtlich seiner Spezifität, könnten Versuche mit diesem Inhibitor in Melanomzellen die siRNA-basierten Ergebnisse vervollständigen.

4.4.5 Therapeutischer Aspekt der p53-Aktivierung

Die Hemmung von Brn3a in Melanomzellen resultierte in zwei biologischen Effekten, die die Vitalität der Tumorzellen drastisch verringerten:

Einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase als Folge eines DNA-Schadens und der Induktion mitochondrialer Apoptose, wahrscheinlich als Folge eines irreparablen DNA-Schadens. Sowohl Zellzyklus als auch Apoptose können der Kontrolle des Tumorsuppressors p53 unterliegen. Dieser als „Beschützer des Genoms“ bezeichnete Faktor ist in gesunden Zellen normalerweise inaktiv, kann aber schon nach einem einzigen DNA-Doppelstrangbruch innerhalb kurzer Zeit aktiviert werden [150]. In der Mehrzahl aller Tumorerkrankungen wird eine p53-Aktivierung verhindert, beispielsweise durch Mutationen im TP53-Gen oder durch posttranslationale Modifikation des p53-Proteins selbst, sowie seiner Interaktion mit anderen Proteinen [150, 151]. DNA-Schäden werden dann nicht detektiert, nicht repariert, und somit an die nächste Generation von Zellen weitergegeben. Dadurch kommt es zu genetischer Instabilität, die die maligne Transformation von Zellen fördert. In Tumoren wie dem malignen Melanom, in denen p53 nicht direkt durch Mutation inaktiviert ist, besteht die Möglichkeit, diesen Faktor und seine Eigenschaften, wie etwa Zellzykluskontrolle oder Apoptoseinduktion, zu nutzen [152, 153]. Dennoch ist dieser Tumor gegenüber Behandlungsmethoden wie Bestrahlung oder Chemotherapie, die eine Aktivierung von p53 fördern sollen, resistenter als viele andere Tumoren [154]. Man geht daher davon aus, dass das p53-Protein in Melanomzellen funktionell inaktiviert ist und so zu seiner Chemo- und Strahlenresistenz beiträgt. Wie diese Inaktivierung allerdings zu Stande kommt, ist nicht vollständig geklärt. Eine Überexpression des p53-inaktivierenden Faktors Mdm2 ist dabei eine wahrscheinliche Variante [155].

Nach der Hemmung von Brn3a in Melanomzellen kam es zu einem starken Anstieg von p53-Protein, welcher jedoch nicht auf eine verstärkte Transkription des TP53-Gens zurückzuführen war, sondern auf die Stabilisierung von p53 auf Proteinebene. Grund für die

Stabilisierung war höchstwahrscheinlich die Phosphorylierung von p53 an den Serinen 15 und 20 die für die Interaktion mit der Ubiquitinligase Mdm2 nötig sind. Die Ubiquitinierung und damit der proteasomale Abbau von p53 werden auf diese Weise verhindert und p53-Protein kann in der Zelle akkumulieren. Der Anstieg von p53-Protein in Melanomzellen resultierte in einer klaren Aktivierung von p53-regulierten Genen, wie etwa dem für den Zellzyklus-Inhibitor p21 kodierenden CDKN1A. Der dadurch ausgelöste Zellzyklusarrest in der G1-Phase konnte eindeutig auf die Aktivität von p53 zurückgeführt werden (siehe Abbildung 18). Die im Anschluss beobachtete mitochondriale Apoptose geht wahrscheinlich ebenfalls auf die Aktivität des Tumorsuppressors zurück, mit dem Zweck, irreparabel DNA-geschädigte Zellen zu eliminieren. Die hier beobachteten Effekte wie Proliferationsstopp und Apoptose machen eine Aktivierung von p53 zum Ziel vieler therapeutischer Ansätze in der Behandlung von Tumoren. Aktuelle Studien belegen das Potential einer p53-Aktivierung durch die Expression des WT-Moleküls in p53-defizienten Tumoren [156] oder die selektive Reaktivierung des Tumorsuppressors durch sogenannte *Small-molecule*-Inhibitoren [157]. Der Aspekt der p53-Aktivierung nach Brn3a-Hemmung spielt daher eine wichtige Rolle bei der Evaluierung von Brn3a als neue therapeutische Zielstruktur im malignen Melanom.

4.5 Ausblick

4.5.1 Expression von Brn3a beim malignen Melanom

Eine Expression von Brn3a wurde in Melanomgeweben im Gegensatz zu melanozytären Nävi gefunden. Ergänzend zu den im Zuge der Expressionsanalyse unternommenen immunhistochemischen Untersuchungen sind weiterführende Studien an größeren Patientenkollektiven geplant, um die klinische Relevanz von Brn3a im malignen Melanom näher zu charakterisieren. Besonders interessant für die Verwendbarkeit als Biomarker wäre eine mögliche Assoziation mit prognostischen Faktoren mit Bezug auf Tumor- und Patientendaten. Auch eine mögliche Korrelation von Brn3a-Expression mit dem Vorhandensein von immunhistochemisch gut darstellbaren DNA-Schäden wäre sinnvoll.

Ein weiterer wichtiger Punkt wäre die Untersuchung der Ursache der Brn3a-Expression in Melanomzellen. Die Expressionsanalyse zeigte eine deutliche transkriptionelle Aktivierung dieses Faktors in malignen Zellen. Über die transkriptionelle Regulation von Brn3a ist allerdings nichts bekannt. Eine eingehende Promotoranalyse zur Identifizierung von Transkriptionsfaktoren die Brn3a regulieren wäre sinnvoll, auch unter dem Gesichtspunkt, dass sich hier weitere tumorspezifische therapeutische Eingriffsmöglichkeiten eröffnen könnten. Des Weiteren wäre die Identifizierung von möglicherweise aktivierenden Mutationen in Brn3a-Promotor oder Brn3a-Gen durch Sequenzanalysen sinnvoll.

4.5.2 Funktion von Brn3a beim malignen Melanom

Mit der Beschreibung der Regulation des KIF11-Gens durch Brn3a und den damit verbundenen Auswirkungen auf die Proliferation und das Überleben von Melanomzellen konnte ein Teil des Wirkmechanismus von Brn3a aufgeklärt werden. Allerdings ist damit die Funktion von Brn3a in Melanomzellen nicht vollständig beschrieben. Eine Vielzahl Brn3a-regulierter Gene, vornehmlich aus den Bereichen DNA-Replikation und Zellzyklus wurde identifiziert, aber bis jetzt nicht weiter untersucht. Wie oben erwähnt, konnte eine stark reduzierte Expression der für die DNA-Replikation essentiellen Gene TOP2A und TYMS nach Hemmung von Brn3a nachgewiesen werden. Topoisomerase-Inhibitoren (z.B. Irinotecan, Etoposid) und TYMS-Inhibitoren (z.B. 5'-Fluorouracil (5-FU), Capecitabine) stellen grundlegende Therapeutika bei Krebserkrankungen dar [158]. Im Vergleich zu diesen Stoffen hätten Brn3a-Inhibitoren den großen Vorteil einer potentiell gewebespezifischen Wirkung in Brn3a-exprimierenden Zellen. Wie Brn3a diese Gene in Melanomzellen reguliert, bedarf weiterer Untersuchungen. Sie wurden nach der Microarrayanalyse nicht als potentielle direkte Zielgene von Brn3a behandelt, da in ihren proximalen Promotoren keine bekannten Brn3a-DNA-Bindestellen gefunden werden konnten.

4.5.3 Synergismen zwischen proliferativen Stimuli und Brn3a-Expression bei der Bildung von Tumoren

Die lentivirale Transduktion von primären Zellen der Haut mit Brn3a-exprimierenden Konstrukten führte zu ankerunabhängigem Wachstum dieser Zellen in *Soft-agar*. Dieses Merkmal transformierter Zellen ist aber nur einer von mehreren Faktoren bei der Tumorigenese. Nachweise des Wachstums unter Serumentzug oder die Fähigkeit zur Tumorbildung im Mausmodell nach Expression von Brn3a in nicht tumorigenen Zellen wären zwingend für die Einstufung von Brn3a als Onkogen.

Von großer Bedeutung wäre die Untersuchung, ob die Ko-Expression von Brn3a mit proliferationsstimulierenden Faktoren die Bildung von Tumoren ermöglicht. Bei alleiniger Expression von konstitutiv aktivem BRAF V600E zum Beispiel würde man nach initialem Wachstum einen schnellen Übergang der Zellen in onkogenvermittelte Seneszenz erwarten. Unter Ko-Expression mit Brn3a hingegen könnte dieser Zustand verhindert werden, da Brn3a für die schnelle Zellteilung essentielle Faktoren wie Kif11, Topoisomerase 2 α oder Thymidilatsynthase S zur Verfügung stellen könnte. Neben der Expression beider Faktoren in primären Melanozyten oder Fibroblasten wäre ein Versuch zur Expression von Brn3a in aus melanozytären Nävi gewonnenen Zellen, die in den meisten Fällen bereits eine proliferationsfördernde Mutation tragen, eine Möglichkeit diese Hypothese zu testen.

Zusammenfassung

Im Zuge der Embryogenese entsteht aus dem Neuroektoderm eine Vielzahl verschiedener Zelltypen, unter anderem sensorische Neuronen des peripheren Nervensystems aber auch Melanozyten, die pigmentproduzierenden Zellen der Haut. Aus transformierten Melanozyten entwickelt sich das maligne Melanom, der mit einer hohen Mortalitätsrate verbundene schwarze Hautkrebs. Eine Gemeinsamkeit von neuroektodermalen Tumoren und vieler anderer Neoplasien ist die Expression von Faktoren, die während der embryonalen Entwicklung essentiell für epithelial-mesenchymale Übergänge (EMT) oder die Proliferation und das Überleben der Zelle sind. Sie spiegeln den de-differenzierten Zustand der Tumorzelle wider, welcher dem einer embryonalen Zelle ähnelt. Die Kontrolle dieser embryonalen Vorgänge obliegt der zeitlich und räumlich streng regulierten Expression und Funktion von Transkriptionsfaktoren, die während bestimmter Phasen der Embryogenese nachgewiesen werden können, in adulten Stadien oder in differenzierten Zellen jedoch fehlen. Die Expression des neuronalen Transkriptionsfaktors Brn3a (POU4F1) ist in den frühesten postmitotischen Neuronen des zentralen Nervensystems messbar. In sensorischen Neuronen des peripheren Nervensystems wurde die Expression von Brn3a bereits in proliferierenden Vorläuferzellen, entstehend aus der Neuralleiste, beobachtet. Der Verlust von Brn3a führte in Mäusen zu gestörtem axonalem Wachstum und Fehlern in der Innervierung von neuronalen Zielregionen, sowie zur Induktion von Apoptose in späten embryonalen Stadien und zum Tod von neugeborenen Tieren. Auf molekularer Ebene wurde gezeigt, dass Brn3a sensorische Neuronen vor Apoptose schützen kann, indem es die Transkription antiapoptotischer Faktoren der Bcl-2-Familie fördert. Dies konnte in der aus sensorischen Neuronen gewonnenen Zelllinie ND7 durch die Expression des Tumorsuppressors p53 verhindert werden. Weiterhin ist bekannt, dass Brn3a mit p53 über direkte Protein-Bindung interagieren kann, um so die Transkription von apoptoseassoziierten Faktoren zu regulieren.

Zusätzlich zu seiner Expression in gesunden neuronalen Geweben wurde Brn3a auch in einer Reihe von Tumoren nachgewiesen, darunter im Cervix- und Prostatakarzinom sowie in aggressiven neuroendokrinen Tumoren wie dem Ewing'schen Sarkom und dem Neuroepitheliom. Die ektopische Expression von Brn3a konnte die Proliferation von Zellen des Cervixkarzinoms *in vitro* und *in vivo* steigern und auch die Expression des neuronalen Ionenkanals Nav1.7 in Zellen des Prostatakarzinoms *in vitro* erhöhen. Weiterhin konnte Brn3a in Ko-Expression mit aktiviertem H-Ras primäre Rattenfibroblasten transformieren.

Die Untersuchung von Brn3a in Zellen des malignen Melanoms erschien aus folgenden Gründen attraktiv:

1. Melanozyten und neuronale Zellen entstammen der gleichen embryonalen Struktur, dem Neuroektoderm.
2. Brn3a ist wichtig für den Schutz neuronaler Zellen vor Apoptose und ist deshalb potentiell tumorfördernd.
3. Brn3a kann den Tumorsuppressor p53 inaktivieren, der beim malignen Melanom normalerweise nicht direkt durch Mutation inaktiviert ist.

Expressionsanalysen ergaben eine deutlich erhöhte Expression von Brn3a-mRNA in mehr als 75% der getesteten Melanomzelllinien, wohingegen primäre Zellen der Haut, nämlich humane Fibroblasten, Keratinozyten und Melanozyten, sehr geringe oder gar keine Brn3a-Expression aufwiesen. Messungen von Brn3a-Protein in Melanomzellen und in primären Melanozyten im Immunoblot konnten diese Ergebnisse bestätigen, wobei 11 von 12 getesteten Melanomzelllinien eine erhöhte Expression von Brn3a zeigten. Immunhistochemische Untersuchungen von Gewebeproben aus primären Melanomen und melanozytären Nävi zeigten, dass Brn3a in malignen Melanomen *in situ* exprimiert war, nicht aber in den gutartigen melanozytären Tumoren der Haut.

Für funktionelle Untersuchungen wurde Brn3a mittels RNA-Interferenz in Melanomzellen gehemmt. Dies führte zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase gefolgt von der Induktion mitochondrialer Apoptose. Diese Effekte reduzierten die Vitalität von Melanomzellen *in vitro* um bis zu 80%. Sie wurden in verschiedenen Brn3a-exprimierenden Melanomzellen festgestellt, nicht aber in einer Brn3a-negativen Zelllinie und in primären Melanozyten. Die hohe Relevanz von Brn3a beim Melanom wurde *in vivo* bestätigt: In einem Mausmodell, bei dem bestehende subkutane Tumoren durch systemische Gabe von Brn3a-spezifischer siRNA therapiert wurden, war eine Reduktion des Tumorwachstums um 45-50% feststellbar.

Der beobachtete Zellzyklus Arrest und wahrscheinlich auch die nachfolgende Induktion von Apoptose nach Hemmung von Brn3a beruhte auf der Aktivierung des Tumorsuppressors p53. Während nach Brn3a-Hemmung der Zellzyklusarrest in der G1-Phase beobachtet wurde, wurde in gleichzeitig Brn3a- und p53-gehemmten Zellen eine normale Zellzyklusverteilung nachgewiesen. Die in der Literatur beschriebene Interaktion von p53 mit Brn3a auf Proteinebene konnte in Melanomzellen nicht bestätigt werden. Vielmehr wurde p53 über ein DNA-Schaden-Signal aktiviert: eine Aktivierung der Kinasen ATM und Chk2 führten zur erhöhten Phosphorylierung von p53 und damit zur Stabilisierung des p53-Proteins. Als Ursache hierfür wurden in Brn3a-gehemmten Zellen DNA-Doppelstrangbrüche identifiziert, die anhand der Bildung von Mre11/Rad50-haltigen Foci mikroskopisch detektiert wurden.

Um einen Zusammenhang zwischen dem Transkriptionsfaktor Brn3a und der Aktivierung des Tumorsuppressors p53 durch einen DNA-Schaden zu finden, wurden genomweite Microarrayanalysen zur Identifizierung von potentiellen transkriptionellen Zielgenen von Brn3a durchgeführt. Voraussetzung hierfür war der Nachweis der transkriptionellen Aktivität von Brn3a in Melanomzellen mittels Genreporteranalysen, als auch ihre anschließende Hemmung durch Brn3a-spezifische siRNAs. Im Microarrayexperiment wurden zunächst Brn3a-gehemmte Zellen mit Kontroll-Zellen verglichen. Um aber vor dem Hintergrund einer starken p53-Aktivierung nach Brn3a-Hemmung direkt von Brn3a regulierte Gene identifizieren zu können, wurden zusätzliche Ansätze mitgeführt, in denen sowohl Brn3a als auch p53 gehemmt wurde. Die Promotoren der identifizierten Gene wurden auf das Vorhandensein potentieller Brn3a-Bindestellen untersucht. Auf diese Weise wurde das Spindelmotorprotein Kif11 als neues transkriptionelles Zielgen von Brn3a identifiziert. Kif11-mRNA und -Protein waren nach Hemmung von Brn3a in Melanomzellen in p53-unabhängiger Weise reduziert. In Genreporteranalysen konnte weiterhin eine Abhängigkeit der Transkription des KIF11-Gens von zwei in seinem proximalen Promotor vorhandenen Brn3a-DNA-Bindestellen gezeigt werden. Eine funktionelle Einordnung von Kif11 in den nach Brn3a-Hemmung beobachteten Phänotyp erfolgte über den Nachweis eines DNA-Schadens und der Aktivierung von p53 nach der Hemmung von Kif11 durch eine Kif11-spezifische siRNA. In Melanomzellen wurde so ebenfalls ein p53-abhängiger Zellzyklusarrest in der G1-Phase ausgelöst. Es ist anzunehmen, dass Kif11 über diesen Weg zu dem nach Brn3a-Hemmung beobachteten Phänotyp beiträgt. Zusätzlich wurde bei Kif11-Hemmung ein Arrest in der G2/M-Phase festgestellt. Dieser beruht auf einer verhinderten Ausbildung der bipolaren mitotischen Spindel und ist in der Literatur eingehend beschrieben. Da dies bei Brn3a-Hemmung allerdings nicht beobachtet wurde, ist davon auszugehen, dass neben KIF11 auch andere Gene an dem Phänotyp nach Brn3a-Hemmung beteiligt sind.

Nach dem Nachweis der essentiellen Funktion von Brn3a in Melanomzellen wurde seine Rolle bei der Tumorentstehung untersucht. Brn3a wurde durch den Einsatz von Lentiviren in primären Fibroblasten und primären Melanozyten exprimiert. Diese zeigten nach Infektion mit Brn3a-Konstrukten eine erhöhte Expression des Brn3a-Zielgens KIF11 und deutliche Koloniebildung in *Soft-agar*-Experimenten. Dieses typische Merkmal transformierter Zellen lässt vermuten, dass Brn3a in Zellen des malignen Melanoms als Onkogen wirken kann und zur malignen Transformation beiträgt.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse haben Auswirkung auf das Verständnis des malignen Melanoms und zeigen großes Potential für die Entwicklung klinischer Anwendungen. Die Expression von Brn3a scheint den Übergang von benignen Vorstufen zu malignen Formen des Melanoms zu markieren. Die klinische Anwendung als Biomarker zur Unterscheidung von benignen und malignen melanozytären Tumoren erscheint daher

aussichtsreich. Die essentielle Rolle von Brn3a in Melanomzellen eröffnet vielfältiges Potential für therapeutische Strategien, die an Brn3a direkt, an seinen Zielgenen oder an den Faktoren angreifen, die zur Expression von Brn3a führen. Bisläng sind keine Informationen zu Brn3a im malignen Melanom verfügbar und alle Daten hierzu beruhen auf dieser Arbeit. Weiterführende Untersuchungen sind daher sehr wichtig, um das Potential von Brn3a weiter zu evaluieren.

Literaturverzeichnis

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. 100(1): p. 57-70.
2. Breslow, A., *Prognostic factors in the treatment of cutaneous melanoma*. J Cutan Pathol, 1979. 6(3): p. 208-12.
3. Ascierto, P.A. and J.M. Kirkwood, *Adjuvant therapy of melanoma with interferon: lessons of the past decade*. J Transl Med, 2008. 6: p. 62.
4. Kirkwood, J.M., et al., *Next generation of immunotherapy for melanoma*. J Clin Oncol, 2008. 26(20): p. 3445-55.
5. Clark, W.H., Jr., et al., *A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma*. Hum Pathol, 1984. 15(12): p. 1147-65.
6. Miller, A.J. and M.C. Mihm, Jr., *Melanoma*. N Engl J Med, 2006. 355(1): p. 51-65.
7. Mooi, W.J. and D.S. Peeper, *Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer*. N Engl J Med, 2006. 355(10): p. 1037-46.
8. Bartek, J., J. Bartkova, and J. Lukas, *DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression*. Oncogene, 2007. 26(56): p. 7773-9.
9. Ha, L., G. Merlino, and E.V. Sviderskaya, *Melanomagenesis: overcoming the barrier of melanocyte senescence*. Cell Cycle, 2008. 7(13): p. 1944-8.
10. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1971. 68(4): p. 820-3.
11. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, 2002. 417(6892): p. 949-54.
12. Albino, A.P., et al., *Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype*. Oncogene, 1989. 4(11): p. 1363-74.
13. Welsh, C.F., et al., *Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho*. Nat Cell Biol, 2001. 3(11): p. 950-7.
14. Brunet, A., et al., *Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry*. Embo J, 1999. 18(3): p. 664-74.

15. Lin, A.W., et al., *Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling*. Genes Dev, 1998. 12(19): p. 3008-19.
16. Michaloglou, C., et al., *BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi*. Nature, 2005. 436(7051): p. 720-4.
17. Kamb, A., et al., *A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types*. Science, 1994. 264(5157): p. 436-40.
18. Nobori, T., et al., *Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers*. Nature, 1994. 368(6473): p. 753-6.
19. Danen, E.H., et al., *E-cadherin expression in human melanoma*. Melanoma Res, 1996. 6(2): p. 127-31.
20. Hsu, M.Y., et al., *Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas*. J Investig Dermatol Symp Proc, 1996. 1(2): p. 188-94.
21. Brooks, P.C., et al., *Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3*. Cell, 1996. 85(5): p. 683-93.
22. Felding-Habermann, B., et al., *Involvement of tumor cell integrin alpha v beta 3 in hematogenous metastasis of human melanoma cells*. Clin Exp Metastasis, 2002. 19(5): p. 427-36.
23. Li, G., K. Satyamoorthy, and M. Herlyn, *N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells*. Cancer Res, 2001. 61(9): p. 3819-25.
24. Petitclerc, E., et al., *Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival*. Cancer Res, 1999. 59(11): p. 2724-30.
25. Marmigere, F. and P. Ernfors, *Specification and connectivity of neuronal subtypes in the sensory lineage*. Nat Rev Neurosci, 2007. 8(2): p. 114-27.
26. Tucker, R.P., *Neural crest cells: a model for invasive behavior*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. 36(2): p. 173-7.
27. Cheung, M., et al., *The transcriptional control of trunk neural crest induction, survival, and delamination*. Dev Cell, 2005. 8(2): p. 179-92.
28. Bronner-Fraser, M., J.J. Wolf, and B.A. Murray, *Effects of antibodies against N-cadherin and N-CAM on the cranial neural crest and neural tube*. Dev Biol, 1992. 153(2): p. 291-301.

29. Nakagawa, S. and M. Takeichi, *Neural crest emigration from the neural tube depends on regulated cadherin expression*. *Development*, 1998. 125(15): p. 2963-71.
30. Vance, K.W. and C.R. Goding, *The transcription network regulating melanocyte development and melanoma*. *Pigment Cell Res*, 2004. 17(4): p. 318-25.
31. Adams, M.S., L.S. Gammill, and M. Bronner-Fraser, *Discovery of transcription factors and other candidate regulators of neural crest development*. *Dev Dyn*, 2008. 237(4): p. 1021-33.
32. Phillips, K. and B. Luisi, *The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit*. *J Mol Biol*, 2000. 302(5): p. 1023-39.
33. Clerc, R.G., et al., *The B-cell-specific Oct-2 protein contains POU box- and homeo box-type domains*. *Genes Dev*, 1988. 2(12A): p. 1570-81.
34. Ingraham, H.A., et al., *A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype*. *Cell*, 1988. 55(3): p. 519-29.
35. Ko, H.S., et al., *A human protein specific for the immunoglobulin octamer DNA motif contains a functional homeobox domain*. *Cell*, 1988. 55(1): p. 135-44.
36. Sturm, R.A. and W. Herr, *The POU domain is a bipartite DNA-binding structure*. *Nature*, 1988. 336(6199): p. 601-4.
37. Cook, A.L. and R.A. Sturm, *POU domain transcription factors: BRN2 as a regulator of melanocytic growth and tumourigenesis*. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2008. 21(6): p. 611-26.
38. McEvelly, R.J. and M.G. Rosenfeld, *The role of POU domain proteins in the regulation of mammalian pituitary and nervous system development*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 1999. 63: p. 223-55.
39. Schonemann, M.D., et al., *POU domain factors in neural development*. *Adv Exp Med Biol*, 1998. 449: p. 39-53.
40. Veenstra, G.J., P.C. van der Vliet, and O.H. Destree, *POU domain transcription factors in embryonic development*. *Mol Biol Rep*, 1997. 24(3): p. 139-55.
41. He, X., et al., *Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development*. *Nature*, 1989. 340(6228): p. 35-41.
42. Lillycrop, K.A., et al., *A novel POU family transcription factor is closely related to Brn-3 but has a distinct expression pattern in neuronal cells*. *Nucleic Acids Res*, 1992. 20(19): p. 5093-6.

43. Ninkina, N.N., et al., *A novel Brn3-like POU transcription factor expressed in subsets of rat sensory and spinal cord neurons*. Nucleic Acids Res, 1993. 21(14): p. 3175-82.
44. Gerrero, M.R., et al., *Brn-3.0: a POU-domain protein expressed in the sensory, immune, and endocrine systems that functions on elements distinct from known octamer motifs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(22): p. 10841-5.
45. Xiang, M., et al., *Brn-3b: a POU domain gene expressed in a subset of retinal ganglion cells*. Neuron, 1993. 11(4): p. 689-701.
46. Theil, T., et al., *Short isoform of POU factor Brn-3b can form a heterodimer with Brn-3a that is inactive for octamer motif binding*. J Biol Chem, 1995. 270(52): p. 30958-64.
47. Frass, B., L. Vassen, and T. Moroy, *Gene expression of the POU factor Brn-3a is regulated by two different promoters*. Biochim Biophys Acta, 2002. 1579(2-3): p. 207-13.
48. Liu, Y.Z., S.J. Dawson, and D.S. Latchman, *Alternative splicing of the Brn-3a and Brn-3b transcription factor RNAs is regulated in neuronal cells*. J Mol Neurosci, 1996. 7(1): p. 77-85.
49. Theil, T., et al., *Mouse Brn-3 family of POU transcription factors: a new aminoterminal domain is crucial for the oncogenic activity of Brn-3a*. Nucleic Acids Res, 1993. 21(25): p. 5921-9.
50. Collum, R.G., et al., *A novel POU homeodomain gene specifically expressed in cells of the developing mammalian nervous system*. Nucleic Acids Res, 1992. 20(18): p. 4919-25.
51. Fedtsova, N.G. and E.E. Turner, *Brn-3.0 expression identifies early post-mitotic CNS neurons and sensory neural precursors*. Mech Dev, 1995. 53(3): p. 291-304.
52. Turner, E.E., K.J. Jenne, and M.G. Rosenfeld, *Brn-3.2: a Brn-3-related transcription factor with distinctive central nervous system expression and regulation by retinoic acid*. Neuron, 1994. 12(1): p. 205-18.
53. Greenwood, A.L., E.E. Turner, and D.J. Anderson, *Identification of dividing, determined sensory neuron precursors in the mammalian neural crest*. Development, 1999. 126(16): p. 3545-59.
54. Budhram-Mahadeo, V., et al., *The Brn-3b POU family transcription factor represses expression of the BRCA-1 anti-oncogene in breast cancer cells*. Oncogene, 1999. 18(48): p. 6684-91.
55. Budhram-Mahadeo, V., et al., *The closely related POU family transcription factors Brn-3a and Brn-3b are expressed in distinct cell types in the testis*. Int J Biochem Cell Biol, 2001. 33(10): p. 1027-39.

56. Bhargava, A.K., Z. Li, and S.M. Weissman, *Differential expression of four members of the POU family of proteins in activated and phorbol 12-myristate 13-acetate-treated Jurkat T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(21): p. 10260-4.
57. Ripley, B.J., et al., *Elevated expression of the Brn-3a and Brn-3b transcription factors in systemic lupus erythematosus correlates with antibodies to Brn-3 and overexpression of Hsp90*. Arthritis Rheum, 2005. 52(4): p. 1171-9.
58. Erkman, L., et al., *Role of transcription factors Brn-3.1 and Brn-3.2 in auditory and visual system development*. Nature, 1996. 381(6583): p. 603-6.
59. Gan, L., et al., *POU domain factor Brn-3b is required for the development of a large set of retinal ganglion cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(9): p. 3920-5.
60. Xiang, M., et al., *Essential role of POU-domain factor Brn-3c in auditory and vestibular hair cell development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(17): p. 9445-50.
61. McEvelly, R.J., et al., *Requirement for Brn-3.0 in differentiation and survival of sensory and motor neurons*. Nature, 1996. 384(6609): p. 574-7.
62. Xiang, M., et al., *Targeted deletion of the mouse POU domain gene Brn-3a causes selective loss of neurons in the brainstem and trigeminal ganglion, uncoordinated limb movement, and impaired suckling*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. 93(21): p. 11950-5.
63. Huang, E.J., et al., *POU domain factor Brn-3a controls the differentiation and survival of trigeminal neurons by regulating Trk receptor expression*. Development, 1999. 126(13): p. 2869-82.
64. Smith, M.D., et al., *Bcl-2 transcription from the proximal P2 promoter is activated in neuronal cells by the Brn-3a POU family transcription factor*. J Biol Chem, 1998. 273(27): p. 16715-22.
65. Smith, M.D., et al., *The N-terminal domain unique to the long form of the Brn-3a transcription factor is essential to protect neuronal cells from apoptosis and for the activation of Bcl-2 gene expression*. Nucleic Acids Res, 1998. 26(18): p. 4100-7.
66. Sugars, K.L., et al., *A minimal Bcl-x promoter is activated by Brn-3a and repressed by p53*. Nucleic Acids Res, 2001. 29(22): p. 4530-40.
67. Ensor, E., M.D. Smith, and D.S. Latchman, *The BRN-3A transcription factor protects sensory but not sympathetic neurons from programmed cell death/apoptosis*. J Biol Chem, 2001. 276(7): p. 5204-12.
68. Smith, M.D., et al., *Brn-3a activates the expression of Bcl-x(L) and promotes neuronal survival in vivo as well as in vitro*. Mol Cell Neurosci, 2001. 17(3): p. 460-70.

69. Budhram-Mahadeo, V., et al., *p53 suppresses the activation of the Bcl-2 promoter by the Brn-3a POU family transcription factor*. J Biol Chem, 1999. 274(21): p. 15237-44.
70. Perez-Sanchez, C., V.S. Budhram-Mahadeo, and D.S. Latchman, *Distinct promoter elements mediate the co-operative effect of Brn-3a and p53 on the p21 promoter and their antagonism on the Bax promoter*. Nucleic Acids Res, 2002. 30(22): p. 4872-80.
71. Farooqui-Kabir, S.R., et al., *Regulation of Hsp27 expression and cell survival by the POU transcription factor Brn3a*. Cell Death Differ, 2004. 11(11): p. 1242-4.
72. Eng, S.R., et al., *Defects in sensory axon growth precede neuronal death in Brn3a-deficient mice*. J Neurosci, 2001. 21(2): p. 541-9.
73. Budhram-Mahadeo, V., et al., *Activation of the alpha-internexin promoter by the Brn-3a transcription factor is dependent on the N-terminal region of the protein*. J Biol Chem, 1995. 270(6): p. 2853-8.
74. Lakin, N.D., et al., *Regulation of neurite outgrowth and SNAP-25 gene expression by the Brn-3a transcription factor*. J Biol Chem, 1995. 270(26): p. 15858-63.
75. Smith, M.D., S.J. Dawson, and D.S. Latchman, *The Brn-3a transcription factor induces neuronal process outgrowth and the coordinate expression of genes encoding synaptic proteins*. Mol Cell Biol, 1997. 17(1): p. 345-54.
76. Morris, P.J., et al., *Differential regulation of genes encoding synaptic proteins by members of the Brn-3 subfamily of POU transcription factors*. Brain Res Mol Brain Res, 1996. 43(1-2): p. 279-85.
77. Lanier, J., et al., *Brn3a target gene recognition in embryonic sensory neurons*. Dev Biol, 2007. 302(2): p. 703-16.
78. Trieu, M., et al., *Autoregulatory sequences are revealed by complex stability screening of the mouse brn-3.0 locus*. J Neurosci, 1999. 19(15): p. 6549-58.
79. Trieu, M., et al., *Direct autoregulation and gene dosage compensation by POU-domain transcription factor Brn3a*. Development, 2003. 130(1): p. 111-21.
80. Ndisang, D., et al., *The HPV-activating cellular transcription factor Brn-3a is overexpressed in CIN3 cervical lesions*. J Clin Invest, 1998. 101(8): p. 1687-92.
81. Leblond-Francillard, M., et al., *High expression of the POU factor Brn3a in aggressive neuroendocrine tumors*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. 82(1): p. 89-94.

82. Budhram-Mahadeo, V., M. Parker, and D.S. Latchman, *POU transcription factors Brn-3a and Brn-3b interact with the estrogen receptor and differentially regulate transcriptional activity via an estrogen response element*. Mol Cell Biol, 1998. 18(2): p. 1029-41.
83. Diss, J.K., et al., *Brn-3a neuronal transcription factor functional expression in human prostate cancer*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2006. 9(1): p. 83-91.
84. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. 72: p. 248-54.
85. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. 227(5259): p. 680-5.
86. Reynolds, A., et al., *Rational siRNA design for RNA interference*. Nat Biotechnol, 2004. 22(3): p. 326-30.
87. Ui-Tei, K., et al., *Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference*. Nucleic Acids Res, 2004. 32(3): p. 936-48.
88. Besch, R., et al., *Inhibition of urokinase-type plasminogen activator receptor induces apoptosis in melanoma cells by activation of p53*. Cell Death Differ, 2007. 14(4): p. 818-29.
89. Gruber, C.A., et al., *POU domain factors of the Brn-3 class recognize functional DNA elements which are distinctive, symmetrical, and highly conserved in evolution*. Mol Cell Biol, 1997. 17(5): p. 2391-400.
90. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans*. Nature, 1998. 391(6669): p. 806-11.
91. Elbashir, S.M., et al., *Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells*. Nature, 2001. 411(6836): p. 494-8.
92. Werth, S., et al., *A low molecular weight fraction of polyethylenimine (PEI) displays increased transfection efficiency of DNA and siRNA in fresh or lyophilized complexes*. J Control Release, 2006. 112(2): p. 257-70.
93. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(4): p. 277-88.
94. Schmitz, I., S. Kirchhoff, and P.H. Krammer, *Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways*. Int J Biochem Cell Biol, 2000. 32(11-12): p. 1123-36.
95. Krammer, P.H., *CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die*. Adv Immunol, 1999. 71: p. 163-210.

96. Martinou, J.C. and D.R. Green, *Breaking the mitochondrial barrier*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2(1): p. 63-7.
97. Zamzami, N. and G. Kroemer, *The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. 2(1): p. 67-71.
98. Youle, R.J. and A. Strasser, *The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2008. 9(1): p. 47-59.
99. Li, M.O., et al., *Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells*. Science, 2003. 302(5650): p. 1560-3.
100. Knudson, A.G., *Antioncogenes and human cancer*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(23): p. 10914-21.
101. DeLeo, A.B., et al., *Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. 76(5): p. 2420-4.
102. Vogelstein, B., D. Lane, and A.J. Levine, *Surfing the p53 network*. Nature, 2000. 408(6810): p. 307-10.
103. Zambetti, G.P. and A.J. Levine, *A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53*. Faseb J, 1993. 7(10): p. 855-65.
104. Levine, A.J., J. Momand, and C.A. Finlay, *The p53 tumour suppressor gene*. Nature, 1991. 351(6326): p. 453-6.
105. Weiss, J., et al., *Mutation and expression of the p53 gene in malignant melanoma cell lines*. Int J Cancer, 1993. 54(4): p. 693-9.
106. Weiss, J., et al., *Mutation and expression of TP53 in malignant melanomas*. Recent Results Cancer Res, 1995. 139: p. 137-54.
107. Momand, J., H.H. Wu, and G. Dasgupta, *MDM2--master regulator of the p53 tumor suppressor protein*. Gene, 2000. 242(1-2): p. 15-29.
108. Carr, A.M., *Cell cycle. Piecing together the p53 puzzle*. Science, 2000. 287(5459): p. 1765-6.
109. Lee, J.H. and T.T. Paull, *Activation and regulation of ATM kinase activity in response to DNA double-strand breaks*. Oncogene, 2007. 26(56): p. 7741-8.
110. Iijima, K., et al., *Dancing on damaged chromatin: functions of ATM and the RAD50/MRE11/NBS1 complex in cellular responses to DNA damage*. J Radiat Res (Tokyo), 2008. 49(5): p. 451-64.
111. Maser, R.S., et al., *hMre11 and hRad50 nuclear foci are induced during the normal cellular response to DNA double-strand breaks*. Mol Cell Biol, 1997. 17(10): p. 6087-96.

112. Bakkenist, C.J. and M.B. Kastan, *DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation*. *Nature*, 2003. 421(6922): p. 499-506.
113. Delia, D., et al., *ATM protein and p53-serine 15 phosphorylation in ataxia-telangiectasia (AT) patients and at heterozygotes*. *Br J Cancer*, 2000. 82(12): p. 1938-45.
114. Hirao, A., et al., *Chk2 is a tumor suppressor that regulates apoptosis in both an ataxia telangiectasia mutated (ATM)-dependent and an ATM-independent manner*. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(18): p. 6521-32.
115. Tanaka, H., et al., *A ribonucleotide reductase gene involved in a p53-dependent cell-cycle checkpoint for DNA damage*. *Nature*, 2000. 404(6773): p. 42-9.
116. Remenyi, A., H.R. Scholer, and M. Wilmanns, *Combinatorial control of gene expression*. *Nat Struct Mol Biol*, 2004. 11(9): p. 812-5.
117. Kapitein, L.C., et al., *The bipolar mitotic kinesin Eg5 moves on both microtubules that it crosslinks*. *Nature*, 2005. 435(7038): p. 114-8.
118. Wittmann, T., A. Hyman, and A. Desai, *The spindle: a dynamic assembly of microtubules and motors*. *Nat Cell Biol*, 2001. 3(1): p. E28-34.
119. Valentine, M.T. and S.P. Gilbert, *To step or not to step? How biochemistry and mechanics influence processivity in Kinesin and Eg5*. *Curr Opin Cell Biol*, 2007. 19(1): p. 75-81.
120. Kapoor, T.M., et al., *Probing spindle assembly mechanisms with monastrol, a small molecule inhibitor of the mitotic kinesin, Eg5*. *J Cell Biol*, 2000. 150(5): p. 975-88.
121. Zhu, C., et al., *Functional analysis of human microtubule-based motor proteins, the kinesins and dyneins, in mitosis/cytokinesis using RNA interference*. *Mol Biol Cell*, 2005. 16(7): p. 3187-99.
122. Liu, M., et al., *Validating the mitotic kinesin Eg5 as a therapeutic target in pancreatic cancer cells and tumor xenografts using a specific inhibitor*. *Biochem Pharmacol*, 2008. 76(2): p. 169-78.
123. Hayashi, N., et al., *Effects of Eg5 knockdown on human prostate cancer xenograft growth and chemosensitivity*. *Prostate*, 2008. 68(12): p. 1283-95.
124. Carter, B.Z., et al., *Regulation and targeting of Eg5, a mitotic motor protein in blast crisis CML: overcoming imatinib resistance*. *Cell Cycle*, 2006. 5(19): p. 2223-9.
125. Haupt, Y., et al., *Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53*. *Genes Dev*, 1995. 9(17): p. 2170-83.

126. Pollock, P.M., et al., *High frequency of BRAF mutations in nevi*. Nat Genet, 2003. 33(1): p. 19-20.
127. Bartkova, J., et al., *Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints*. Nature, 2006. 444(7119): p. 633-7.
128. Patton, E.E., et al., *BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma*. Curr Biol, 2005. 15(3): p. 249-54.
129. Serrano, M., et al., *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*. Cell, 1997. 88(5): p. 593-602.
130. Koller, E., et al., *Use of a chemically modified antisense oligonucleotide library to identify and validate Eg5 (kinesin-like 1) as a target for antineoplastic drug development*. Cancer Res, 2006. 66(4): p. 2059-66.
131. Lee, C.W., et al., *A phase II study of ispinesib (SB-715992) in patients with metastatic or recurrent malignant melanoma: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group trial*. Invest New Drugs, 2008. 26(3): p. 249-55.
132. Planas-Silva, M.D. and I.S. Filatova, *Estrogen-dependent regulation of Eg5 in breast cancer cells*. Anticancer Drugs, 2007. 18(7): p. 773-9.
133. Liu, M., et al., *Parkin regulates Eg5 expression by Hsp70 ubiquitination-dependent inactivation of c-Jun NH2-terminal kinase*. J Biol Chem, 2008. 283(51): p. 35783-8.
134. Frisch, S.M. and H. Francis, *Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis*. J Cell Biol, 1994. 124(4): p. 619-26.
135. Herlyn, M., et al., *Characteristics of cultured human melanocytes isolated from different stages of tumor progression*. Cancer Res, 1985. 45(11 Pt 2): p. 5670-6.
136. Ohsie, S.J., et al., *Immunohistochemical characteristics of melanoma*. J Cutan Pathol, 2008. 35(5): p. 433-44.
137. Cochran, A.J. and D.R. Wen, *S-100 protein as a marker for melanocytic and other tumours*. Pathology, 1985. 17(2): p. 340-5.
138. Chorny, J.A., et al., *Ki-67 and p53 expression in minimal deviation melanomas as compared with other nevocytic lesions*. Mod Pathol, 2003. 16(6): p. 525-9.
139. Barrett, T., et al., *NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data*. Nucleic Acids Res, 2009. 37(Database issue): p. D885-90.

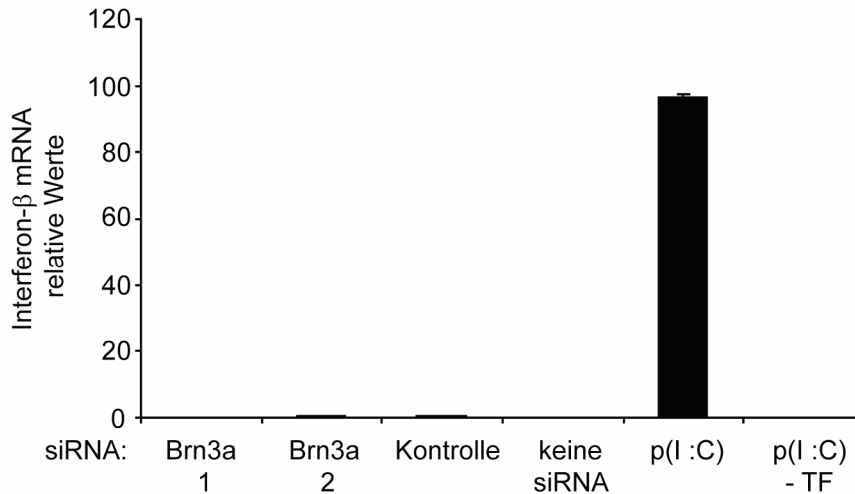
140. Talantov, D., et al., *Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions*. Clin Cancer Res, 2005. 11(20): p. 7234-42.
141. Hoek, K., et al., *Expression profiling reveals novel pathways in the transformation of melanocytes to melanomas*. Cancer Res, 2004. 64(15): p. 5270-82.
142. Smalley, K.S. and M. Herlyn, *Targeting intracellular signaling pathways as a novel strategy in melanoma therapeutics*. Ann N Y Acad Sci, 2005. 1059: p. 16-25.
143. Allgayer, H. and S. Fulda, *An introduction to molecular targeted therapy of cancer*. Adv Med Sci, 2008. 53(2): p. 130-8.
144. Kleinman, M.E., et al., *Sequence- and target-independent angiogenesis suppression by siRNA via TLR3*. Nature, 2008. 452(7187): p. 591-7.
145. Villares, G.J., et al., *Targeting melanoma growth and metastasis with systemic delivery of liposome-incorporated protease-activated receptor-1 small interfering RNA*. Cancer Res, 2008. 68(21): p. 9078-86.
146. Poeck, H., et al., *5'-Triphosphate-siRNA: turning gene silencing and Rig-I activation against melanoma*. Nat Med, 2008. 14(11): p. 1256-63.
147. Zhang, X., et al., *Therapeutic effects of STAT3 decoy oligodeoxynucleotide on human lung cancer in xenograft mice*. BMC Cancer, 2007. 7: p. 149.
148. Sen, M., et al., *Lack of toxicity of a STAT3 decoy oligonucleotide*. Cancer Chemother Pharmacol, 2009. 63(6): p. 983-95.
149. Peixoto, P., et al., *Direct inhibition of the DNA-binding activity of POU transcription factors Pit-1 and Brn-3 by selective binding of a phenyl-furan-benzimidazole dication*. Nucleic Acids Res, 2008. 36(10): p. 3341-53.
150. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell, 1997. 88(3): p. 323-31.
151. Vousden, K.H. and X. Lu, *Live or let die: the cell's response to p53*. Nat Rev Cancer, 2002. 2(8): p. 594-604.
152. Montano, X., et al., *Analysis of p53 in human cutaneous melanoma cell lines*. Oncogene, 1994. 9(5): p. 1455-9.
153. Volkenandt, M., et al., *Mutational analysis of the human p53 gene in malignant melanoma*. Pigment Cell Res, 1991. 4(1): p. 35-40.
154. Jenrette, J.M., *Malignant melanoma: the role of radiation therapy revisited*. Semin Oncol, 1996. 23(6): p. 759-62.

155. Polsky, D., et al., *HDM2 protein overexpression, but not gene amplification, is related to tumorigenesis of cutaneous melanoma*. *Cancer Res*, 2001. 61(20): p. 7642-6.
156. Ventura, A., et al., *Restoration of p53 function leads to tumour regression in vivo*. *Nature*, 2007. 445(7128): p. 661-5.
157. Grinkevich, V.V., et al., *Ablation of key oncogenic pathways by RITA-reactivated p53 is required for efficient apoptosis*. *Cancer Cell*, 2009. 15(5): p. 441-53.
158. Nitiss, J.L., *Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy*. *Nat Rev Cancer*, 2009. 9(5): p. 338-50.

Anhang

Ergänzende Abbildungen

A



B

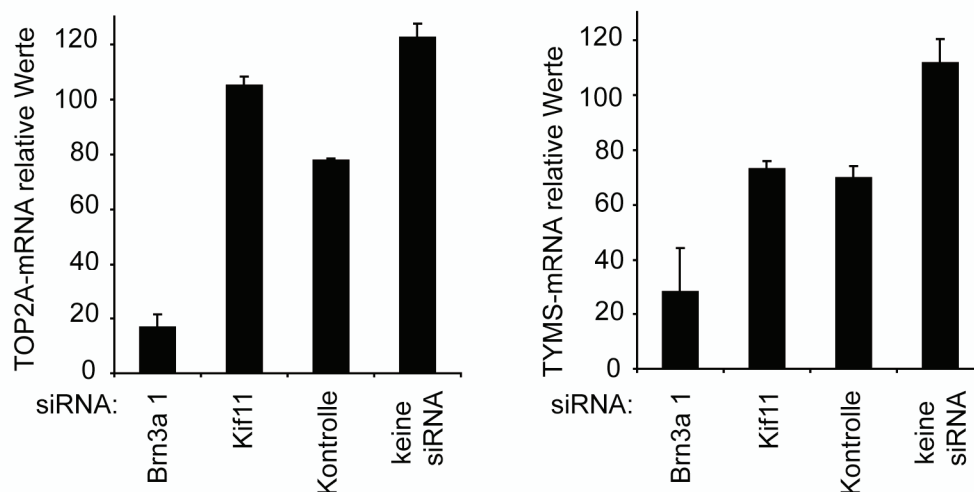


Abbildung 29: Ergänzende Experimente

(A) Kontrolle der Brn3a-spezifischen siRNAs bezüglich immunstimulierender Eigenschaften

1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs oder einem synthetischen dsRNA Analogon und spezifischem TLR3-Liganden (Polyinosine-polycytidylic acid, p(I:C)) transfiziert. Die Messung eines möglichen immunstimulierenden Effekts wurde stellvertretend durch die Messung von Interferon-β-mRNA durch qRT-PCR durchgeführt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. TF steht für Transfektionsmittel.

(B) Quantitative Bestimmung der Regulation von Topoisomerase 2α (TOP2A) und Thymidilatsynthase S (TYMS) nach Hemmung von Brn3a oder Kif11 in Melanomzellen

1205Lu-Melanomzellen wurden mit den angegebenen siRNAs transfiziert und nach 48 h die TOP2A- und TYMS-mRNA mittels qRT-PCR analysiert. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten.

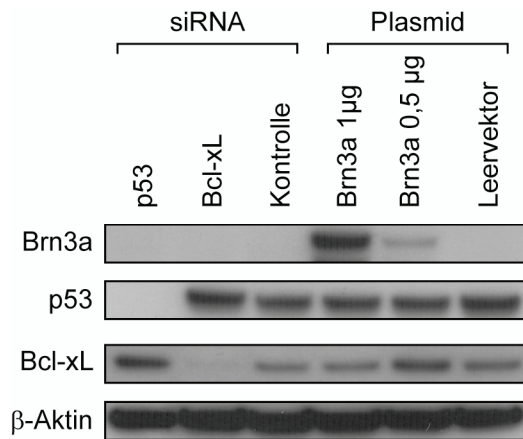


Abbildung 30: Ergänzende Experimente

WM3211 Melanomzellen wurden in dieser Arbeit wiederholt als Brn3a-negative Kontrollen verwendet. Sie wurden sowohl mit spezifischen siRNAs als auch mit Plasmid-DNA transfiziert. Diese Abbildung zeigt im Immunoblot 48 h nach Transfektion mit den angegebenen Agenzien die generelle Transfizierbarkeit dieser Zelllinie. Humanes β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Abkürzungen

AN	Annexin V
AS	Aminosäure
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
cDNA	copy DNA
CHX	Cycloheximid
ChIP	Chromatin Immunpräzipitation
CoIP	Ko-Immunpräzipitation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting, Durchflusszytometrie
G1-Phase	Gap-Phase 1
G2-Phase	Gap-Phase 2
IFN	Interferon
kD	kilo Dalton
LB	Luria Broth

luc	Luziferase
mRNA	messenger RNA
M	Mitose
ORF	Offener Leserahmen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PI	Propidiumiodid
Pol II	Polymerase II
PS	Phosphatidylserin
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
rpm	<i>rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
S-Phase	Synthese-Phase, Phase der DNA Replikation
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TF	Transfektion
Zyt c	Zytochrom c

Danksagung

Gerne möchte ich mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bei den Direktoren der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München in der Thalkirchnerstrasse, Professor Dr. med. Dr. h. c. Gerd Plewig und im Anschluß Professor Dr. med. Dr. h. c. Thomas Ruzicka für die Bereitstellung des schönen Arbeitsplatzes im Labor für Zelladhäsion im 3. Stock mit eigenem Schreibtisch.

Bei den Betreuern meiner Doktorarbeit, Professor Dr. med. Carola Berking und Privatdozent Dr. rer. biol. hum. Robert Besch bedanke ich mich herzlich für die Vergabe des interessanten Themas, für unermüdliche Förderung und Unterstützung in jeder Beziehung, für Kongressreisen an das andere Ende der Welt und Segeln auf dem Ammersee. Besonderer Dank gilt Robert Besch für unser freundschaftliches Verhältnis und humorvolle Schreibtischnachbarschaft in den vergangenen 4 Jahren.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei meinen Kollegen vom Labor für Zelladhäsion, besonders bei Claudia Kammerbauer, durch deren umsichtiges und sorgfältiges Arbeiten der Laboralltag reibungslos und angenehm möglich war.

Weiterhin gilt mein Dank allen Kooperationspartnern von den Universitäten München und Marburg sowie dem Helmholtzzentrum Neuherberg, die wesentlich zum Erfolg des Brn3a-Projekts beigetragen haben.

Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), vertreten durch das Graduiertenkolleg 1202 „Oligonukleotide in Therapie und Zellbiologie“ sowie der Hiege-Stiftung gegen Hautkrebs, Hamburg, möchte ich mich für die finanzielle Förderung während meiner Doktorarbeit bedanken.

Besonderer Dank gilt meiner lieben Freundin Anke für ihre schier endlose Geduld und ihre Unterstützung in allen Lebenslagen, sowie meinen Eltern, die mir das Studium der Biologie und damit auch diese Arbeit ermöglicht haben.

Tobias Hohenauer

Diplom Biologe

Geburtsort München, Deutschland
Geburtsdatum 23.02.1979
Adresse Theresienstr. 57, 80333 München, Deutschland
Kontakt Tel. 089/64292521 oder 0151/10767515
Email: tobias.hohenauer@gmail.com

Universitäre Ausbildung

Seit Oktober 2005 Promotionsstudium zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München im Graduiertenkolleg 1202 der DFG: "Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie"
03/2005 Diplom in Biologie (1.4 "Sehr gut")
04/2004-02/2005 Diplomarbeit am Health Sciences Centre der McMaster University Hamilton, Ontario, Kanada
11/1999-03/2005 Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität München : Mikrobiologie, Zellbiologie, Biochemie, Ökologie

Schulische Ausbildung und Zivildienst

1998-1999 Caritas Sozialstation, Simbach am Inn, Deutschland
1989-1998 Tassilo Gymnasium, Simbach am Inn, Deutschland

Stipendien und Preise

2009 Excellence Award in Melanoma Research, Posterpräsentation, 6th International Melanoma Research Congress 2009, Boston, USA
2007 Travel Award der Melanoma Research Foundation, 4th International Melanoma Research Congress 2007, New York City, USA
2005-2008 Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) zum Besuch des Graduiertenkollegs 1202: "Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie"

Mitgliedschaften und Gutachterische Tätigkeit

Mitgliedschaften

Society for Melanoma Research (SMR) seit 2006

Verband Deutscher Biologen (VBIO) seit 2005

Gutachterische Tätigkeit

Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), British Journal of Dermatology, Journal of Investigative Dermatology (unter Anleitung durch Prof. Dr. med. Carola Berking)

Eingeworbene Fördermittel

2009

Erträge der Weigand'schen Stiftung

Thema: „Charakterisierung der transkriptionellen Aktivität des neuronalen Transkriptionsfaktors Brn3a beim malignen Melanom“

Betrag: 10.000 Euro

Forschungsförderung der Hiege-Stiftung gegen Hautkrebs, Hamburg, Deutschland

Thema: „Untersuchungen zum Wirkmechanismus des neuronalen Transkriptionsfaktors Brn3a beim malignen Melanom“

Betrag: 20.000 Euro

Präsentationen

Poster

2009

6th International Melanoma Research Congress, Boston, USA

2008

5th International Melanoma Research Congress, Sapporo, JP

2007

4th International Melanoma Research Congress, NYC, USA

2006

3rd International Melanoma Research Congress, Noordwijk, NL

Vortrag

2008

5th International Melanoma Research Congress, Sapporo, JP:

“Brn3a, a new marker for human melanoma, promotes cell survival via inactivation of p53.”

Publikationen

Abstracts

Besch R, **Hohenauer T**, Poeck H, Häcker G, Berking C, Kammerbauer C, Nägele U, Rothenfusser S und Hartmann G: *RIG-I and Mda5 activate apoptosis in melanoma via Puma and Noxa*. Pigment Cell Res 2007; 20 (6):457-593.

Hohenauer T, Berking C und Besch R: *Increased expression of Brn3a promotes survival of melanoma cells*. Pigment Cell Res 2007; 20 (6):457-593.

Hohenauer T, Berking C, Brenner M, Irmeler M, Beckers J und Besch R: *Brn3a, a new marker for human melanoma, promotes cell survival via inactivation of p53*. Pigment Cell Res 2008; 21 (2):109-336.

Besch R, Poeck H, **Hohenauer T**, Senft D, Häcker G, Hornung V, Rothenfusser S und Hartmann G: *Melanoma cells are susceptible to the proapoptotic signaling of the virus-sensing receptors RIG-I and Mda5*. Pigment Cell Melanoma Res 2009; 22 (6): 860-906

Hohenauer T, Berking C, Irmeler M, Beckers J, Hoebel S, Aigner A, Hoffmann F, Schmidt A, Rothenfusser S und Besch R: *The neuronal transcription factor Brn3a is essential for human melanoma cell proliferation and survival*. Pigment Cell Melanoma Res 2009; 22 (6): 860-906

Originalarbeiten

Hohenauer T, Senft D, Berking C, Irmeler M, Beckers J, Hoebel S, Aigner A, Hoffmann F, Schmidt A, Rothenfusser S und Besch R. *The neuronal transcription factor Brn3a is essential for human melanoma cell proliferation and survival*. In Revision.

Besch R*, Poeck H*, **Hohenauer T**, Senft D, Häcker G, Berking C, Hornung V, Endres S, Ruzicka T, Rothenfusser S und Hartmann G. *Proapoptotic signaling induced by RIG-I and MDA-5 results in type I interferon-independent apoptosis in human melanoma cells*. J Clin Invest. 2009 Aug;119(8):2399-411.

* trugen zu gleichen Teilen bei.


Craney A*, **Hohenauer T***, Xu Y, Navani NK, Li Y und Nodwell J.

A synthetic luxCDABE gene cluster optimized for expression in high- GC bacteria. Nucleic Acids Res. 2007 35(6):e46.

* trugen zu gleichen Teilen bei.

Praktische Erfahrung (außeruniversitär)

- 04/2005-08/2005** Baxter Germany GmbH, Unterschleißheim, Deutschland: Studentische Aushilfe Regulatory Affairs
- 08/2003** Clariant GmbH, Gendorf, Deutschland:
Werkstudent Forschung und Entwicklung
- 03/2003** Eidgenössische Technische Hochschule (ETH) Zürich, Schweiz:
Laborpraktikum in Molekulargenetik



Tobias Hohenauer

München, 20. Dezember 2009

Tobias Hohenauer