

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Thomas Ruzicka

Regulation des Transkriptionsfaktors Brn3a im malignen Melanom

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Eva Susanne Hornig
aus
Wertheim am Main
2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Carola Berking
Mitberichterstatter:	Priv. Doz. Dr. med. Dr. med. univ. Jens Neumann Priv. Doz. Dr. Philipp Korber
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. med. Markus Vincent Heppt
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung:	10.09.2018

Eidesstattliche Versicherung

Hornig, Eva Susanne

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Regulation des Transkriptionsfaktors Brn3a im malignen Melanom

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 21.09.2018

Ort, Datum

Eva Susanne Hornig

Doktorandin/Doktorand

Regulation des Transkriptionsfaktors Brn3a
im malignen Melanom

Teile dieser Arbeit sind Bestandteil folgender Publikation:

Review:

Hornig E, Heppt MV, Graf SA, Ruzicka T, Berking C

Inhibition of histone deacetylases in melanoma – a perspective from bench to bedside

Experimental Dermatology, 2016 November

Die vorliegende Arbeit wurden in folgenden Vorträgen präsentiert:

2016 ADF (Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung), Arbeitsgemeinschaft Experimentelle Demato-Onkologie, Wien, Österreich

Epigenetic and transcriptional regulation of Brn3a in melanoma

2015 AEK Autumn School 2015 - Cancer Microenvironment and Epigenetics, Berlin, Deutschland

Epigenetic regulation of Brn3a in melanoma

25. Deutscher Hautkrebskongress ADO-Jahrestagung, München, Deutschland

Epigenetische und transkriptionelle Regulation des Transkriptionsfaktors Brn3a im Melanom

1st Annual Retreat des 'i-Target: Immunotargeting of Cancer', Internationales Doktorandenprogramm, Insel Frauenchiemsee, Deutschland

Identification of factors that lead to Brn3a expression in melanoma

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das maligne Melanom	1
1.1.1	Entstehung und Progression	2
1.1.2	Therapie	5
1.1.2.1	Zielgerichtete Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren.....	5
1.1.2.2	Immuncheckpoint-Blockade	7
1.1.2.3	Kombinationstherapie	9
1.2	Der embryonale Transkriptionsfaktor Brn3a (POU4F1)	10
1.2.1	Entwicklung der Neuralleiste und Entstehung von Melanozyten	10
1.2.2	POU-Transkriptionsfaktoren	11
1.2.3	Brn3a	14
1.2.3.1	Expression und Funktion von Brn3a	15
1.2.3.2	Brn3a in Tumoren	16
1.2.4	Weitere neuronale Transkriptionsfaktoren	16
1.3	Mechanismen epigenetischer Genregulation	18
1.3.1	RNA-basierende Mechanismen	19
1.3.2	Methylierung.....	19
1.3.3	Acetylierung	21
1.4	Ziele der Arbeit	24
2	Material und Methoden	25
2.1	Material	25
2.1.1	Antikörper.....	25
2.1.2	Apparative Ausstattung	25
2.1.3	Pharmakologische Agenzien	27
2.1.4	Kommerziell erhältliche Komplettsysteme (Kits)	27
2.1.5	Oligonukleotide.....	28
2.1.5.1	Small interfering RNAs (siRNAs).....	28

2.1.5.2	Primer für quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR).....	28
2.1.6	Plasmide	29
2.1.7	Puffer und Lösungen	30
2.1.8	Restriktionsendonukleasen	37
2.1.9	Transfektionsreagenzien	38
2.1.10	Verbrauchsmaterialien.....	38
2.1.11	Zellkulturmedien	39
2.2	Methoden	42
2.2.1	Zellkultur.....	42
2.2.2	Behandlung von Zellen mit Histondeacetylase-Inhibitoren.....	42
2.2.3	Behandlung von Zellen mit einem DNA-Demethylierungsgagens.....	43
2.2.4	Behandlung von Zellen mit zielgerichteten Melanomtherapeutika	43
2.2.5	Zellvitalitätsanalyse	44
2.2.6	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)	44
2.2.6.1	Crosslinking	45
2.2.6.2	Immunpräzipitation.....	45
2.2.6.3	Aufreinigung der Proben und Echtzeit-PCR	45
2.2.7	Messung der relativen Enzymaktivität	46
2.2.8	DNA-Klonierung	47
2.2.9	Mutagenese-PCR.....	49
2.2.9.1	Mutagenese.....	49
2.2.10	Plasmidtransfektion	51
2.2.11	Luziferase-Reportergen-Assay	51
2.2.11.1	Transfektion der Reporterkonstrukte	52
2.2.11.2	Ernte und Messung	52
2.2.12	Untersuchung der transkriptionellen Regulation von Brn3a	52
2.2.13	Mykoplasmen-Test	53
2.2.14	Gesamtzellprotein-Isolation	54
2.2.15	RNA-Isolation	55

2.2.16	Zytoplasma- und Nuklearextrakt-Isolation.....	55
2.2.17	Photometrische Konzentrationsbestimmungen.....	56
2.2.17.1	Proteinbestimmung nach Pierce.....	56
2.2.17.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	57
2.2.17.3	Konzentrationsbestimmung von Zytoplasma- und Nuklearextrakten.....	57
2.2.18	Quantitative Echtzeit-PCR.....	57
2.2.18.1	Reverse Transkription (RT) von RNA zu cDNA.....	58
2.2.18.2	qRT-PCR mit spezifischen Hybridisierungssonden.....	58
2.2.19	siRNA-Transfektion.....	60
2.2.19.1	Lipofectamin.....	60
2.2.19.2	JetPRIME®.....	61
2.2.20	Western-Blot.....	61
2.2.20.1	Gelelektrophorese.....	61
2.2.20.2	Übertragen der Proteine (Blotting).....	61
2.2.20.3	Hybridisierung.....	62
2.2.20.4	Detektion.....	63
2.2.21	Statistische Analysen.....	63
3	Ergebnisse.....	64
3.1	Expressionsanalysen in Zellen der humanen Haut.....	64
3.1.1	Brn3a-Expression.....	64
3.2	Expressionsanalysen von Transkriptionsfaktoren in Zellen der Haut.....	65
3.2.1	Brn3a-Expression in therapieresistenten Melanomzellen.....	67
3.3	Behandlung der Zellen mit Inhibitoren.....	68
3.3.1	Behandlung mit DNA-Demethylierungsmitteln Aza.....	68
3.3.2	Behandlung mit unspezifischen HDACi.....	71
3.3.2.1	Zeitreihen zur Bestimmung der optimalen Behandlungsdauer von TSA.....	71
3.3.2.2	TSA- und NaB-Behandlungen.....	73
3.3.3	Behandlung mit spezifischen HDACi Mocetinostat und PCI-34051.....	76
3.3.4	Effekte von HDACi auf potentielle Brn3a-Zielgene.....	78

3.4	HDAC2-Glo™-Enzymaktivität	79
3.5	Expressionsanalysen von HDACs in Melanozyten und Melanomzellen	80
3.5.1	Untersuchung der HDAC-mRNA	80
3.5.2	Untersuchung von HDAC2- und HDAC11-Protein	83
3.6	siRNA-Experimente	84
3.6.1	siHDAC2 und siHDAC11	84
3.6.2	siHDAC1 und siHDAC3	89
3.7	HDAC2-Überexpression	90
3.8	Promotorstudien	93
4	Diskussion	95
4.1	Expressionsanalysen von Brn3a	96
4.2	HDAC-Hemmung durch unspezifische und spezifische Inhibitoren.....	96
4.3	HDAC2-Enzymaktivität	98
4.4	HDAC-Expressionsanalysen in melanozytären Zellen	99
4.5	HDAC-Hemmung durch spezifische siRNAs	100
4.6	Überexpression von HDAC2 in Melanomzellen	101
4.7	Promotoraktivität des Brn3a-Gens.....	101
4.8	Ausblick.....	103
5	Zusammenfassung	104
	Literaturverzeichnis	106
	Abkürzungsverzeichnis.....	118
	Danksagung	122

1 Einleitung

Krebs ist eine der häufigsten Todesursachen. Es gibt mehr als 100 verschiedene Krebsarten, die spezifischen Organen zugeordnet werden [1]. Hanahan und Weinberg haben vorgeschlagen, dass dieses große Spektrum an Krebszelltypen auf einer Manifestierung von essentiellen Veränderungen der Zellphysiologie beruht. Demzufolge fassen sie sechs Veränderungen für das Wachstum von Krebszellen zusammen: Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, Unempfindlichkeit gegenüber Wachstumshemmern, Resistenz gegenüber Apoptose, unbegrenztes replikatives Potential, Gefäßneubildung (Angiogenese), Aktivierung von Gewebeinvasion und Metastasierung [1]. Im Laufe der Jahre haben Hanahan und Weinberg aufgrund neuer wissenschaftlicher Erkenntnisse der Liste noch zwei weitere Eigenschaften mit potentieller Allgemeingültigkeit hinzugefügt: die Reprogrammierung des Energiemetabolismus und das Potential der malignen Zellen, der Erkennung und der Degradierung durch das Immunsystem auszuweichen [2]. Bei der Entstehung von Krebszellen sind sowohl genetische als auch epigenetische Mechanismen der Transkription und Translation beteiligt. Durch ein Zusammenspiel mehrerer Mutationen und weiterer Veränderungen an der DNA sowie den Histonen kann es zur malignen Transformation einer gesunden Zelle zur Krebszelle kommen.

1.1 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist ein relativ häufig vorkommender und frühzeitig metastasierender Hauttumor [3]. Da Melanome im späten Stadium häufig therapieresistent sind, verursachen sie die meisten Todesfälle unter den Hauttumoren und die Zahl der Melanomfälle steigt jährlich an [4]. Laut Robert-Koch-Institut liegt die Prognose für Neuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2016 bei 12.300 für Männer und 12.200 für Frauen, im Jahr 2012 waren es noch 10.400 Neuerkrankungen für Männer und 10.420 für Frauen. Melanome entwickeln sich aus Melanozyten, den pigmentbildenden Zellen der Haut. Während der Embryogenese entwickeln sich Melanozyten wiederum aus Vorläuferzellen, die in der Neuralleiste, dem Neuroektoderm, angesiedelt sind. Neben Melanozyten entwickeln sich aus diesen Vorläuferzellen auch neuronale Zellen und Zellen des endokrinen Systems [5]. Daher wird das maligne Melanom häufig auch als neuroektodermaler Tumor bezeichnet.

1.1.1 Entstehung und Progression

Melanozyten produzieren das Pigment Melanin. Sie befinden sich in der kutanen Epidermis (Abbildung 1), in Haarfollikeln, den weichen Hirnhäuten, im Herz und im Innenohr. Das synthetisierte Melanin führt zur Pigmentierung der Haut, Haare und Augen [6, 7]. Melanozyten entstehen während der Embryogenese aus pluripotenten Zellen der Neuralleiste. Melanozyten erfahren einen komplexen Entwicklungs- und Differenzierungsprozess, welcher aufgrund von Lokalisation und Expression von Oberflächenmarkern in verschiedene Stadien unterteilt werden kann [3]. Während diesem Prozess durchlaufen hochmigratorische Neuralleistenzellen eine epitheliale-mesenchymale-Transition (EMT) und wandern entlang des dorso-lateralen Wegs. Differenzieren zu Melanoblasten und schließlich während der Embryogenese zu Melanozyten (ausführliche Beschreibung der Entstehung von Melanozyten siehe 1.2.1).

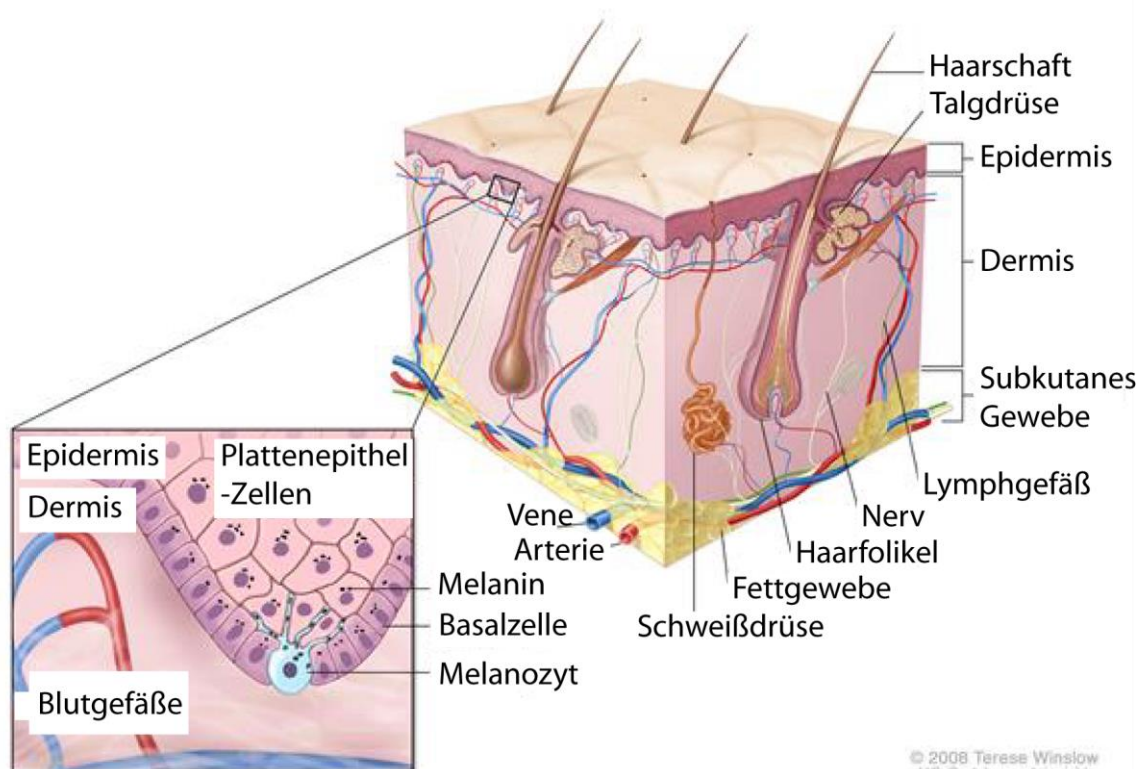


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Haut. Die Haut ist in drei Schichten unterteilt, die Epidermis, die Dermis und das subkutane Gewebe. In der Basalzellschicht der Epidermis befinden sich die Melanozyten. Die Dermis beherbergt Lymph- sowie Blutgefäße, Haarfollikel, Nerven und Schweißdrüsen. Das darunterliegende subkutane Gewebe besteht aus Blutgefäßen, die von Fett- und Bindegewebe umschlossen sind. Reproduziert und modifiziert nach The National Cancer Institute, Genetics of Skin Cancer Health Professional Version (PDQ®).

Die maligne Transformation von Melanozyten zum Melanom folgt in einem klassischen Modell nach Clark verschiedenen Phasen (Abbildung 2) [8, 9]. Zu Beginn der malignen Transformation in der Basalmembran der Epidermis reagieren Melanozyten nicht mehr auf Kontrollsignale der umgebenden Keratinozyten und wachsen unabhängig. In der Phase 0 der Melanomentwicklung beginnen normale Melanozyten kontrolliert zu proliferieren und bilden einen benignen Nävus aus. Bei zirka 50% der Nävi liegen im BRAF (B-rapidly accelerated fibrosarcoma)-Gen aktivierende somatische Mutationen vor, welche im MAPK- (mitogen-activated protein kinase) Signalweg zu einem konstitutiv aktivem Signal von Raf führen können [10]. Dieses permanent aktive Signal in den Melanomzellen führt zu gesteigertem Zellwachstum, Zellproliferation und Zellüberleben [11]. Die häufigste Mutation im Melanom ist BRAF^{V600E}. Weitere Mechanismen der Aktivierung sind beispielsweise NRAS-Mutationen (neuroblastoma RAS family member) und zu geringeren Anteilen weitere Mutationen im MAPK-Signalweg oder PI3-Kinase-Akt Signalweg [10, 12-15].

Die Aktivierung des mutierten BRAF-Gens führt zur Phase I mit der Folge eines atypischen oder dysplastischen Nävus. Es kommt zu einem abnormalen Wachstum des vorher benignen Nävus. Das Wachstum der Melanozyten wird über die konstitutive Aktivierung von BRAF oder NRAS des MAPK-Signalwegs gesteuert [16].

Phase II, die radiäre Wachstumsphase (RGP – radial growth phase), wird durch Umgehung von Seneszenz durch die Inaktivierung der Gene CDKN2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) und PTEN (phosphatase and tensin homolog) durch Mutation, Deletion oder Methylierung eingeleitet [17]. Der Tumor breitet sich in der RGP horizontal aus und hat kaum invasives Potential.

Für den Übergang in Phase III, die vertikale Wachstumsphase (VGP – vertical growth phase), müssen die Zellen invasive Eigenschaften erlangen. Hierfür kommt es zu einer veränderten Expression von Zelladhäsionsmolekülen, wie beispielsweise E-Cadherin oder Desmoglein1 [18]. Dieser Vorgang ähnlich einer EMT wird durch Transkriptionsfaktoren wie Snail oder Slug gesteuert. Die Tumorzellen sind nun in der Lage in die Dermis einzudringen.

In Phase IV, die das metastatische Melanom beschreibt, wandern die Zellen über Lymph- und Blutgefäße aus und haben die Fähigkeit sich in Organen und Geweben festzusetzen, zu proliferieren und Tochter Tumoren auszubilden [19].

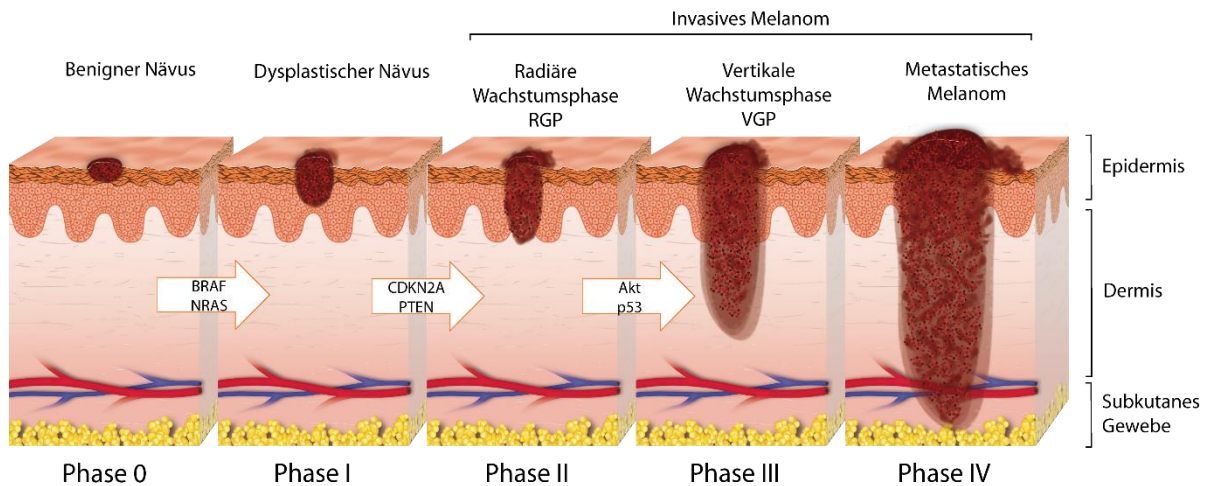


Abbildung 2: Clark-Modell der Melanomprogression. Beschrieben werden fünf Phasen der Melanomentstehung. In Phase 0 ist lediglich ein benigner Nävus in der Epidermis vorhanden, durch aktivierende Mutationen in den Genen BRAF oder NRAS des MAPK-Signalwegs kann es zu einem dysplastischen Nävus kommen, welcher die Phase I beschreibt. Weitere Mutationen beispielsweise in den Genen CDKN2A oder PTEN führen zur Phase II, der radiären Wachstumsphase (RGP – radial growth phase), hier beginnt der Tumor sich oberflächlich auszubreiten, wächst aber noch nicht in die Dermis ein. In der Phase III, der vertikalen Wachstumsphase (VGP – vertical growth phase), kommt es zum Durchbruch der Tumorzellen durch die Basalmembran der Epidermis in die Dermis. Der Übergang von epithelialem zu mesenchyalem Wachstum führt zur Metastasierung der Tumorzellen. Die Tumorzellen sind nun in der Lage über Lymph- und Blutgefäße in andere Organe auszuwandern. Die Abbildung wurde adaptiert und modifiziert nach <http://drugresource.com/wp-content/uploads/2015/06/stagesofmelanoma2-1024x572.png> und Miller et al., 2006 [9].

Das Clark-Modell der Melanomprogression ist eine sehr klassische Vorstellung, viele Melanome können auch *de novo* ohne Nävus entstehen. Shain und Bastian beschreiben in ihrem Review ‚From melanocytes to melanomas‘ [20] die verschiedenen Arten der Melanomentstehung. Sie differenzieren zwischen Melanomen, die an sonnenexponierten Hautpartien liegen, und solche, die kaum Sonneneinstrahlung erfahren. Chronisch sonnenexponierte Melanome haben eine höhere Anzahl an Mutationen und treten in höherem Alter auf als nicht-sonnenexponierte Melanome. Die nicht-sonnenexponierten Melanome entstehen früher, sind meist mit Nävi assoziiert, haben weniger Mutationen und befinden sich an Körperstellen, die geringere Mengen an Sonnenlicht ausgesetzt sind.

Bei zirka 50% der malignen Melanome liegt eine aktivierende somatische Mutation des BRAF-Gens vor, welche zu einer konstanten Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs führt [10]. Dieses permanent aktive Signal in den Melanomzellen führt zu gesteigertem Zellwachstum und Zellüberleben [11].

1.1.2 Therapie

In den letzten 5-6 Jahren hat sich die Therapie des fortgeschrittenen Melanoms drastisch geändert. Nach wie vor wird das Melanom in Frühstadien exzidiert, was eine äußerst wirkungsvolle Therapieform darstellt. Im inoperablen Stadium wurde das Melanom lange Zeit mit Strahlentherapie oder/und Chemotherapie behandelt. Allerdings waren die Ansprechraten auf Chemotherapien gering und zu einer dauerhaften Heilung kam es nur in seltenen Fällen. Aufgrund der schlechten Prognose mit diesen klassischen Methoden, wurde die Pathogenese des Melanoms auf zellulärer und molekularer Ebene besonders intensiv untersucht. Das Melanom wurde neu klassifiziert, als eine hochkomplexe, heterogene Krankheit mit mehreren Subpopulationen von Tumorzellen [21]. Es wurden relevante Genmutationen und wichtige Signalwege in der Entstehung des Melanoms beschrieben [22]. Da das Melanom ein sehr plastischer und heterogener Tumor ist, ist dieser in der Lage, sich an biologische Prozesse und Therapien anzupassen, was Resistenzbildung ermöglicht und die Behandlung erschwert. Diese Entdeckungen führten zur Entwicklung der sogenannten zielgerichteten Therapie und der Immuntherapie mittels Immuncheckpoint-Blockade des malignen Melanoms (beschrieben in 1.1.2). Auch wenn es durch die Entwicklung der neuen Therapieformen zu einem enormen Anstieg der Ansprechraten und einem verlängerten Gesamtüberleben kam, bleibt die Behandlung des fortgeschrittenen Melanoms aufgrund der Resistenzbildungen weiterhin eine Herausforderung [21, 23]. Die neuesten Behandlungsmethoden betreffen Patienten mit lokal fortgeschrittenen, inoperablen oder fernmetastasierten Melanomen, wobei ihr Einsatz aktuellen Studienergebnissen nach auch bereits adjuvant bei operierten Melanompatienten mit hohem Rezidivrisiko wirkungsvoll ist.

1.1.2.1 Zielgerichtete Therapie mit Tyrosinkinaseinhibitoren

Im Melanom wurden durch Mutation aktivierte Gene und deren molekulare Signalwege beschrieben. Die zielgerichtete Therapie ist spezifisch gegen diese Gene oder Signalwege gerichtet. Kleinmolekulare Inhibitoren von BRAF oder MEK sind ein effektiver Ansatz in der Therapie des metastasierenden Melanoms. Die Mutation V600E im BRAF-Gen, das im MAPK-Kinase-Signalweg eine Rolle spielt, beschreibt eine Substitution der Aminosäure Valin an Position 600 durch Glutaminsäure (Signalweg siehe Abbildung 3). Dieser Signalweg ist von großer Bedeutung hinsichtlich der Regulation von Genexpression, Wachstum und Überleben von Zellen. Mutationen innerhalb dieses Signalwegs führen zu vermehrter Proliferation und Schutz gegenüber Apoptose [24].

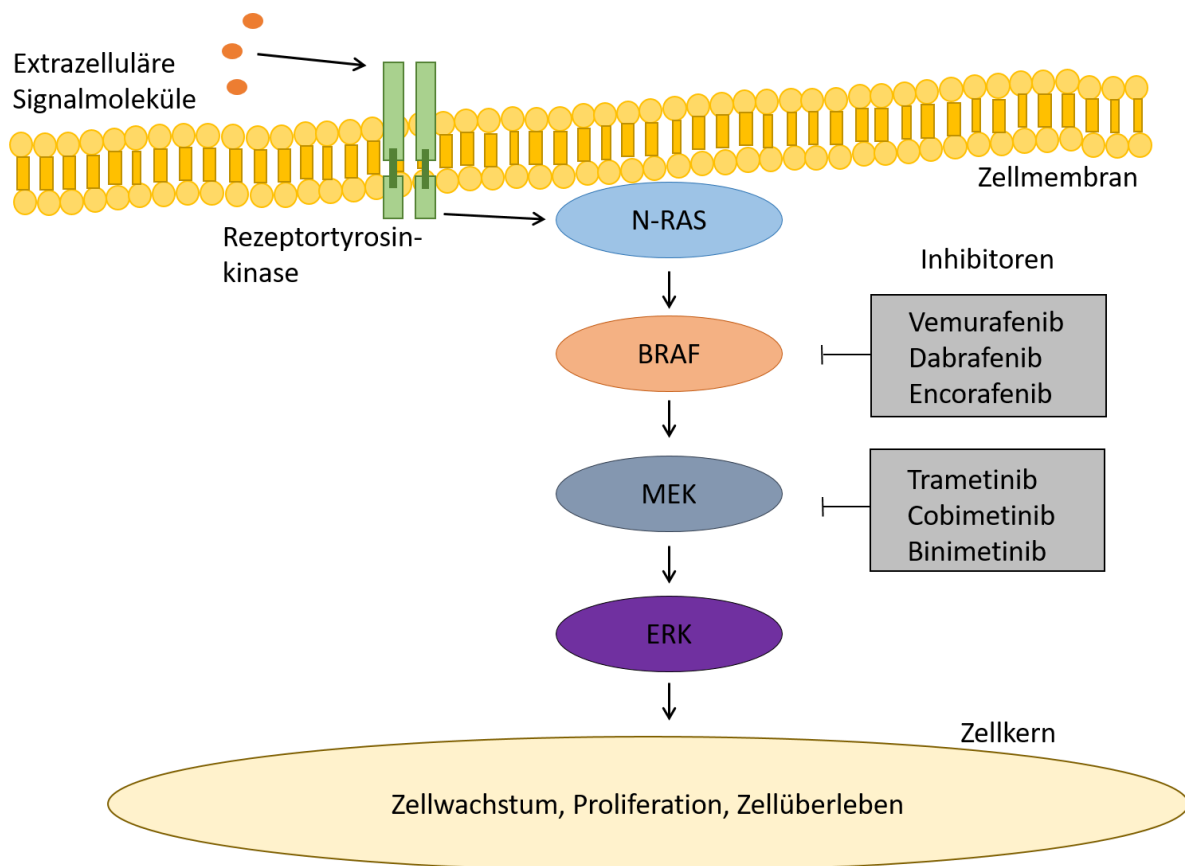


Abbildung 3: MAPK-Signalweg. Durch Bindung von extrazellulären Signalmolekülen an Rezeptortyrosinkinase in der Zellmembran aktivieren diese NRAS mittels Phosphorylierung. Die Aktivierung veranlasst BRAF-Proteine zur Zellmembran zu wandern, wo diese aktiviert werden. Im nächsten Schritt phosphoryliert BRAF die Proteinkinase MEK, welche wiederum ERK (extracellular-signal regulated kinase) phosphoryliert. ERK ist in der Lage Transkriptionsfaktoren zu aktivieren, welche die Expression von Genen für Zellwachstum, Proliferation und Zellüberleben regulieren. Kleinmolekulare Inhibitoren dieses Signalwegs und deren Angriffspunkte sind beispielhaft abgebildet: BRAF-Inhibitoren Vemurafenib, Dabrafenib und Encorafenib sowie MEK-Inhibitoren Trametinib, Cobimetinib und Binimetinib. Abbildung adaptiert nach [11, 25].

Wird in der zielgerichteten Therapie des Melanoms der MAPK-Signalweg inhibiert, kann das zu einem verminderten Wachstum und einem Absterben der Tumorzellen führen. Aktuell werden folgende Inhibitoren in der Monotherapie des fortgeschrittenen Melanoms verwendet.

Vemurafenib ist ein potenter BRAF-Inhibitor für Patienten mit einer BRAF-Mutation V600E. Diese Mutation führt zu einer dauerhaften Aktivierung des MAPK-Signalwegs. Vemurafenib ist von der US Food and Drug Administration (FDA) und European Medicines Agency (EMA) zugelassen. Gleiches gilt für den BRAF-Inhibitor Dabrafenib. Trametinib hingegen ist ein zugelassener MEK-Inhibitor, welcher bei Vorhandensein der Mutationen BRAF V600E oder V600K verabreicht wird. Die zielgerichtete Therapie kann ausschließlich bei Patienten angewendet werden, deren Tumoren Treibermutationen V600E oder V600K im BRAF-Gen aufweisen.

Aufgrund der Bildung von Resistenzen gegenüber den BRAF- oder MEK-Inhibitoren kommt es rund fünf bis sieben Monate nach Behandlung häufig zu einem wiederkehrenden Wachstum der Metastasen. Diese erworbene Resistenz führt zu einer erneuten Aktivierung des MAPK-Signalwegs [26]. Die molekularen Grundlagen der zugrundeliegenden Resistenzmechanismen beschreiben eine Umleitung des Signalwegs.

Die wichtigsten Resistenzmechanismen gegenüber BRAF-Inhibition können grundsätzlich in MEK-abhängige und MEK-unabhängige Mechanismen eingeteilt werden [26, 27]. Die MEK-abhängigen Resistenzen könnten durch eine Inhibition von MEK1/2 überwunden werden. Zu den MEK-abhängigen Mechanismen zählen NRAS- oder KRAS-Mutationen [28], Trunkierung [29] oder Amplifikation [30] von BRAF oder eine Überexpression von COT (MAP3K8) [31]. MEK-unabhängige Mechanismen beinhalten die Überexpression von Rezeptor-Tyrosinkinasen, wie beispielsweise IGF1R oder PDGFR β [27, 28, 32, 33].

Häufige Nebenwirkungen der BRAF-Inhibitoren sind Gelenkschmerzen, Hautausschlag, Übelkeit, Photosensitivität, Müdigkeit oder die Neubildung von kutanen nicht melanozytären Neoplasien, wie Warzen oder Plattenepithelzellkarzinome [34]. Für MEK-Inhibitoren wurden unter anderem Nebenwirkungen wie Durchfall, akneartiger Hautausschlag, Retinopathie und periphere Ödeme beschrieben [35].

Wie oben beschrieben entwickeln die Tumorzellen nach einer bestimmten Therapiedauer häufig Resistenzen gegenüber den verwendeten Inhibitoren. Die Resistenzentwicklung kann durch Gabe eines BRAF- oder MEK-Inhibitors verzögert werden, was zu einer Verlängerung des Überlebens der Patienten geführt hat (siehe auch 1.1.2.3) [36].

1.1.2.2 Immuncheckpoint-Blockade

Immuntherapien mithilfe von Cytokinen, wie beispielsweise Interferon α (IFN α) oder Interleukin-2 (IL-2) haben trotz der Tatsache, dass das Melanom ein immunogener Tumor ist, wenig Erfolg in der Therapie des Melanoms gebracht [37]. IFN α wird ausschließlich als adjuvantes Therapeutikum verwendet [38, 39].

Immuncheckpoints sind Moleküle, die als Regulatoren der allgemeinen Immunantwort dienen. Dazu gehören die Antigene CTLA-4 (anti-cytotoxic T-lymphocyte antigen-4) und PD-1 (programmed cell death protein-1), welche auf T-Zellen exprimiert werden [40]. CTLA-4 ist ein Transmembran-Rezeptor, exprimiert auf T-Lymphozyten, welcher durch Bindung seines Liganden deaktiviert wird. Hierdurch wird die T-Zell-Aktivierung herabreguliert, CTLA-4 ist somit ein negativer Regulator der T-Zell-Aktivierung [41, 42]. Zytotoxische T-Lymphozyten können Tumorzellen direkt abtöten, wobei T-Helferzellen eine zentrale Rolle in der Anti-Tumor-Immunantwort spielen [21]. T-Helferzellen sind in der Lage, Antigene/Liganden zu erkennen und zu binden. Jedoch haben sie keine zytotoxischen Eigenschaften, sie können

lediglich aufgrund der Bindungen von Liganden entsprechende Zytokine ausschütten und dadurch Zellen des Immunsystems (z.B. zytotoxische T-Lymphozyten) aktivieren. Binden nun monoklonale Antikörper an den CTLA-4-Rezeptor, beispielsweise Ipilimumab (ein anti-CTLA-4 monoklonaler Antikörper), kommt es zur zellulären Immunität (siehe Abbildung 4). Diese Art der Checkpoint-Blockade, fördert die Anti-Tumor-Reaktion des Körpers, indem die Unterdrückung des Immunsystems gestoppt wird [40].

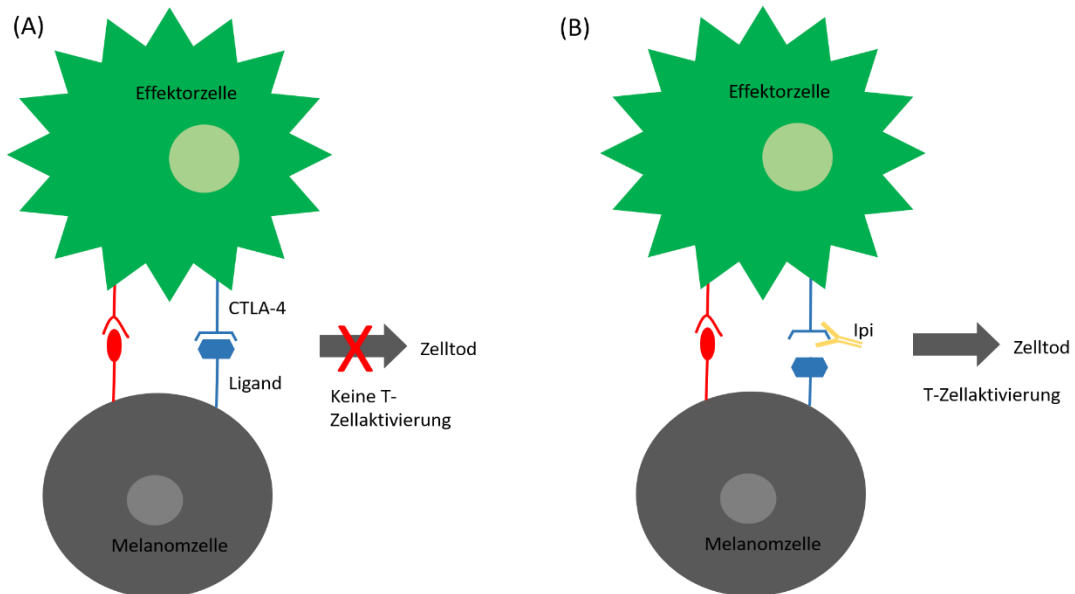


Abbildung 4: Immuncheckpoint-Blockade - Anti-CTLA-4-Reaktionsschema. (A) CTLA-4 auf den T-Zellen (hier Effektorzelle) wird von Antigen-präsentierenden Zellen (APCs), in diesem Fall Melanomzellen, gebunden. Durch die Bindung des Liganden an CTLA-4 wird eine T-Zellaktivierung unterbunden. (B) Der monoklonale Antikörper Ipilimumab (Ipi) ist ein Antagonist, der an CTLA-4 bindet. Durch die T-Zellaktivierung werden antitumorale Effekte ausgelöst und die Bekämpfung der Melanomzellen durch das Immunsystem verstärkt.

PD-1 wird auf T-Zellen exprimiert, der PD-1-Ligand auf Melanomzellen. Die Bindung der beiden wirkt als negativer Regulator der T-Zellen (siehe Abbildung 5). PD-1 interagiert mit zwei bekannten Liganden, PD-L1 (Ligand 1) und PD-L2. Im Vergleich zu CTLA-4 agiert PD-1 erst in einem späteren Stadium der T-Zellaktivierung und wirkt hauptsächlich auf regulierende T-Zellen in der Mikroumgebung des Tumors [40]. Aktuell sind zwei PD-1-inhibierende monoklonale Antikörper zur Therapie des Melanoms zugelassen: Nivolumab und Pembrolizumab [21]. Der inhibitorische Effekt von PD-1-Antikörpern beruht auf zwei Mechanismen. Zum einen wird durch Antigen-spezifische T-Zellen in den Lymphknoten der programmierte Zelltod (Apoptose) gefördert. Zum anderen wird die Apoptose in regulatorischen T-Zellen reduziert [21]. PD-1-Inhibitoren haben eine höhere klinische Aktivität als Ipilimumab bei gleichzeitig weniger Nebenwirkungen [43].

Die Blockade von Immuncheckpoints kann zu immunvermittelten Nebenwirkungen führen, welche jedes Organ betreffen können. Meistens treten diese Nebenwirkungen aber an der Haut, dem Magen-Darm-Trakt, der Leber oder dem endokrinen System auf. Bei Behandlung mit PD-1-Inhibitoren kann es außerdem zu Entzündungen des Lungengewebes (Pneumonitis) kommen. Müdigkeit und Juckreiz sind die häufigsten Nebenwirkungen bei der Behandlung mit PD-1-Inhibitoren [21].

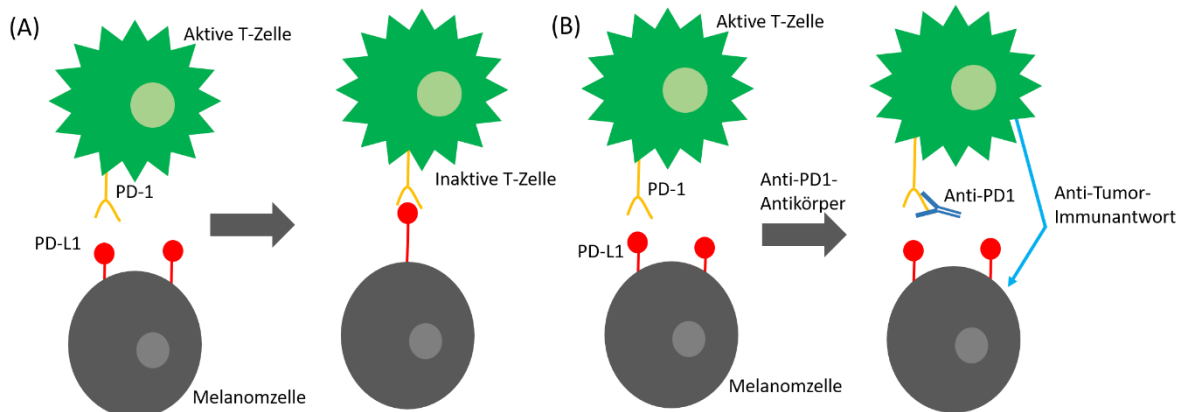


Abbildung 5: Immuncheckpoint-Blockade - Anti-PD1-Reaktionsschema. (A) Melanomzellen exprimieren PD-L1 auf ihrer Oberfläche. Der Ligand PD-L1 bindet an den von T-Zellen exprimierten PD-1-Rezeptor und kann T-Zellen dadurch inaktivieren. (B) Anti-PD1-Antikörper sind in der Lage, an den PD-1-Rezeptor (Immuncheckpoint) zu binden und somit die Inaktivierung zu verhindern. Die T-Zelle bleibt aktiv und löst eine effektive Anti-Tumor-Immunantwort aus.

1.1.2.3 Kombinationstherapie

Aufgrund der Entwicklung von Resistenzmechanismen des malignen Melanoms gegenüber Monotherapien werden verschiedene BRAF- und MEK-Inhibitoren kombiniert und auch PD-1-Inhibitoren und Ipilimumab in Kombination eingesetzt. Somit können Signalwege oder das Immunsystem an verschiedenen Punkten gleichzeitig blockiert oder stimuliert werden [26].

Die gleichzeitige Inhibition von BRAF (Vemurafenib oder Dabrafenib) und MEK (Cobimetinib oder Trametinib) in Melanompatienten mit Mutationen in den Genen BRAF V600E oder BRAF V600K verlängert das progressionsfreie und das Gesamt-Überleben im Vergleich zu BRAF-Inhibitor-Monotherapie und zu Chemotherapie mit Dacarbazin [26]. Die Kombination von Dabrafenib und Trametinib [44] wurde 2014 von der FDA und 2015 von der EMA zugelassen, ebenfalls wurde die Kombination Vemurafenib und Cobimetinib 2015 zur Therapie des fortgeschrittenen BRAF-V600-mutierten Melanoms zugelassen. Auch bei diesen Kombinationstherapien kann es zur Bildung von Resistenzen und zur Reaktivierung des MAPK-Signalwegs kommen, jedoch geschieht dies im Vergleich zur BRAF-Inhibitor-

Monotherapie deutlich verzögert, was sich in ein signifikant verlängertes progressionsfreies und Gesamt-Überleben der Patienten übersetzt [21].

Die Kombination der Immun-Checkpoint-Inhibitoren Ipilimumab und Nivolumab wurde 2016 von der FDA und der EMA zur Behandlung von Patienten mit einem fortgeschrittenen, nicht-resezierbaren oder metastasierten Melanom zugelassen. Die Kombination ist hinsichtlich der Ansprechraten und des progressionsfreien Überlebens signifikant wirksamer als die Behandlung mit Ipilimumab oder mit Nivolumab in der Monotherapie (CheckMate-067-Studie).

Aktuell werden Kombinationen aus zielgerichteter und immunonkologischer Therapie in klinischen Studien getestet [45]. Mit diesem Ansatz wird vor allem eine verlängerte Dauer des Gesamtüberlebens erhofft [46].

1.2 Der embryonale Transkriptionsfaktor Brn3a (POU4F1)

1.2.1 Entwicklung der Neuralleiste und Entstehung von Melanozyten

Das maligne Melanom ist ein neuroektodermaler Tumor [47]. Melanomzellen entwickeln sich aus den pigmentbildenden Melanozyten. Der embryonale Ursprung von Melanozyten sind Neuralleistenzellen (NCC, neural crest cells), welche während der Neurulation in dem sich entwickelnden Embryo gebildet werden. NCCs sind in der Lage, sich neben Melanozyten in verschiedene Zelltypen wie Neuronen, Gliazellen, glatte Muskelzellen oder Fibroblasten zu differenzieren, welche sich stark in Funktion und Lokalisation unterscheiden [3, 7, 48]. Das Zellschicksal wird nicht erst auf dem migratorischen Weg aus der Neuralleiste, sondern bereits in der Neuralleiste entschieden [7, 49]. In Säugetieren beginnt die Determinierung zu Melanozyten mit der Expression von SOX10 (sex determining region Y-box 10) in NCC (Abbildung 6 (1)). Die NCC beginnen die Invasion und Migration entlang des dorso-lateralen Wegs zwischen dem Ektoderm und den Somiten (2). Durch Expression von MITF (microphthalmia-associated transcription factor) entstehen aus NCC Melanoblasten, die Vorläuferzellen der Melanozyten (3) [7, 50]. Melanoblasten differenzieren und proliferieren weiterhin. Sie migrieren durch die Dermis zur Epidermis und in Haarfollikel, wo sie schließlich zu Melanozyten differenzieren und Melanin produzieren (4) [3].

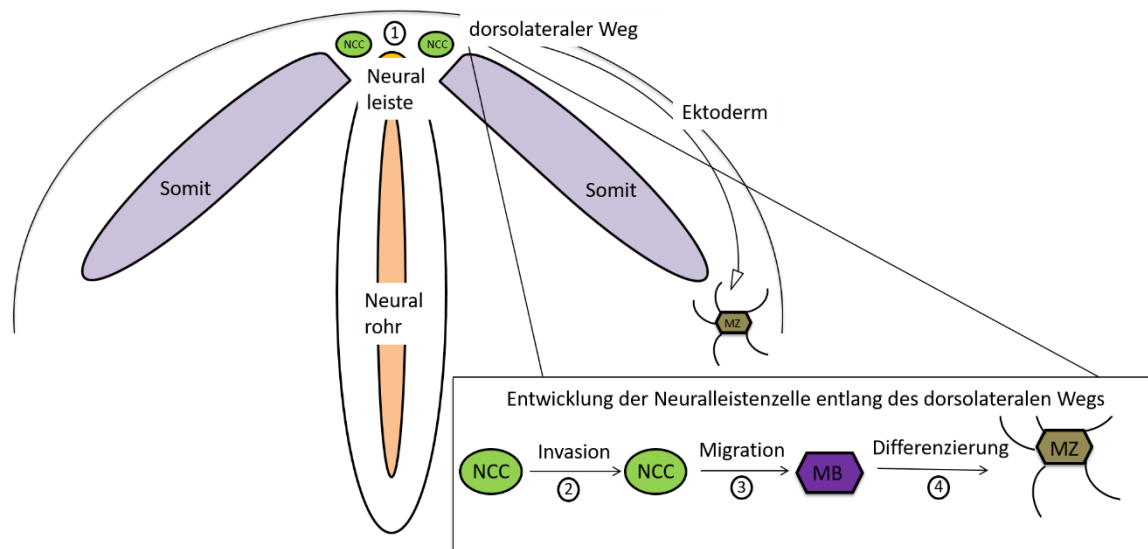


Abbildung 6: Entwicklung aus der Neuralleiste. Migration und Proliferation von Neuralleistenzellen zu Melanozyten. Die Differenzierung der Melanozyten beginnt in der Neuralleiste, von hier durchlaufen Neuralleistenzellen eine epitheliale-mesenchymale Transition (1). Entlang des dorso-lateralen Wegs verlassen die Neuralleistenzellen (NCC) ihre Lokalisation hinter dem Neuralrohr. Die NCCs haben ein invasives Verhalten, was auch bei Tumorzellen zu beobachten ist (2). NCCs proliferieren und werden zu Melanoblasten. Melanoblasten migrieren während ihrer Differenzierung entlang des dorso-lateralen Wegs (3) zwischen Ektoderm und Somiten. Während der Embryogenese wandern Melanoblasten zu embryonalen Haarfollikeln oder der Haut, wo sie weiter ausdifferenzieren und funktionelle Melanozyten bilden, welche Melanin produzieren (4). MZ – Melanozyt, MB – Melanoblast. Abbildung modifiziert und adaptiert nach [47, 50].

Die Entstehung des Melanoms ist in vielen Punkten der embryonalen Entwicklung der Melanozyten gleichartig. Es werden im Melanom bei der Proliferation viele Gene exprimiert, die auch in der Entwicklung der Melanozyten zu finden sind. Zusätzlich erlangen Melanomzellen Eigenschaften, die auch in der Entwicklung der Melanozyten eine entscheidende Rolle spielen, wie beispielsweise die Fähigkeit zur Proliferation, Migration, EMT und Invasion der Zellen [3, 51, 52].

1.2.2 POU-Transkriptionsfaktoren

Mitglieder der POU-Transkriptionsfaktor-Familie findet man in vielen verschiedenen Geweben mit unterschiedlichen Funktionen. Sie werden vor allem in neuronalen Zellen und während der Embryogenese exprimiert [53]. Der Name POU (Pit-Oct-Unc) wurde nach den ersten Transkriptionsfaktoren, die in dieser Familie beschrieben wurden, ausgewählt. In Säugetieren wurden Pit-1, Oct-1 und Oct-2 erstmals beschrieben und in *Caenorhabditis elegans* Unc86 [54, 55] (siehe Tabelle 1). POU-Transkriptionsfaktoren werden aufgrund ihrer

Sequenzähnlichkeiten in 6 Klassen eingeteilt. Sie weisen eine hohe Vielfalt in ihren Funktionen auf. POU-Transkriptionsfaktoren regulieren häufig essentielle Gene der Entwicklung. Beispielsweise spielt der Brn2 POU-Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle in der Entwicklung von neurosekretorischen Neuronen und bei Zellen des endokrinen Systems. Im Melanom beeinflusst Brn2 die Proliferation und Migration von Melanomzellen, was auf eine onkogene Rolle hindeutet [56-58].

Klasse	POU-Faktor	Synonym	Expression			Funktion
			Embryonal	Adult	Tumorigen/ Aberrant	
I	POU1F1	Pit1	Hypophyse Neuralrohr	Hypophyse	Brustkrebs	Überleben von Hypophysen- Zellen
II	POU2F1	Oct-1/OTF-1	Gehirn Neuralrohr	Ubiquitär	Gebär- mutterhals- krebs	Gastrulation Apoptose
	POU2F2	Oct-2/OTF-2	Neuralrohr	Neuronen Lymphzellen		Proliferation reifender B- Zellen
	POU2F3	Oct-11/Skn- 1a	Epidermis	Hoden Thymus		
III	POU3F1	Oct-6	Embryonale Stammzellen Neuralleiste	Gehirn Hoden		
	POU3F2	Brn-2	Hypothalamus Hypophyse	Hypothalamus Hypophyse		
	POU3F3	Brn-1		Gehirn		
	POU3F4	Brn-4	Neuralleiste sich entwickelndes Nervensystem	Gehirn		
IV	POU4F1	Brn-3a	sich entwickelndes Nervensystem Rückenmark Hirnstamm Retina	Ganglien Zentrales Nervensystem Brust Gebärmutter- hals Hoden Retina Milz	Ewing- Sarkom Neuro- epitheliom Gebärmutter- halskrebs Prostatakrebs Melanom Brustkrebs	Auswachsen von Neuriten Schutz vor Apoptose
	POU4F2	Brn-3b	sich entwickelndes Nervensystem	Ganglien	Neuroblastom Blasenkrebs Merkelzell- karzinom	Entwicklung retinaler Ganglion- zellen

	POU4F3	Brn-3c	sich entwickelndes Nervensystem	Gehirn		Entwicklung der Haarzellen des Innenohrs
V	POU5F1	Oct-3/4	Embryonale Stammzellen, Testis, Ovar	Oozyte Testis	Versch. Tumoren	Pluripotenz
	POU5F2	Sprm-1	Neuronen	Testis Gehirn	Versch. Tumoren	
VI	POU6F1	Brn-5	sich entwickelndes Nervensystem, Retina Hypothalamus	Gehirn, Niere, Muskel, Testis Retina Hypothalamus	Eierstock- karzinom Wilms-Tumor	
	POU6F2	Rpf-1	sich entwickelndes Nervensystem, Retina Hypothalamus	Gehirn, Niere, Muskel, Testis Retina Hypothalamus		

Tabelle 1: Überblick über POU-Transkriptionsfaktoren. Dargestellt sind die Expression der POU-Transkriptionsfaktoren während der Embryogenese, in adultem Gewebe und in Tumoren sowie deren Funktion. Adaptiert und modifiziert nach [53, 59] und nach Dissertation von Dr. Tobias Hohenauer (2010).

Die POU-Domäne ist ein hoch konservierter Abschnitt, der DNA und Ko-Regulatoren binden kann. Dieser Abschnitt ist in allen POU-Transkriptionsfaktoren identisch. Er ist unterteilt in zwei Subdomänen: eine C-terminale Homeodomäne (POU_H) und eine N-terminale POU-spezifische (POU_S) Domäne. Die beiden Subdomänen bilden eine funktionelle Einheit und sind unerlässlich für die sequenzspezifische DNA-Bindung [54, 59]. POU-Domänen-Proteine sind transkriptionelle Regulatoren. Sie binden an DNA durch die Ausbildung von Helix-turn-Helix-Motiven [60]. Eine Einteilung der POU-Transkriptionsfaktoren ist lediglich in Klassen möglich, jedoch besteht selbst innerhalb der verschiedenen Klassen eine Heterogenität bezüglich der Expression und Funktion. Es gibt ubiquitär exprimierte POU-Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise Oct-1 und andere, die eine spezielle Lokalisation, Expression und Funktion inne haben [53]. POU-Domäne-Transkriptionsfaktoren werden in verschiedenen Zelllinien exprimiert, sie können als Regulatoren von Housekeeping-Genen dienen oder als entwicklungs- und zelllinienspezifische Koordinatoren über Entscheidungen des Zellschicksals bestimmen [57, 61, 62]. Trotz der vorherrschenden Heterogenität der POU-Transkriptionsfaktoren können gemeinsame Merkmale dargelegt werden. So sind spezifische Ziele von POU-Proteinen unter anderem Promotoren von Genen, die in der DNA-Replikation eine Rolle spielen, bei der Entwicklung von spezialisierten Zelltypen und bei

viralen Genen [57]. Außerdem haben sie eine essentielle Bedeutung als Regulatoren in der Embryogenese, bei der Entwicklung von Neuralzellen, neuronalen Vorläuferzellen und embryonalen Stammzellen [53]. Tabelle 1 zeigt einen Überblick über die Expression der POU-Transkriptionsfaktoren während der Embryogenese und im adulten Organismus bei Vertebraten, sowie deren Funktion.

1.2.3 Brn3a

Brn3a gehört der Klasse IV der POU-Transkriptionsfaktoren an und wurde erstmals bei der Kodierung seiner POU-Domäne aus Ratten-Gehirnen isoliert und charakterisiert [63, 64]. Die Brn3-Familie besteht aus drei Genen Brn3a (POU4F1), Brn3b (POU4F2) und Brn3c (POU4F3). Diese drei Gene sind essentiell in der neuronalen Differenzierung [65, 66]. Mitglieder der Klasse-IV-POU-Familie binden an eine Konsensus-Sequenz, welche *ATAATTAAT* und kleinere Varianten davon beinhaltet [67, 68]. Trieu et al. haben in ihren Studien gezeigt, dass Brn3a seine eigene Expression in sensorischen Neuronen regulieren kann. Das geschieht mittels eines Clusters von Konsensus-Sequenzen, welche sich ungefähr 5,5 Kilobasen (kb) stromaufwärts des transkriptionellen Starts des Brn3a-Gens befinden [69, 70]. Mithilfe von PCR-Amplifikationen von extrahierter RNA aus neuronalen Zelllinien des Spinalganglions wurde gezeigt, dass es mehr als eine Brn3- verwandte Sequenz gibt [71]. Die Brn3-Gen-Familie ist in dem konservierten N-terminalen Bereich, der POU-Box, mit einem 40 Aminosäuren umfassenden Bereich identisch [72]. Die Expressionsmuster der drei Gene der POU-IV-Klasse unterscheiden sich zu bestimmten Zeitpunkten der Entwicklung und haben eine räumlich differenzierte Expression, somit können sie als zellspezifische Unterscheidungsmerkmale dienen [65, 73].

Brn3a liegt auf dem Chromosom 13 mit dem Genlokus q31.1 [74], Brn3b auf Chromosom 4 mit dem Genlokus q31.22 [64] und Brn3c auf Chromosom 5 mit Genlokus q32 [75]. Außerhalb der konservierten POU-Box sind Brn3a und Brn3b nur in 28,9% homolog. Zusätzlich ist Brn3b 67 Aminosäuren kürzer als Brn3a. Dies lässt darauf schließen, dass Brn3a und b von zwei unterschiedlichen Genen kodiert werden [64]. Gezieltes Ausschalten von Brn3-Genen ermöglicht Rückschlüsse auf deren Rolle im sensorischen System. Beispielsweise zeigt eine Brn3b-Knockout-Maus einen Verlust der retinalen Ganglienzellen [76-79] und eine Brn3c-Knockout-Maus Defekte des Gehörs und Gleichgewichtsstörungen [80]. Brn3b und Brn3c sind im Gegensatz zu Brn3a in ihrer Expression auf bestimmte Gewebe, wie die Retina oder das Innenohr, beschränkt [78, 80, 81].

1.2.3.1 Expression und Funktion von Brn3a

Während der Embryogenese wird der POU-Domänen-Transkriptionsfaktor Brn3a in proliferierenden Vorläuferzellen des peripheren Nervensystems und in frühen postmitotischen Neuronen des ZNS (zentrales Nervensystem) exprimiert [76, 82]. Postmitose beschreibt Zellen im Zellzyklus, welche sich in der G₀-Phase befinden, entweder ruhende („quiescent“) oder seneszente Zellen. Diese Zellen teilen sich nicht. Brn3a wird in sich entwickelnden sensorischen Neuronen wie dem Spinalganglion, sensorischen Ganglien des Hinterhirns und in Trigeminalganglien exprimiert [83]. Die Expression von Brn3a definiert die erste Post-Mitose der Neuronen in der Entwicklung des ZNS [76]. Der kritische Punkt bei der Entwicklung von Neuronen-Zellen ist deren Zugang zu neurotrophen Faktoren, welche durch die Aktivierung von TrkA- (Tropomyosin Rezeptor Kinase A-), TrkB- und TrkC-Rezeptoren gebildet werden können. Brn3a ist ein Regulator der Trk-Rezeptoren. Bei TrkA und B ist Brn3a für die Aufrechterhaltung der Expression und bei TrkC für die Initiation der Expression zuständig [84].

In Knockout-Experimenten bei Mäusen wurde festgestellt, dass es durch Fehlen von Brn3a in der Embryogenese zu einer massiven Induktion von Apoptose von Neuronen-Zellen kommt. Dies führt aufgrund von sensorischen und motorischen Defekten kurz nach der Geburt zum Tod der Mäuse [85, 86]. Zusätzlich wurde in KO-Mäusen gezeigt, dass Brn3a für das korrekte Axonwachstum, die Innervation und das Überleben von Trigeminalganglionneuronen und Neuronen des Spinalganglions essentiell ist [87]. Während der Embryogenese ist Brn3a wesentlich für das Überleben und die Differenzierung von sensorischen und motorischen Neuronen [53, 88].

Brn3a dient unter anderem als transkriptioneller Regulator und ist in der Lage, das Protoonkogen Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) transkriptionell zu aktivieren, um sensorische Neuronen vor Apoptose zu beschützen [89]. Das Tumorsuppressorgen p53 ist in der Lage, die Aktivierung des Bcl-2-Promotors durch Brn3a zu inhibieren, indem es nach Bindung an die Promotorregion von Bcl-2 direkt mit Brn3a interagiert [90]. Es wurde gezeigt, dass Brn3a in kultivierten, neuronalen Zellen durch Entzug von Serum oder durch mechanische Verletzungen Apoptose reduziert [91].

Außerdem reguliert Brn3a Bcl-x_L der Bcl-2-Familie. In Überexpressionsexperimenten von Brn3a in Kulturen von trigeminalen und Spinalganglien-Neuronen, als auch in primären Kulturen von sensorischen Neuronen wurde gezeigt, dass Brn3a die Bcl-x_L-Expression sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* aktiviert. Somit wurde gezeigt, dass Brn3a die Fähigkeit besitzt, den Bcl-x-Promotor in Neuronen-Zellen zu aktivieren [88]. In Brn3a-Einfach- und Doppelt-Mutanten wurde dessen Rolle in der Entwicklung der Spinalganglien und der sensorischen Neuronen des Rückenmarks bestimmt. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass

Brn3a für die korrekte Spezifizierung der Neuronen des Spinalganglions und für die Regulation der Zuordnung zu den Zielgeweben zuständig ist [92]. Jedoch konnte keine Herabregulation von Bcl-2 und Bcl-x_L durch Brn3a auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Dies deutet darauf hin, dass Brn3a kein direkter Regulator der beiden Gene ist [93].

Überdies ist Brn3a auch als direkter Repressor tätig. In dem sich entwickelnden Trigeminalganglion unterdrückt Brn3a NeuroD4 und NeuroD1, welche wichtig für Zellentwicklung und Zellaktivität sind und zur Gruppe der bHLH (basic helix-loop-helix) - Transkriptionsfaktoren gehören [94]. Zusammenfassend stellen Lanier et al. [95] die Hypothese auf, dass die meisten Zielgene von Brn3a zwischen sensorischen Neuronen auf kranialer und spinaler Ebene erhalten sind [94].

1.2.3.2 Brn3a in Tumoren

Eine veränderte Expression oder Abweichungen in der Funktion von Transkriptionsfaktoren, welche die zelluläre Differenzierung regulieren, sind häufig an der Entstehung und Progression von Tumoren beteiligt [96].

Bei mehr als 50% der Prostatatumoren wurde eine signifikante Hochregulation von Brn3a gefunden. Darüber hinaus wurde bei Überexpressionsexperimenten von Brn3a *in vitro* ein gesteigertes Zellwachstum von Prostatakarzinomzellen gezeigt [97]. Brn3a ist außerdem erhöht in Gebärmutterhalskrebs [98], neuroendokrinen Tumoren wie dem kleinzelligen Lungenkarzinom [99], dem Ewing-Sarkom und in neuroepithelialen Tumoren [74, 97, 100] nachgewiesen worden. In Gebärmutterhalskrebszellen wird angenommen, dass Brn3a als Schlüsselmolekül für tumorigenes Wachstum agiert. Durch die anti-apoptotischen Eigenschaften von Brn3a kann es hier zum Tumorwachstum beitragen [101].

Brn3a ist im Melanom exprimiert und essentiell für das Überleben von Melanomzellen *in vitro* und *in vivo*. Eine Hemmung von Brn3a in Melanomzellen mittels siRNA führte zu einer Reduktion des Überlebens der Melanomzellen, sowie zu einem Rückgang des Tumorwachstums *in vivo* [93]. In primären Zellen der Haut wie Melanozyten, Fibroblasten und Keratinozyten wird Brn3a nicht oder nur in geringem Maße exprimiert. Die Gründe für diese aberrante Expression sind bisher unbekannt. Darüber hinaus führt eine ektopisch gesteigerte Expression von Brn3a in Melanozyten zu einem verankerungsunabhängigen und potentiell onkogenem Wachstum [93].

1.2.4 Weitere neuronale Transkriptionsfaktoren

Brn2 (POU3F2) ist ebenfalls ein POU-Transkriptionsfaktor und spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung und Differenzierung von neuronalen Zellen [102, 103]. In adultem Gewebe

wird Brn2 im Hypothalamus und in der Hirnanhangsdrüse exprimiert. Der Transkriptionsfaktor wird unter anderem mit Tumoren wie dem Merkelzellkarzinom, Lungenkarzinom und malignen Melanom assoziiert [53]. Aber Brn2 spielt eher eine Rolle am Anfang der Krankheitsentstehung, nicht in der Progression. Cook et al. haben gezeigt, dass Brn2 nur geringfügig in Melanozyten, jedoch verstärkt in Melanozyten-Vorläuferzellen (Melanoblasten) exprimiert wird [104]. Flammiger et al. haben eine Expression von Brn2 in Melanomzellen verschiedener Progressionsstadien, jedoch nur in geringem Maße in Melanozyten gefunden [105].

SOX9 und SOX10 gehören der SOX-Familie der Transkriptionsfaktoren an. SOX-Proteine spielen wichtige Rollen in der Entwicklung und der normalen Physiologie von verschiedenen Gewebearten, indem sie eine Vielzahl biologischer Vorgänge regulieren [106]. SOX-Proteine können durch zeitliche und räumliche Expression Stammzell-Eigenschaften aufrechterhalten oder aber terminale Differenzierungen einleiten [107, 108]. SOX9 ist wesentlich beteiligt an der Sexualdeterminierung und der Knorpelentstehung. Außerdem wurde eine Interaktion von SOX9 mit SOX10 und Brn2 in der Differenzierung von Melanozyten und eine erhöhte Expression in pigmentierten Melanomzellen beobachtet [109]. In der Embryonalentwicklung von Melanozyten ist SOX10 ein Schlüsselmolekül [110]. SOX10 ist in der Lage, Multipotenz, Proliferation und Differenzierung von Neuralleistenzellen unter anderem in Pigmentzellen zu kontrollieren [106]. Bakos et al. zeigten, dass weniger als 50% der Melanomzellen SOX10 exprimieren und mehr als 70% eine moderate oder hohe SOX9-Expression aufweisen [111]. Studien von Graf et al. haben eine erhöhte Expression von SOX10 in Melanozyten gegenüber Melanomzellen nachgewiesen [110].

Der Transkriptionsfaktor MITF spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Differenzierung und Pigmentbildungsfähigkeit von Melanozyten [111, 112]. Er kontrolliert außerdem Überleben, Proliferation und Migration von Melanomzellen [113]. SOX-Transkriptionsfaktoren sind in der MITF-Aktivierung involviert und Brn2 ist in der Lage, MITF direkt zu reprimieren [57, 58, 111]. Vachtenheim et al. postulieren, dass niedrige MITF-Spiegel in Melanomzellen mit Seneszenz einhergehen, wobei sie auch beschreiben, dass niedrige Spiegel an MITF Zellinvasion begünstigen und Proliferation unterdrücken und hohe Spiegel Differenzierung und Proliferation stimulieren [114]. MITF wird in über 80% aller Melanome in allen Stadien exprimiert [115, 116] und ist außerdem ein Melanozyten-spezifischer Transkriptionsfaktor [117, 118]. MITF ist ein Proliferationsmarker. Die Expression von MITF ist dynamisch und somit von vielen verschiedenen Faktoren in den Zellen abhängig.

1.3 Mechanismen epigenetischer Genregulation

In der Epigenetik werden Veränderungen an Genen untersucht, die zwar bei der Zellteilung weitergegeben werden können, aber die DNA-Sequenz nicht verändern [119]. Es werden hierbei die Effekte der Umwelt auf die Genexpression, die in unterschiedlichen Phänotypen resultieren, untersucht. Epigenetische Studien beinhalten molekulare und zelluläre Aspekte sowie Umwelteinflüsse auf die Genetik und jegliche Veränderungen des Phänotyps, die die DNA-Sequenz nicht beeinflussen [120-122]. Die meisten epigenetischen Veränderungen sind reversibel entstehen durch Modifikationen wie DNA-Methylierung, Regulation durch nicht-kodierende RNA-Moleküle (micro-RNAs oder short interfering-RNAs) oder posttranslationale Histonmodifikationen, wie Acetylierung, Phosphorylierung, Sumoylierung und Ubiquitylierung (siehe auch Abbildung 7) [119, 123]. Diese Modulationen führen zu veränderter transkriptioneller Aktivität [120]. Die Zugänglichkeit der DNA ist ein wichtiger funktioneller Parameter, der die Bindung von Transkriptionsfaktoren und die Genexpression beeinflusst [124]. Veränderungen in der Zugänglichkeit der DNA können dazu führen, dass bestimmte DNA-Abschnitte oder Gene nicht oder vermehrt abgelesen werden.

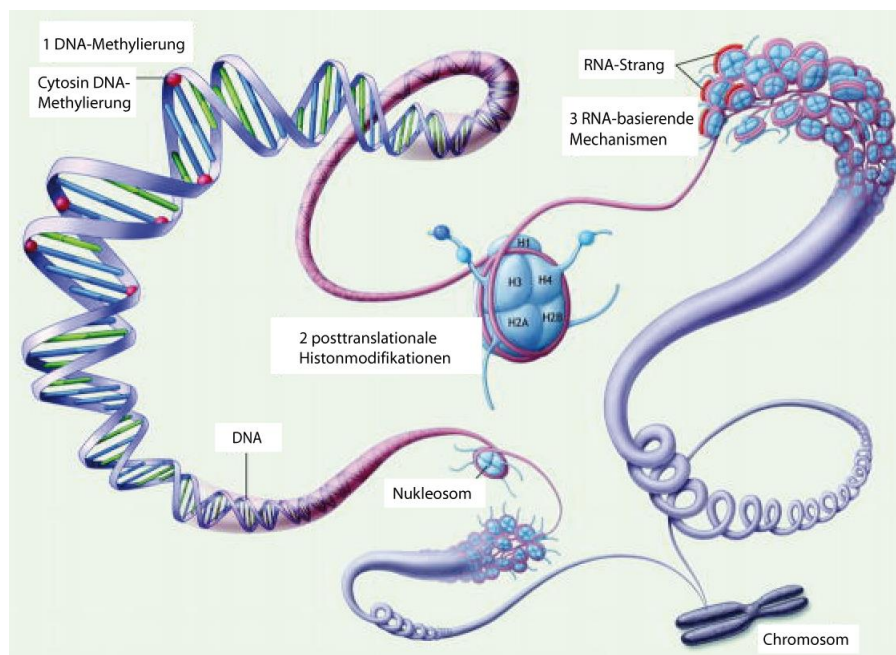


Abbildung 7: Epigenetische Mechanismen der Genregulation. Dargestellt sind epigenetische Mechanismen, die wichtige Rollen in der Kontrolle der Genexpression spielen: DNA-Methylierung, Histonmodifikationen und RNA-basierende Signalwege. 1 DNA-Methylierung, hier gezeigt als rote Kugeln, ist die kovalente Modifizierung des Cytosins der CpG-Dinukleotide. 2 posttranslationale Histonmodifikationen, dargestellt als hell- und dunkelblaue Kugeln, können die physikalischen Eigenschaften und die Verdichtung des Chromatins verändern. 3 RNA-basierende Mechanismen, als rote Striche dargestellt, die das Chromatin bedecken. Sie sind wichtige Regulatoren, der Chromatinstruktur und der Genexpression. Reproduziert und modifiziert nach [125].

1.3.1 RNA-basierende Mechanismen

Nicht-kodierende RNA- (non-coding RNA, ncRNA) Moleküle werden nicht in Proteine translatiert. Beispiele hierfür sind transfer-RNAs, ribosomale-RNAs oder auch small-interfering-RNAs. NcRNAs sind keine intermediäre Boten zwischen DNA und Proteinen, wie die mRNAs, sondern sie haben andere biologische Funktionen [126]. Die ncRNAs werden aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge in drei Gruppen eingeteilt. Eine Länge von 18-25 Nukleotiden haben small-interfering RNAs sowie microRNAs, die am besten untersuchten Moleküle dieser Klasse. Diese ncRNAs spielen eine Rolle in posttranskriptionellem Gen-Silencing und RNA-Interferenzen [119, 126]. Small RNAs bestehen aus 20-300 Nukleotiden und sind transkriptionelle und translationale Regulatoren [126]. Eine weitere Klasse von ncRNAs besteht aus bis zu 10.000 Nukleotiden. Mitglieder dieser Klasse sind an verschiedenen genregulatorischen Prozessen beteiligt, wie X-Inaktivierung, DNA-Demethylierung, Gen-Transkription oder die Generation anderer RNA-Klassen (z.B. microRNAs, small RNAs) [126].

Im Melanom sind verschiedene miRNAs an Zellzyklus und Proliferation beteiligt [127]. Die miRNA let-7b beispielsweise hemmt Melanomzellwachstum, indem sie Zellzyklusmoleküle, wie CDK1, Cyclin D1 und Cyclin D3 reguliert [128]. Andere miRNAs wie miR193b oder miR221/222 werden ebenfalls mit der Regulation von Zellzyklus und Proliferation im Melanom in Verbindung gebracht. Für mir-137, miR211 oder miR30b/30d wurde herausgefunden, dass sie Melanomzellmigration und -invasion beeinflussen können [126]. Da miRNAs in wichtige Prozesse der Melanomentstehung und -progression involviert sind, könnten sie sowohl als prognostische Biomarker, als auch als therapeutisches Ziel dienen [126].

1.3.2 Methylierung

Die bisher am besten erforschte epigenetische Veränderung des Genoms ist die DNA-Methylierung [129]. Bei der DNA-Methylierung werden Methylgruppen durch DNA-Methyltransferasen an das C5-Atom eines Cytidin-Nukleotids gehängt, welches in 3'-Richtung an ein mit Guanin-Nukleotid gebunden ist. Diese Verbindung wird kurz CpG- (Cytidin-Phosphat-Guanidin) Dinukleotid genannt [130, 131]. Diese CpG-Dinukleotide können sich in Abschnitten der DNA häufen, welche CpG-Inseln genannt werden [132]. Die Methylierung der CpG-Inseln führt oft zu einem repressiven Chromatinstatus (siehe Abbildung 8) [131]. Normalerweise sind CpG-Inseln in Promotorbereichen von aktiven Genen nicht methyliert. Werden diese methyliert, kommt es zu einer verminderten Genexpression [129]. Korrekte und aufrechterhaltene DNA-Methylierungsmuster sind ein wichtiger Bestandteil der Säugetierentwicklung. Veränderungen in diesen Methylierungsmustern sind wichtige Charakteristika der Entstehung vieler Krebsarten [133]. Durch DNA-

Demethylierungsagenzien kann die Aktivität von DNA-Methyltransferasen inhibiert werden, was zu einer Öffnung des Chromatins führt. In Folge dessen können Gene aktiviert werden. Transkriptionsfaktoren sind durch diese Öffnung nun in der Lage, an Promotorregionen zu binden. Sie bilden einen Transkriptionskomplex, was zur Genexpression führt [134]. Im Melanom werden veränderte Methylierungsmuster mit Melanomprogression assoziiert. Solche Veränderungen in Methylierungsmustern wurden bisher in 70 verschiedenen Genen beschrieben [127].

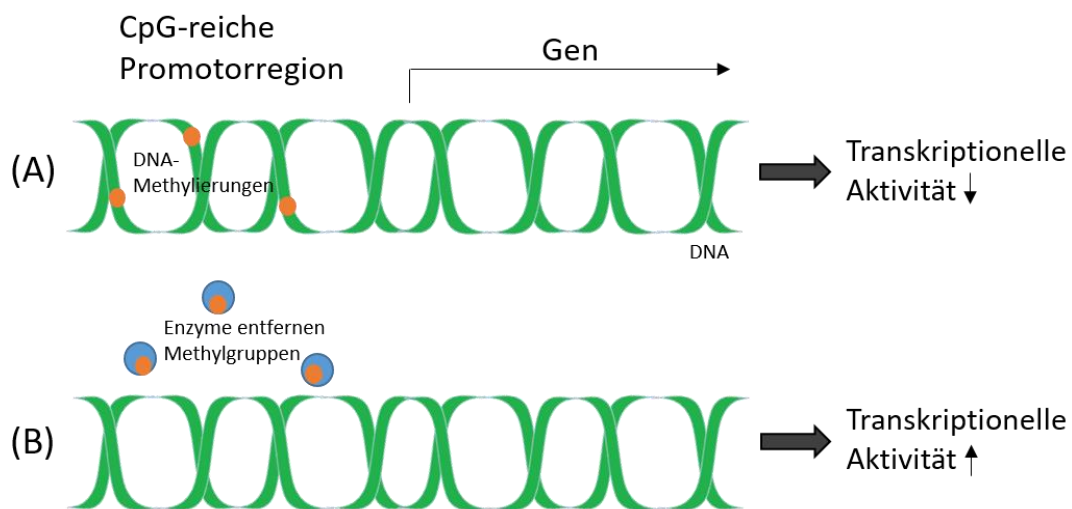


Abbildung 8: DNA-Methylierung. (A) Dargestellt ist die DNA-Methylierung der CpG-Dinukleotide in der Promotorregion eines Gens und die daraus resultierende Verringerung der transkriptionellen Aktivität. In (B) werden durch Enzyme die Methylgruppen entfernt und es folgt aufgrund der besseren Zugänglichkeit der DNA eine Erhöhung der transkriptionellen Aktivität für das Gen. Adaptiert nach Max-Planck-Institut für Psychiatrie/Weber, Forschungsbericht 2014 – ‚Kindesmisshandlung beeinflusst die Gene nachhaltig‘.

Hoon et al. untersuchten die Methylierung unterschiedlicher Gene in 86 Proben von Melanommetastasen [135]. Sie konnten vier Tumorsuppressorgene identifizieren, die häufig hypermethyliert sind. Dazu zählen retinoic acid receptor-b2 (RAR-b2), RAS association domain family protein 1A (RASSF1A), O6-methylguanin DNA Methyltransferase (MGMT), und death-associated protein kinase (DAPK). RAR-b2 war mit 70% das am häufigsten methylierte Gen in dieser Studie. Auch in anderen humanen Krebsarten wird RAR-b2 durch Methylierung gehemmt [136]. RASSF1A spielt eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Apoptose und im Zellzyklus-Arrest und ist in 57% aller untersuchten Melanommetastasen methyliert [135]. MGMT, ein DNA-Reparatur-Protein [137], war in 34% und DAPK, ein Apoptose-Mediator, in 19% der Proben methyliert [135]. In primären Melanomen war die Hypermethylierung von MGMT, RASSF1A und DAPK im Vergleich zu Metastasengewebe

signifikant niedriger [135]. Lee et al. haben eine Korrelation zwischen dem Verlust von 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC) und Parametern einer schlechten Melanomprognose, wie Tumordicke nach Breslow, Mitoserate und Ulzeration gefunden [119]. Sie haben auch einen Zusammenhang mit verringerter Überlebensrate aufgezeigt, was einen potentiellen prädiktiven Wert von 5-hmC bedeuten könnte [138]. Thomas et al. haben 47 primäre Melanome auf Methylierungsprofile untersucht und eine positive Korrelation von Methylierung und Tumordicke nach Breslow, eine schwach positive Korrelation mit Ulzeration und einen negativen Zusammenhang zwischen Methylierung und Mitoserate identifiziert [127, 139].

1.3.3 Acetylierung

Histondeacetylasen (HDACs) sind Enzyme, die durch die Deacetylierung von Lysin ϵ -Aminogruppen in Histonen an der epigenetischen Regulation von Zielgenen beteiligt sind [140]. Histone sind nukleäre Proteine, welche an die DNA binden und diese in den Nucleosomen organisieren. Das Nucleosom ist ein Komplex aus verschiedenen Histonen (Histon H2A, H2B, H3 und H4), der die DNA in dreidimensionale Strukturen bringt. Die Acetylierung der Histon-Lysinreste führt zu einer Lockerung der festen Interaktion der DNA mit den Histonen, vor allem vermittelt durch die acetylierungsabhängige Rekrutierung weiterer Chromatin-Cofaktoren, was zu einer ‚Entspannung‘ der Chromatinkondensation und somit zu einer erhöhten Gentranskription führen kann [141]. Dieses komplexe Zusammenspiel kann durch HDACs dynamisch reguliert werden und zur erneuten Kondensation führen, was einen Rückgang der transkriptionellen Aktivität zur Folge hat (Abbildung 9) [142].

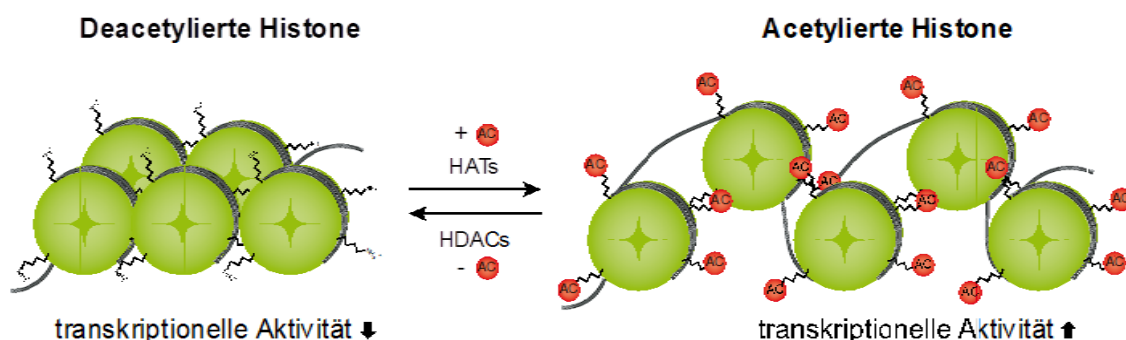


Abbildung 9: Regulation der transkriptionellen Aktivität durch Histondeacetylasen. Durch Acetylierung der Lysinreste an den Histone mittels Histonacetyltransferasen (HATs) kommt es zu einer Lockerung der Interaktionen zwischen DNA und Histonen und somit zur einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität. Dieser Vorgang kann mithilfe von Histondeacetylasen (HDACs) rückgängig gemacht werden [143].

Abweichende Expression und Regulation von HDACs wurden in verschiedenen Krebsentitäten beschrieben [144], da Veränderungen des Acetylierungsstatus von Genen, die in Differenzierungsprozesse, Proliferation, Zellzyklus und Apoptose involviert sind, den Phänotyp von malignen Zellen maßgeblich beeinflussen können. HDACs acetylieren nicht ausschließlich Histon-Proteine, sie können auch Transkriptionsfaktoren oder Enzyme in ihrer Aktivität beeinflussen, dies sind sogenannte ‚Nicht-Histon-Effekte‘ [145].

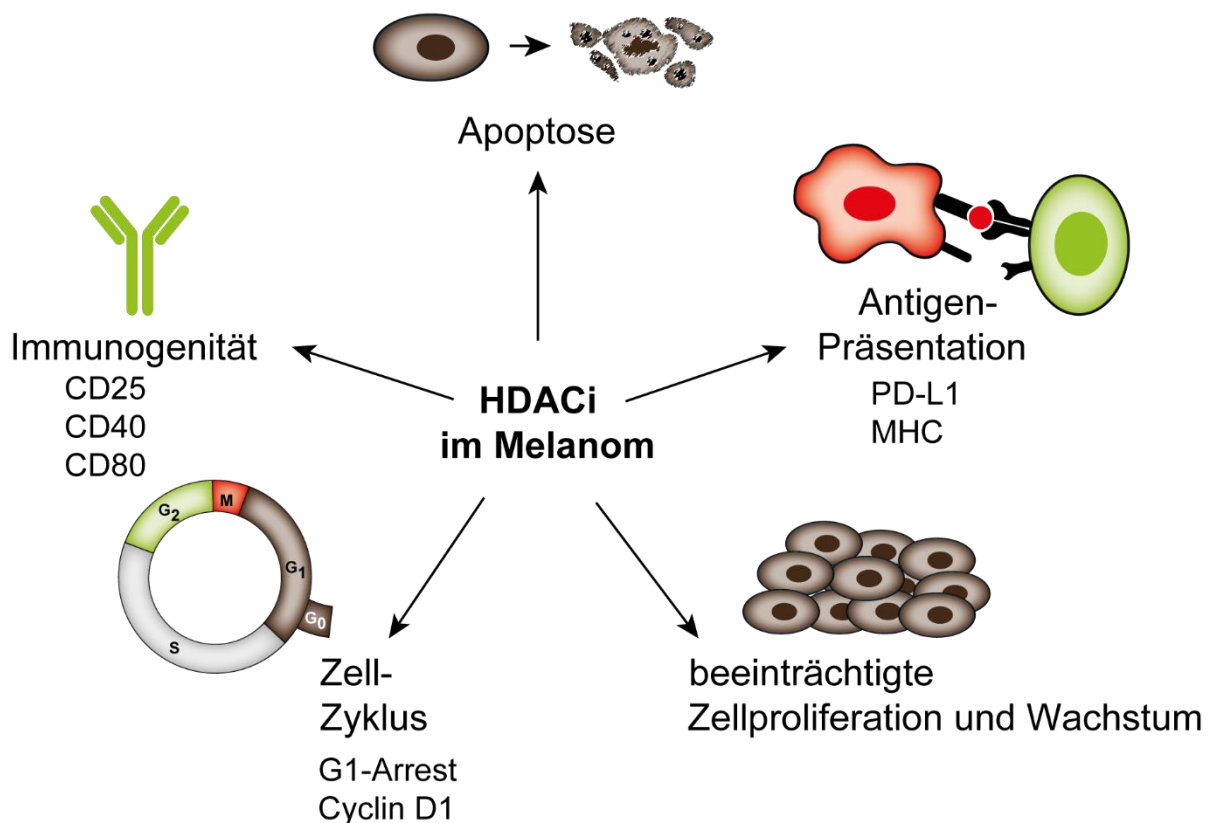


Abbildung 10: Überblick über die Effekte von HDACi (Histondeacetylase-Inhibitoren) im Melanom. HDACi vermögen im Melanom eine veränderte Expression von PD-L1 oder MHC auszulösen, was zu einer Beeinträchtigung der Antigenpräsentation führen kann. HDACi können eine erhöhte Immunogenität auslösen, was durch gesteigerte Expression von CD25, CD40 oder CD80 ersichtlich ist. Weitere Phänotypen sind G1-Zellzyklus-Arrest mit einem Anstieg von Cyclin D1, beeinträchtigte Zellproliferation, Wachstumsreduktion und die Induktion von Apoptose [143].

Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) sind pharmakologische Substanzen, die den Deacetylierungsprozess beeinflussen, was zu einer allgemeinen Zunahme der Histonacetylierung führt (Abbildung 9). HDACi werden seit geraumer Zeit in klinischen Studien getestet. Einige HDACi wurden bereits zur Behandlung von Tumoren zugelassen, wie beispielsweise für das kutane T-Zell-Lymphom, Bauchspeicheldrüsenkrebs und das

Multiple Myelom [144, 146]. HDACi können verschiedene Phänotypen im Melanom auslösen (Abbildung 10) [147]. Die Behandlung mit HDACi im Melanom führt zu einer Hochregulation der Antigenexpression, insbesondere von PD-L1 oder MHC (Major Histocompatibility Complex; Haupthistokompatibilitätskomplex) [148, 149]. Außerdem kann HDAC-Inhibition zu einem Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase und zu Apoptose führen oder auch zytotoxische Effekte auslösen. Diese Auswirkungen gehen oft mit erhöhter Immunogenität (erhöhte Expression von Oberflächenmarkern, wie CD25, CD40, CD80), geringerer Zellproliferation und einer Reduktion des Zellwachstums einher [150-152].

In folgender Tabelle (Tabelle 2) werden die verschiedenen HDAC-Klassen aufgelistet hinsichtlich ihrer Lokalisation, Expression, Knock-out-Phänotypen und Assoziation mit verschiedenen Krebsentitäten:

Klasse	Mitglied	Lokalisation [146, 153]	Expression [146, 154]	<i>In vivo</i> -Phänotypen (Knock-out)	Assoziation mit Krebs [144]
I	HDAC1	Nukleus	Ubiquitär	Embryonale Deletion letal [154] Hochregulation von p21 und p27 [154] Defekte in der Nieren-Entwicklung [154] Defekte in der Proliferation [155] Wachstumsverzögerungen [155]	Kutanes T-Zell-Lymphom Magenkrebs Darmkrebs Prostatakrebs
	HDAC2	Nukleus	Ubiquitär	Defekte in der Nieren-Entwicklung [154] Letal [154] Herzveränderungen [155]	Kutanes T-Zell-Lymphom Magenkrebs Darmkrebs Prostatakrebs
	HDAC3	Nukleus Zytoplasma	Ubiquitär	Letal Darmdefekte [155]	Magenkrebs Darmkrebs Prostatakrebs
	HDAC8	Nukleus	Ubiquitär Entwicklung der glatten Muskulatur	Letal vor der Geburt, aufgrund von Schädelfehlbildung [155]	unbekannt
Ila	HDAC4	Nukleus Zytoplasma	Herzmuskel Skelettmuskel Gehirn	Letal, aufgrund von Verknöcherungen der Knorpel [155]	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (NSCLC)
	HDAC5	Nukleus Zytoplasma	Herzmuskel Skelettmuskel Gehirn	Herzvergrößerung [146]	NSCLC

	HDAC7	Nukleus Zytoplasma	Herzmuskel Plazenta Pankreas Skelettmuskel	Reduzierte Knochenmasse [154]	NSCLC
	HDAC9	Nukleus Zytoplasma	Gehirn Skelettmuskel	Kardiomegalie [146]	unbekannt
IIb	HDAC6	Zytoplasma	Herzmuskel Leber Niere Pankreas	unbekannt	Brustkrebs Kutanes T-Zell- Lymphom NSCLC
	HDAC10	Zytoplasma	Leber Milz Niere	unbekannt	NSCLC
IV	HDAC11	Nukleus	Gehirn Herzmuskel Skelettmuskel Niere	Verstärktes Tumorwachstum [154]	unbekannt

Tabelle 2: Klassifizierung und Charakterisierung von HDACs der Klassen I, IIa, IIb und IV. Die NAD⁺-abhängigen Sirtuine (Klasse III) werden nicht gezeigt. [143].

1.4 Ziele der Arbeit

Welche Faktoren den Transkriptionsfaktor Brn3a regulieren, ist bisher nicht bekannt. Da Brn3a essentiell für das Überleben von Melanomzellen *in vitro* und *in vivo* ist, haben Brn3a-regulierende Faktoren hohe therapeutische Relevanz.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei zentrale Ansätze verfolgt:

1. Die Untersuchung der Rolle von epigenetischen Regulationsmechanismen bei der BRN3a-Expression und die Identifizierung von spezifischen HDACs, die den Brn3a-Lokus deacetylieren.
2. Die Untersuchung der transkriptionellen Regulation von Brn3a durch Trunkierung des Brn3a-Promotorbereichs und Identifizierung der aktiven Bereiche.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antikörper

Primäre Antikörper	Hersteller
Maus-Anti-Brn3a (14A6)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Maus-Anti-HDAC11	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Maus-Anti-HDAC2	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt, Deutschland
Maus-Anti- β -Aktin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ziege-Anti-POU2F3	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Sekundäre Antikörper	Hersteller
Anti-Maus IgG-HRP linked	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
Anti-Karnickel IgG-HRP	Cell Signaling, Leiden, Niederlande
Esel-Anti-Ziege IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

ChIP-Antikörper	Hersteller
Anti-Acetyl-Histone-H3	Millipore, Schwalbach, Deutschland
IgG aus Kaninchen Serum	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.1.2 Apparative Ausstattung

Gerät	Hersteller
CO ₂ -Inkubator, Heracell	Heraeus, Hanau, Deutschland
-80°C Kühltruhe, Ultra-Low Temperature Freezer	New Brunswick, Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Autoklav, Hiclave HV-50	HMC, Tüßling, Deutschland
Bakterienschüttler, CH-4103	Infors HAT, Einsbach, Deutschland
Zentrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Chemikalienabzug Typ7564/F	Köttermann, Hänigsen, Deutschland
Fluorimeter, CytoFlor™2350	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Gel-Kammern für Western Blot, X Cell Sure Lock™, Novex Mini-Cell	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Heizplatte, Magnetrührer, Ikamag® RCT	IKA, Staufen, Deutschland
Hybridisierungsöfen, Inkubator OV11	Biometra, Göttingen, Deutschland
Inverses Mikroskop, CK2	Olympus, Japan
Kühlzentrifuge, Zentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Luminometer GloMAX® 96 Microplate	Turner Biosystems, Promega, Mannheim, Deutschland
Nukleinsäure Elektrophorese Kammer, Horizon™ 11 14	Life Technologies Inc., Bethesda Research Laboratories, USA
Nukleinsäure Gel Imager, Gel Doc 200	Bio Rad, München, Deutschland
Photometer, Smart Spec™	Bio Rad, München, Deutschland
qRT-PCR Gerät, LightCycler™ 2.0	Roche, Mannheim, Deutschland
Robocycler™	Stratagene, Heidelberg, Deutschland
Schüttler für Western Blots, Swip KL-2	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Sonifikator, EpiShear™ Probe Sonicator Q120AM	Active Motif, La Hulpe, Belgien
Sterilwerkbank, Biological Safety Cabinet Class II	NuAire, Minnesota, USA
Sterilwerkbank, Herasafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Stromversorgung für DNA-Gele, HSI	Hofer Scientific Instrument, San Francisco, USA
Stromversorgung für Immunoblot, Power Pac 300	Bio Rad, München, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transilluminator, Fluo-Link	MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland
Vortex Genie 2™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waage, Sartorius LC621S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Wasserbad, U3	Bachofen Laboratoriumgeräte, Reutlingen, Deutschland
Western Blot Entwickler, X-Omat	Kodak, Stuttgart, Deutschland

Zentrifuge, Rotixa	Hettich Lab Technology, Harthausen, Deutschland
--------------------	--

2.1.3 Pharmakologische Agenzien

Inhibitor	Hersteller
CAY 10566	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Mocetinostat (MGCD0103)	Selleckchem, München, Deutschland
PCI-34051	Selleckchem, München, Deutschland
Sodium Butyrate (NaB)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Trichostatin A (TSA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
5-Aza-2'deoxyctidine (Aza)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

2.1.4 Kommerziell erhältliche Komplettsysteme (Kits)

Kit	Hersteller
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis	Agilent Technologies, Oberhaching, Deutschland
RNeasy™ Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Lightcycler® TaqMan®	Roche, Mannheim, Deutschland
Reverse Transcriptase	Roche, Mannheim, Deutschland
Pierce-BCA Protein Assay	Thermo Fisher, Schwerte, Deutschland
CellTiterBlue®	Promega, Mannheim, Deutschland
ECL Plus™	GE Healthcare, München, Deutschland
QIAprep™ Spin Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Mannheim, Deutschland
HDAC-Glo™ 2 Assay	Promega, Mannheim, Deutschland
Mykoplasma Detection Kit	Minerva Biolabs, Berlin, Deutschland
Luciferase Reporter Assay	Promega, Mannheim, Deutschland
NucleoSpin® Gel and PCR clean-up	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid NoLid	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Nuclear Extract Kit	Active Motif, La Hulpe, Belgien

2.1.5 Oligonukleotide

2.1.5.1 *Small interfering RNAs (siRNAs)*

Die folgenden siRNAs wurden nach den publizierten Algorithmen von Reynolds [156] und Uitei [157] entworfen und über MWG Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die siRNA C03 diente als Negativkontrolle, da sie an keine Sequenz des humanen oder murinen Transkriptoms hybridisieren kann [158].

Bezeichnung/ Zielgen	Sequenz (5' nach 3')
HDAC1	CCGGUCAUGUCCAAAGUAA
HDAC3	CGGUGUCCUCCACAAA
HDAC7	GCAAGAUCUCCAUUGUAGA
POU2F3	GUAUUUUGGUAGGAAGAGAA
SIRT3	GCUGACGUGAUGGCAGACA
C03	GCGCAUUCAGCUUACGUATT

In folgender Tabelle sind kommerziell erhältliche siRNAs aufgelistet. Silencer® Pre-designed siRNA, Ambion, Life Technologies, Kaufungen, Deutschland.

siRNA	Sense	Antisense
HDAC2	GCCACUGCCGAAGAAAUGA	UCAUUUCUUCGGCAGUGGC
HDAC11	CGACAAGCGUGUGUACAUC	GAUGUACACACGCUUGUCG

2.1.5.2 *Primer für quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)*

Primer für die quantitative Echtzeit-Polymerasekettenreaktion, basierend auf Sonden, wurden auf der Homepage der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) über eine Online-Software (Assay Design Center) erstellt und über MWG Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bestellt. Die hier verwendeten Sonden stammen aus der humanen Universal Probe Library, welche ebenfalls von Roche bezogen wurden (<https://lifescience.roche.com/webapp/wcs/stores/servlet/CategoryDisplay?tab=Assay+Design+Center&identifier=Universal+Probe+Library&langId=-1>).

Ziel-Gen	Sequenz (5' nach 3')	Sequenz (3' nach 5')	Sonde
ABCB1	GAAATTTAGAAGATCTGATGTCAAAC	ACTGTAATAATAGGCATACCTGGTCA	#65
ABCG2	CACTGAGATTTGGGCTGCTT	TGGAAGACATCTGGAGAGTTTTTAT	#11
BRN2	TTTGCAGGCGAGTAACCAG	TTCTAGCTATCACACACTCTCCTCA	#80
FAM129A	ATGCTGTGGAGAGCTATGAGAA	GGCTGGAAGAATTCGACATTTA	#17
gABCB1	CCCCCAGCCTCTGGTAAC	GGTTAAGGGGCCAGAATAGTTT	#54
gGAPDH	CCCCGGTTCTATAAATTGAGC	CGAACAGGAGGAGCAGAGAG	#75
HDAC1	CGGTGCTGGACATATGAGAC	TGGTCCAAAGTATTCAAAGTAGTCA	#81
HDAC10	TGGGAAGCTCCTGTACCTCTT	GGCTGGAGTGGCTGCTATAC	#42
HDAC11	TGTCTACAACCGCCACATCT	CATCCTCTGTGCCCACT	#39
HDAC2	CAGATCGTGTAATGACGGTATCA	CCTTTCCAGCACCAATATCC	#72
HDAC3	GACCTATGACAGGACTGATGAGG	GAACTCATTGGGTGCCCTG	#82
HDAC4	GTGGTAGAGCTGTCTCAAGG	GACCACAGCAAAGCCATTC	#24
HDAC5	CTGAATACCACACCCTGCTCT	CAAGGCAGCACAGCATACAT	#29
HDAC6	AGTTCACCTTCGACCAGGAC	GCCAGAACCTACCCTGCTC	#58
HDAC7	CTCCAGCAGCACCCCTCAG	CCAGAGGAAGCAGCACAGT	#20
HDAC9	GGCTCAGCTTCAGGAGCATA	CTTCCTGTTCTTGCCCTGCTGC	#68
HPRT	TGACCTTGATTTATTTGCATACC	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	#73
MDA-7	CCGGAGAGCATTCAAACAGT	TCTGCATCCAGGTCAGAAGA	#6
MSX1	CTCGTCAAAGCCGAGAGC	CGGTTTCGTCTTGTGTTTGC	#7
NTN4	TGCACAATAAGAGCGAACCA	TCCTTACATTTCGATTTACCTG	#88
POU2F3	CCAGTCCTGCTATCTCAGACC	AGGAGACCGCTTTGTTGCT	#52
POU4F1	TTTCCTCCACCCATTCTCTG	ACCCAGTCCTCAAGGCTA	#56
SIRT3	GATCTGCTGCTCATCCTTGG	TGAGCAAGTCGGGGAACTG	#39
SOX9	GTACCCGCACTTGCACAAC	TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC	#61
TIMELESS	AAGCCATGAAAACGAACAG	AATTCGCCAGAAGGTTTCCT	#34
WNT5A	ATTGTAAGTGCAGGTGTACCTAAAAC	CCCCCTATAAATGCAACTGTTC	#48

2.1.6 Plasmide

Name	Vektor-Grundgerüst	Insert	Hersteller	Beschreibung
pGL4-Brn3a	pGL4.10_luc2	Brn3a	Promega, Mannheim, Deutschland	Renilla-Luziferase Kontrollvektor für Luziferase-Reporter Assays

pDNR-HDAC2	pDNR-Dual	HDAC2	Harvard Medical School, Boston, USA	Vektor mit humanem HDAC2-Insert, Expressionsvektor
pCMV6-SOX10	pCMV6-XL5	HDAC2	Origene, Rockville, USA	Expressionsvektor
pUC18	pUC18		Agilent Technologies, Oberhaching Deutschland	Kontrollplasmid für Mutagenese-PCR (im Kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis enthalten)
pWhitescript	pWhitescript		Agilent Technologies, Oberhaching Deutschland	Kontrollplasmid für Mutagenese-PCR (im Kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis enthalten)

2.1.7 Puffer und Lösungen

Alkoholische Lösungen

Name	Hersteller
Chloroform 100%	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol 100%	VWR Chemicals, Ismaning Deutschland
Glycerin 50%	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
2-Propanol 70%	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Methanol 20%	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Cold Spring Harbor (CSH)-Puffer zur Proteinisolierung

5x konzentrierte Stammlösung

Name	Menge	Konzentration	Hersteller
Tris, pH 7,4	5 ml	1 M	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

NaCl	5 ml	5 M	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
EDTA	200 µl	0,5 M	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	9,8 ml		Braun, Melsungen AG, Puchheim, Deutschland

1x konzentrierte Arbeitslösung

Name	Menge	Hersteller
5x CSH-Puffer	200 µl	
Triton-X-100 10% stock	10 µl	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
7x Complete Stock	150 µl	Roche, Mannheim, Deutschland
10x PhosphoStop	100 µl	Roche, Mannheim, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	540 µl	Braun, Melsungen AG, Puchheim, Deutschland

Inhibitoren

Name	Menge	Hersteller
7x Complete Stock, Proteaseinhibitor	1 Tablette auf 1,5 ml Aqua ad iniectabilia	Roche, Mannheim, Deutschland
10x PhosphoStop, Phosphataseinhibitor	1 Tablette auf 1 ml Aqua ad iniectabilia	Roche, Mannheim, Deutschland

Weitere Reagenzien

Name	Konzentration	Hersteller
Bovines Serum Albumin (BSA)	10x	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Puffer für Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Wenn nicht anders benannt, wurden alle folgenden Reagenzien für die ChIP von der Firma Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen. Zusätzlich wurde das Aqua ad iniectabilia von Braun, Melsungen AG (Puchheim, Deutschland) und der Protease-Inhibitor-Cocktail von der Firma Roche (Mannheim, Deutschland) bezogen.

Zellyse-Puffer

Name	Menge	Konzentration
Piperazine-N, N'-bis (2-ethanesulfonic acid) (PIPES)	10 ml	5 mM, pH 8,0
KCl	10 ml	85 mM
NP-40 (Zell Lyse Puffer)	10 ml	0,5%
Protease Inhibitor Cocktail	4 ml	25x
Aqua ad iniectabilia	66 ml	

Kernlyse-Puffer

Tris	50 μ l	1 M, pH 8,1
EDTA	20 μ l	0,5 M, pH 8,0
SDS	100 μ l	10%
Protease Inhibitor Cocktail	40 μ l	25x
Aqua ad iniectabilia	790 μ l	

Immunpräzitations-Verdünnungs-Puffer

Tris	33,4 μ l	1 M, pH 8,1
NaCl	66,8 μ l	5 M
EDTA	4,8 μ l	0,5 M, pH 8,0
Triton X-100	2,2 μ l	
SDS	2 μ l	10%
Protease Inhibitor Cocktail	80 μ l	25x
Aqua ad iniectabilia	1810,8 μ l	

Niedrigsalz-Waschpuffer

SDS	100 μ l	10%
Triton X-100	10 μ l	
EDTA	40 μ l	0,5 M, pH 8,0
Aqua ad iniectabilia	9,85 ml	

Hochsalz-Waschpuffer

SDS	100 µl	10%
Triton X-100	10 µl	
EDTA	40 µl	0,5 M, pH 8,0
Tris	200 µl	1 M, pH 8,1
NaCl	1 ml	5 M
Aqua ad iniectabilia	8,65 ml	

LiCl-Waschpuffer

LiCl	1 ml	2,5 nM
NP-40	2 ml	5%
Sodium deoxycholate	0,1 g	
Tris	100 µl	1 M, pH 8,1
EDTA	20 µl	0,5 M, pH 8,0
Aqua ad iniectabilia	6,88 ml	

Elutions-Puffer

SDS	100 µl	10%
NaHCO ₃	200 µl	0,5 M
Aqua ad iniectabilia	700 µl	

TE-Puffer (1x)

Tris	500 µl	1 M, pH 8,1
EDTA	100 µl	0,5 M, pH 8,0
Aqua ad iniectabilia	49,7 ml	

Weitere Reagenzien für die Chromatin-Immunpräzipitation

Name	Hersteller
Formaldehyd 36,5 – 38% in H ₂ O	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Glycin	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Salmon sperm DNA/Protein G agarose beads	Millipore, Schwalbach, Deutschland
Ribonuclease A (RNaseA)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Proteinase K	Qiagen, Hilden, Deutschland
--------------	-----------------------------

Reagenzien für Bakterien

Luria Broth (LB)-Medium

Name	Menge	Hersteller
LB	10 g	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
H ₂ O	Ad 400 ml autoklavieren	Braun, Melsungen AG, Puchheim, Deutschland

Select-Agar (LB-Agar)

Name	Menge	Hersteller
LB	10 g	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Select Agar	6 g	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
H ₂ O	Ad 400 ml autoklavieren	Braun, Melsungen AG, Puchheim, Deutschland

Ampicillin (100 mg/ml)	1 µl/ml Medium oder Agar	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
S.O.C. Medium		Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

Reagenzien für Agarose-Gele

Tris/Borate/EDTA (TBE) (5x)

Name	Menge	Hersteller
Trizma [®] base	54 g	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Borsäure	27,5 g	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
EDTA	3,72 g	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	Ad 2 L	

TBE (1x)

Name	Menge
5x TBE	200 ml
H ₂ O	800 ml

1%-Agarosegel

Name	Menge	Hersteller
Agarose	1 g	peQLab, peqGOLD Universal Agarose, Erlangen, Deutschland
1x TBE	100 ml	
Red Safe	5 µl	iNtRON Biotechnologie, Freiburg, Deutschland

Name	Menge	Hersteller
DNA Molecular Weight Marker V	10 µl	Roche, Mannheim, Deutschland
Gel loading solution 6x	2 µl	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Reagenzien für Reporter-Analysen

Name	Hersteller
5x Passive Lysis Buffer	Promega, Mannheim, Deutschland
ATP (Adenosintriphosphat) Substrat	Biothema, Handen, Schweden
Luziferase Substrat	Biothema, Handen, Schweden
Coelentarazine (1 µg in 1 ml Methanol)	Promega, Mannheim, Deutschland
Glycerol	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Reagenzien für Western-Blot-Analysen**Laufpuffer (1x)**

Name	Menge	Hersteller
20x MES SDS Running Buffer	50 ml	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	950 ml	Braun, Melsungen AG, Puchheim, Deutschland

Transferpuffer (1x)

20x Laufpuffer	200 ml	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Antioxidans	500 µl	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

Blockierlösung (1x)

Phosphat-gepuffertes Salz (PBS)	450 ml	Apotheke Klinikum der Universität München, Deutschland
Blockierlösung	50 ml	Roche, Mannheim, Deutschland
Natriumfluorid (0,5 M)	50 ml	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Waschpuffer (1x)

PBS	500 ml	Apotheke Klinikum der Universität München, Deutschland
Tween 20	500 µl	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Spezielle Reagenzien für den Brn3a-Western-Blot

Name	Hersteller
Guanidinisothiocyanat	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Super Signal® West Femto	Thermo Scientific, Rockford, USA

Sonstige Reagenzien

Name	Menge	Hersteller
dNTPs	Je 10 µM dATP, dCTP dGTP, dTTP in H ₂ O PCR grade	Roche, Mannheim, Deutschland
RNAse freies Wasser	Diethylpyrocarbonat 0,1% (v/v) in Aqua ad iniectabilia, autoklavieren	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	500 µl 1 M + 49,5 ml RNAse freies Wasser	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Protein Assay Dye Reagent Concentrate		Bio-Rad, München, Deutschland

2.1.8 Restriktionsendonukleasen

Alle Reagenzien für den Restriktionsverdau wurden von der Firma New England Biolabs®Inc. (Frankfurt am Main, Deutschland) bezogen.

Enzym	Erkennungssequenzen mit Schnittstellen (^)	Verwendete Puffer
KpnI-HF®	5'GGTAC^C3' 3'C^CATGG5'	Cut Smart® Puffer
EcoRI	5'G^AATTC3' 3'CTTAA^G5'	2.1 Puffer 3.1 Puffer EcoRI Puffer
NdeI	5'CA^TATG3' 3'GTAT^AC5'	3.1 Puffer
NotI	5'GC^GGCCGC3' 3'CGCCGG^CG5'	3.1 Puffer
PstI	5'CTGCA^G3' 3'G^ACGTC5'	3.1 Puffer
XhoI	5'C^TCGAG3' 3'GAGCT^C5'	Cut Smart® Puffer

2.1.9 Transfektionsreagenzien

Transfektionsreagenz	Hersteller
Lipofectamin™ RNAiMAX	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
FuGENE®6	Roche, Mannheim, Deutschland
JetPrime®	Polyplus, Illkirch, Frankreich

2.1.10 Verbrauchsmaterialien

Name	Hersteller
Einmalpipetten 50 ml	Corning Inc. Costar, München, Deutschland
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, München, Deutschland
Einmalküvetten 1 ml	Brand, Wertheim, Deutschland
Einmalreaktionsgefäße 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt, Wedel, Deutschland
Einmalreaktionsgefäße 15 ml	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Einmalreaktionsgefäße 50 ml	Falcon, Heidelberg, Deutschland
Einmalspritzen	Becton Dickinson BD, Heidelberg, Deutschland
Kryoröhrchen, Cryo.S™	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand, Wertheim, Deutschland
Objektträger	Schubert und Weiss, München, Deutschland
Pasteurpipetten	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
PCR Mikroreaktionsgefäße 0,5 ml	Peqlab, Erlangen, Deutschland
Petrischalen	Greiner Bio One, Frickenhausen, Deutschland
Pippettenspitzen	Kisker Biotech, Steinfurt, Deutschland
Sterilfilter 0,22 µm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Weißer Zellkulturlochplatten mit durchsichtigem Boden 96-Loch	Brand plates, Wertheim, Deutschland
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ²	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Zellkulturlochplatten 6-, 96-Loch	Nunc, Wiesbaden, Deutschland

Zellschaber	TPP, Trasadingen, Schweiz
-------------	---------------------------

2.1.11 Zellkulturmedien

MCDB153-Medium

Fertig portioniertes MCDB153-Pulver (Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) in 900 ml Aqua ad iniectabilia (Braun, Melsungen AG, Puchheim, Deutschland) lösen.

Name	Menge	Hersteller
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	7,5% (v/v)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
3 M Natriumhydroxid (NaOH)	auf pH 7,4 einstellen	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	ad 1.000 ml	Braun, Melsungen AG, Puchheim, Deutschland

Tumorzellmedium TU2%

Name	Menge	Konzentration	Hersteller
MCDB153	500 ml	80% (v/v)	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Leibovitz L15	50 ml	20% (v/v)	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
Fötales Kälberserum (FKS)	10 ml	2% (v/v)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Insulin (10 µg/ml)	0,25 ml	5 µg/ml	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
2 M Calciumchlorid (CaCl ₂)	0,42 ml	1,68 mM	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Keratinozyten-Medium

Keratinocyte-SFM Medium (Kit) mit L-Glutamin, EGF (epidermal growth factor) und BPE (bovine pituitary extract) von Thermo Fisher Scientific (Schwerte, Deutschland).

Medium für die Kultur von Hermes-Melanozyten

Name	Menge	Konzentration	Hersteller
RPMI1640 (1x)	450 ml	90%	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland
FKS	50 ml	10%	Biochrom, Berlin, Deutschland
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 2 µg/ml	30,8 µl	200 nM	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Choleratoxin 4 nM	2.500 µl	200 pM	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
human stem cell factor (hSCF) 10 ng/µl	500 µl	10 ng/ml	Peptotech, Hamburg, Deutschland
Endothelin 1 5 µM	1.000 µl	10 nM	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
L-Glutamin (100x)	5 ml	2 mM	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

Derma Life® Melanozyten-Medium

Derma Life® M Medium Complete Kit von CellSystems®, Lifeline, Cell Technologies (Troisdorf, Deutschland).

Name	Menge
Derma Life Basal Medium	485 ml
rh Insulin	0,5 ml
Ascorbic Acid	0,5 ml
L-Glutamin	15 ml
Epinephrine	0,5 ml
Calcium Chloride	0,5 ml
StiMel8™	5 ml
Gesamt	507 ml

Zellkultur-Reagenzien

Name	Hersteller
Hank's balanced salt solution (HBSS)	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland

1x Trypsin-Enzymlösung	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
PBS	Apotheke Klinikum der Universität München, Deutschland
0,2% EDTA in PBS	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Opti-MEM®	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland

Derma Life®-Zellkultur-Lösungen

Für gekaufte Derma Life-Zellen wurde das TrypKit™ CellSystems®, Lifeline, Cell Technologies (Troisdorf, Deutschland) verwendet.

Name	Menge
PBS	500 ml
0.05% Trypsin/0.02% EDTA (phenol red-free)	100 ml
Trypsin- Neutralisierungslösung	100 ml

Einfriermedium

Name	Konzentration	Hersteller
FKS	90%	Biochrom, Berlin, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	10%	Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland

Alle Zellkulturmedien wurden mit Vakuumfilter (Filtropur BT50 0,2) (Sarstedt, Wedel, Deutschland) steril filtriert.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Humane Melanomzellen WM (Wistar Melanoma Zelllinien, erhalten von Prof. Dr. Meenhard Herlyn, The Wistar Institute, Philadelphia, USA) wurden in Tumorzellmedium TU2%, Keratinozyten in Keratinocyte-SFM Medium, Hermes-Melanozyten in Hermes-Medium und humane Melanozyten in Derma-Life-Medium (Medienzusammensetzung siehe 0) kultiviert. Alle Zelllinien wurden bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Inkubator in T75 cm²-Zellkulturflaschen kultiviert. Die adhärennten Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% gesplittet. Hierfür wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen mit 10 ml HBSS gewaschen und dann mit 2 ml Trypsin versetzt mit 0,5% EDTA für 2-5 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 3 ml serumhaltigem Zellkulturmedium abgestoppt und die Zellen in ein 50 ml-Einmalreaktionsgefäß überführt. Die restlichen Zellen wurden mit 5 ml HBSS aus der Flasche gewaschen und ebenfalls in das Einmalreaktionsgefäß gegeben. Die Zellen wurden bei 1.000 rpm für 2 min zentrifugiert, der Mediumüberstand verworfen, das Zellpellet entsprechend der vorherigen Dichte der Zellen in einem definierten Volumen Zellkulturmedium gelöst und die Zellen erneut ausgesetzt. Wurden die Zellen für verschiedene Experimente benötigt, wurden sie mittels der Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop gezählt und je nach benötigter Zellzahl verdünnt und entsprechend ausgesetzt.

2.2.2 Behandlung von Zellen mit Histondeacetylase-Inhibitoren

Die Zellen wurden 24 h vor Behandlung in 6-Loch-Zellkulturplatten zu je 100.000 Zellen pro Well ausgesetzt und bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank kultiviert. Die HDACi wurden in dem jeweiligen Zellkulturmedium verdünnt. Verwendete Endkonzentrationen der HDACi:

Name	Konzentration
CAY	10 µM
Mocetinostat (MGCD0103)	1,66 µM
Natrium Butyrat (NaB)	2 mM
PCI-34051	13 µM
Trichostatin A (TSA)	10 µM

Das Zellkulturmedium auf den adhärenen Zellen wurde komplett abgesaugt, die jeweilige HDACi-Verdünnung für 6 h auf die Zellen gegeben und im Brutschrank inkubiert bis zur Ernte der behandelten Zellen.

2.2.3 Behandlung von Zellen mit einem DNA-Demethylierungsagens

Die Zellen wurden 24 h vor Behandlung in 6-Loch-Zellkulturplatten zu je 100.000 Zellen pro Well ausgesetzt und bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank kultiviert. Das DNA-Demethylierungsagens 5-Aza-2'deoxyctidine (Aza) wurde zu Beginn auf 1 mM in PBS verdünnt und anschließend 1:10 in dem jeweiligen Zellkulturmedium verdünnt, sodass eine Endkonzentration von 10 µM entstand. Das Zellkulturmedium auf den adhärenen Zellen wurde komplett abgesaugt und je 1 ml der 10 µM Aza-Zellkulturmedium-Verdünnung zugegeben. Nach 24 h wurde dieser Schritt wiederholt und nach 48 h wurden die behandelten Zellen geerntet.

2.2.4 Behandlung von Zellen mit zielgerichteten Melanomtherapeutika

Um die Melanomzellen resistent gegenüber Medikamente der Melanomtherapie zu machen, wurden diese über mehrere Wochen mit verschiedenen Therapeutika behandelt.

Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen kultiviert und zweimal pro Woche mit dem jeweiligen Agens behandelt. Parentale Zellen wurden unbehandelt als Kontrolle mitgeführt. Die BRAF- oder MEK-Inhibitoren sind in folgender Tabelle beschrieben:

Name (Beschreibung)	Abkürzung
Vemurafenib (BRAF-Inhibitor)	PLX4032
Selumetinib (MEK1/2-Inihibitor)	AZD6244
Trametinib (MEK1/2-Inhibitor)	Tb

Die Zellen wurden einfach-resistent gegenüber PLX4032 und doppelt-resistent gegenüber PLX4032/AZD6244 sowie PLX4032/Tb gemacht. Die nachfolgenden Verdünnungen wurden jeweils in 10 ml TU2%-Melanomzellmedium erstellt.

Abkürzung	Menge
PLX4032	1 µl von 10 mM PLX-stock
PLX4032/AZD6244	1 µl PLX-stock

	+ 1 µl 100 mM AZD-stock
PLX4032/Tb	1 µl PLX-stock + 1 µl 1 mM Tb-stock

2.2.5 Zellvitalitätsanalyse

Um die Zellvitalität von kultivierten Zellen zu bestimmen, wurde der Cell Titer Blue® (CTB)-Assay verwendet. Dies ist ein fluoreszenzbasierter Test, der das Umsetzen des dunkelblauen Redoxfarbstoff Resazurin in einen pink fluoreszierenden Farbstoff, Resorufin, darstellt. Metabolisch aktive Zellen sind in der Lage, die oxidierte Form des Farbstoffs zu reduzieren und in eine pinke Verbindung umzusetzen, während tote Zellen kein Fluoreszenzsignal erzeugen. Durch diese Redoxreaktion wird das Absorptionsmaximum von 600 nm nach 560 nm verschoben. Dadurch kann der Anteil an lebenden Zellen in der Gesamtpopulation bestimmt werden.

Eine Menge von 100.000 Zellen pro ml wurden in einer 6-Loch-Zellkulturplatte mit 1 ml Zellkulturmedium kultiviert. Es wurden 200 µl des Mediums entnommen und verworfen. Aufgrund von Kondensation wurde davon ausgegangen, dass ca. 50 µl des Zellkulturmediums verdunstet sind. Auf die restlichen 750 µl Zellkulturmedium wurden 150 µl Cell Titer Blue®-Reagenz gegeben, die Platte geschwenkt und bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Eine leere Kontrollprobe wurde genommen, indem 750 µl frisches Zellkulturmedium mit 150 µl Cell Titer Blue®-Reagenz versetzt und ebenfalls inkubiert wurde. Die Inkubationszeit betrug 30-90 min, bis ein eindeutiger Farbumschlag zu bestimmen war. Von den Proben wurden 100 µl in eine 96-Loch-Zellkulturplatte überführt. Die Fluoreszenzmessung wurde mithilfe des CytoFlour™ 2350 Fluorescence Measurement Systems der Firma Millipore (Schwalbach, Deutschland) mit einem Absorptionsmaximum von 560 nm und Emissionsmaximum von 590 nm durchgeführt. Die Messergebnisse wurden durch das Programm CytoFluor 2300 der Firma Millipore dargestellt.

2.2.6 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunpräzipitation ist ein molekularbiologisches Verfahren, um Interaktionen zwischen DNA und Proteinen nachzuweisen. Die Absicht dieser Methode ist es, die Bindung von Proteinen oder Histonmodifikationen an definierten Abschnitten im Chromatin zu bestimmen. Zum Fixieren dieses Zustands muss ein Crosslinking der Interaktionen an noch lebenden Zellen durchgeführt werden.

2.2.6.1 Crosslinking

Die zu untersuchenden Zellen wurden in T75 cm² Zellkulturflaschen kultiviert und geerntet. Es wurden $7,5 \times 10^6$ Zellen benötigt. Die Fixierung der Zellen erfolgte durch 1% Formaldehyd gelöst in Zellkulturmedium für 10 min bei Raumtemperatur (Rt) und Zugabe von 27 µl 37% Formaldehyd pro ml Medium. Um die Crosslinking-Reaktion zu stoppen, wurden 125 mM Glycin für 5 min bei Rt hinzugegeben, also 100 µl 1,25 M Glycin pro ml Medium.

2.2.6.2 Immunpräzipitation

Die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend bei 4°C 1.000 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Es folgte die Lyse der Zellpellets mit 1 ml Zelllyse-Puffer für 10 min auf Eis. Im Anschluss wurden die Zellen bei 4°C 5.000 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 250 µl Kernlyse Puffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurde das Chromatin durch Sonifikation in einzelne Fragmente zerlegt. Die Sonifikation erfolgte auf Eis mit den Einstellungen 2x 30 sek ON und 30 sek OFF für 5 min bei einer Amplitude von 25%. Anschließend wurden die Proben 1:10 in IP-Verdünnungs-Puffer verdünnt und eine Vorreinigung durchgeführt. Für diese sogenannte Vorreinigung werden die Proben für 30 min mit 30 µl Lachssperma DNA/Protein G Agarose-Beads bei 4°C inkubiert. Die Vorreinigung dient der Entfernung von unspezifisch an Beads bindende DNA- oder Proteinfragmenten, diese gebundenen Beads der Vorreinigung wurden im Anschluss wieder mithilfe der Zentrifugation und Sedimentation (4°C, 1.000 rpm, 2 min) entfernt. Im Anschluss wurden 2,4 µg zu jeder Probe hinzugegeben und die Proben halbiert. Ein Teil wurde für einen spezifischen Antikörper, hier Anti-acetyl-H3, und einer für Kontroll-Antikörper IgG verwendet. Die Inkubation der Proben erfolgte bei 4°C über Nacht auf einem Probenrad. Am Folgetag wurden 30 µl Lachssperma DNA/Protein G Agarosebeads zugegeben und für 2 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben in mehreren Waschschritten auf Eis mit je 600 µl Puffer gewaschen und bei 4°C 1.000 rpm für 1 min zentrifugiert. Zu Beginn wurde der IP-Verdünnungs-Puffer verwendet, die Proben wurden kurz geschwenkt und die Zentrifugation eingeleitet. Dasselbe wurde mit dem Niedrigsalz-Puffer wiederholt. Danach wurde Hochsalz-Waschpuffer und LiCl-Waschpuffer für jeweils 5 min auf die Proben gegeben und auf Eis geschüttelt. Als letzten Waschschriff wurde TE-Puffer verwendet. Die Proben wurden kurz geschwenkt und der Puffer durch das Zentrifugieren entfernt. Die Proben wurden von den Beads eluiert durch Inkubation mit 120 µl Elutions-Puffer und 6 µl 5 M NaCl über Nacht bei 65°C auf einem Heizblock.

2.2.6.3 Aufreinigung der Proben und Echtzeit-PCR

Zu den Proben wurden je 3 µl RNaseA (10 mg/ml) gegeben und bei 37°C für 1-2 h auf einem Heizblock inkubiert. Im Anschluss wurde Proteinase K zu einer Endkonzentration von

0,4 mg/ml hinzu pipettiert und für 1-2 h bei 56°C inkubiert. Die genomische DNA wurden mithilfe des Nucleospin PCR clean-up Kits isoliert. Es wurden 600 µl des NTB-Puffers zu 120 µl Probe (5:1) gegeben und weiter nach Herstellerprotokoll verfahren. Eluiert wurde mit 50 µl NE-Puffer. Die CHIP-Proben wurden mittels qRT-PCR analysiert, indem 3 µl Probe für Light-Cycler-Analysen verwendet wurden.

2.2.7 Messung der relativen Enzymaktivität

Der HDAC-Glo™ 2 Assay der Firma Promega ist ein Lumineszenz-Assay, der die relative Enzym-Aktivität der Histondeacetylase 2 (HDAC2) in Zellen misst. Der Assay verwendet ein Isoenzym-selektives, acetyliertes, luminogenes Peptidsubstrat aus Lebend-Zellen, welches durch HDAC2 deacetyliert werden kann. Die Deacetylierung des Peptidsubstrats wird durch ein gekoppeltes, enzymatisches System gemessen. Eine Protease im Entwickler-Reagenz spaltet das Peptid vom Aminoluziferin ab. Die Reaktion wird dann mittels einer Luziferase (Ultra-Glo Recombinant Luciferase) quantifiziert (schematische Darstellung der Reaktion siehe Abbildung 11).

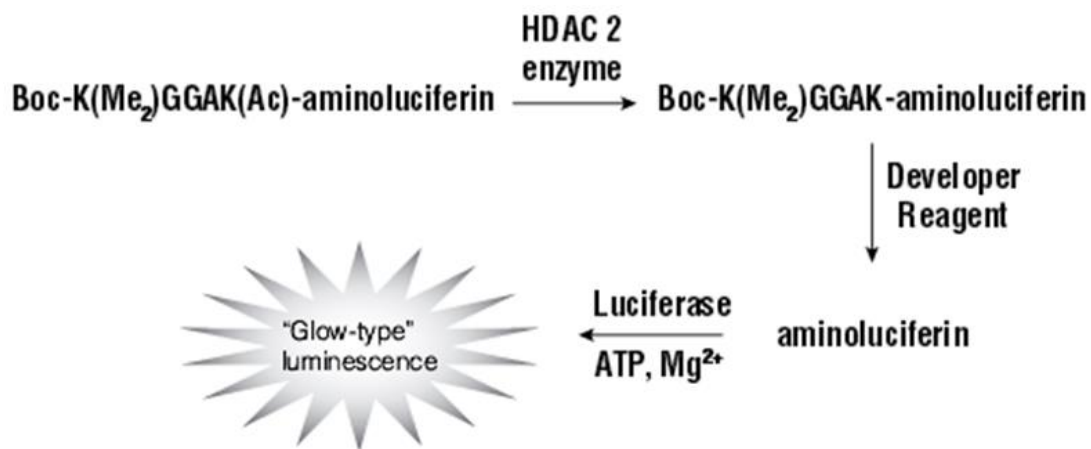


Abbildung 11: HDAC-Glo™ 2 Assay Reaktionsschema. Das HDAC2-Enzym ist in der Lage, das luminogene Substrat (Boc-K(Me₂) GGAK (Ac)-Aminoluziferin zu deacetylieren, daraufhin kann das entstandene Peptid (Boc-K(Me₂)GGAK-Aminoluziferin durch eine spezifische proteolytische Spaltung des Entwickler-Reagenzes Aminoluziferin freigesetzt werden. Mithilfe der Glühwürmchen-Luziferase-Reaktion unter Verwendung von ATP und Mg²⁺ kann freies Aminoluziferin gemessen werden, indem eine stabile, anhaltende Emission von Licht erzeugt wird. (Technical Manual, HDAC-Glo™ 2 Assay, G9590, Promega)

Die Zellen wurden für die Messung in weißen 96-Loch-Zellkulturplatten mit durchsichtigem Boden kultiviert. Für die Bestimmung der HDAC2-Enzymaktivität wurde das komplette Zellkulturmedium der Zellen abgesaugt und je 100 µl frisches serumfreies Medium Opti-MEM

zugegeben. Serum im Medium könnte eine höhere Hintergrundlumineszenz verursachen, was die Messergebnisse nachteilig beeinflussen könnte. Anschließend wurden 100 µl Final Detection Reagent aus dem Kit auf jedes Well gegeben und bei Rt für 20 min inkubiert. Danach wurde die Lumineszenz mithilfe des Luminometer GloMAX® 96 Microplate gemessen. Die drei enzymatischen Reaktionen des Assays laufen in nahezu simultanen Reaktionen ab, welche proportional zur Deacetylase-Aktivität sind. Die gemessene Intensität des emittierten Lichts wurde durch die Luminometer-Computer-Software dargestellt.

2.2.8 DNA-Klonierung

Die Klonierung von Plasmid-DNA mithilfe kompetenter Bakterien dient unter anderem der Vervielfältigung eines zu untersuchenden Gens. Man spricht von kompetenten Bakterienzellen, wenn diese in der Lage sind, DNA aus dem Medium aufzunehmen, durch Rekombination diese in ihr Genom zu integrieren und zu vervielfältigen. Mittels Restriktionsenzymen und DNA-Ligasen werden DNA-Fragmente eines bestimmten Gens in Klonierungsvektoren eingebracht (Ligation). Der entstandene Plasmidvektor mit integriertem Zielgen wird dann in die kompetenten Bakterienzellen integriert (Transformation). Der Plasmidvektor enthält ein Antibiotikaresistenzgen, welches es ermöglicht, Bakterien, die ein Plasmid erfolgreich aufgenommen und in ihr Genom integriert haben, auf Antibiotika-behandelten Platten zu selektionieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der offene Leserahmen (open-reading-frame, ORF) des HDAC2-Gens in den Vektor pCMV6 kloniert. Der Vektor pDNR-Dual mit einem HDAC2-Insert wurde von der Harvard Medical School Plasmid Database (Boston, USA) bezogen. Mithilfe des Restriktionsenzym NotI wurde das HDAC2-Insert aus dem Vektor herausgeschnitten und in einem 1%-igem Agarosegel aufgetrennt. Das HDAC2-Insert wurde aus dem Gel herausgeschnitten und mithilfe des NucleoSpin® Gel and PCR clean-up. Mit dem Rapid DNA Ligation Kit wurde das HDAC2-Insert mit dem ebenfalls mit NotI geschnittenen pCMV6-Vektor ligiert. Die Ligation benötigt ein molares Verhältnis von 1:3 von Plasmidvektor zu Insert.

Reaktionsansätze für den Endonukleaseverdau:

Name	Menge
pDNR-Dual-HDAC2 (5 µg)	9,47 µl
Cut Smart 10x	7 µl
BSA	7 µl

Notl	6 µl
H ₂ O	20,53 µl
Gesamt	50 µl

Name	Menge
pCMV6-SOX10 (5 µg)	3,76 µl
Cut Smart 10x	7 µl
BSA	7 µl
Notl	6 µl
H ₂ O	26,24 µl
Gesamt	50 µl

Transformation von Bakterien

Für die Transformation wurden DH5 α -kompetente Bakterienzellen, die bei -80°C in Glycerolstocks gelagert wurden, verwendet. Das Auftauen der Bakterien geschah schonend auf Eis für 10-15 min. Die 14 ml-Rundbodenröhrchen wurden ebenfalls auf Eis gekühlt. Es wurden je 100 µl der aufgetauten Bakterien in ein Rundbodenröhrchen gegeben und 2,5 µl von 10 ng/µl DNA-Plasmid hinzugefügt. Der Reaktionsansatz wurde für 40 min auf Eis inkubiert. S.O.C.-Medium wurde auf Rt vorgewärmt und das Wasserbad auf 42°C vorgeheizt. Es folgte ein Hitzeschock der Bakterien für 90 sek bei 42°C. Im Anschluss wurden 400 µl S.O.C.-Medium hinzugegeben und für 1 h bei 37°C 250 rpm auf einem Bakterien-schüttler inkubiert. Je 100 µl der Suspension wurden auf Petrischalen mit LB-Agar, der mit dem Antibiotikum Ampicillin (100 µg/ml) versetzt wurde, ausgestrichen. Die Platten wurden 1 h zum Trocknen bei Rt stehen gelassen und anschließend über Nacht bei 37°C im Bakterien-Brutschrank inkubiert.

Von den Platten mit angewachsenen Klonen wurden Einzelklone gepickt und eine Übernachtskultur angesetzt. Für jeden Ansatz wurden 5 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin in 50 ml Einmalreaktionsgefäßen vorbereitet. Einzelne Klone wurden mit Pippettenspitzen aufgenommen und in das Medium gegeben. Die Ansätze wurden über Nacht bei 37°C 250 rpm im Bakterien-schüttler inkubiert.

Glycerolstocks

Für die Konservierung der Proben wurden für jeden Ansatz Glycerolstocks angelegt. Hierfür wurde 200 µl Glycerol in 1,5 ml Schraub-Einmalreaktionsgefäßen vorgelegt und 800 µl der Bakterien-suspension hinzugegeben. Der Ansatz wurde vermischt und anschließend bei -80°C gelagert.

Plasmid-DNA Minipräparation

Für die Präparation der vervielfältigten Plasmid-DNA aus den Bakterienzellen wurde das Kit NucleoSpin® Plasmid NoLid verwendet. Es wurden die kultivierten Bakterienzellen geerntet, die Zellen lysiert, das Lysat gewaschen und die Plasmid-DNA durch Bindung an eine Säulenmembran isoliert, welche anschließend eluiert werden kann.

Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA erfolgte über die Firma MWG Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland).

2.2.9 Mutagenese-PCR

Um eine mutierte Base in einem Plasmidinsert auszutauschen, wurde der Kit QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis der Firma Agilent Technologies, Oberhaching verwendet. In diesem Kit werden Enzyme mit hohen Genauigkeiten verwendet, um zielgenaue Mutagenesen durchzuführen. Im Rahmen dieser Arbeit musste die Base ‚C‘ an Position 943 aus dem ORF des HDAC2-Inserts gegen die Base ‚T‘ ausgetauscht werden.

2.2.9.1 Mutagenese

Der Reaktionsansatz wurde in ein 0,5 ml PCR Einmalreaktionsgefäß pipettiert. Die Mutagenese Primer wurden auf der Homepage von Agilent Technologies entworfen und über die Firma MWG Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bezogen.

Primer für Mutagenese-PCR

Name	Sequenz (5' nach 3') vorwärts	Sequenz (3' nach 5') rückwärts
HDAC2Mutc943t	TTGCTCGATGTTGGACATATGAGACTGC AGTTGCC	AACGAGCTACAACCTGTATACTCTGACGTC AACGG

Name	Menge
10x Reaction Buffer	5 µl
pCMV6-HDAC2	10-20 ng
10 µM MutHDAC2fc943t (vorwärts)	1,25 µl
10 µM MutHDAC2rc943t (rückwärts)	1,25 µl
dNTP Mix	1 µl
QuikSolution Reagent	1,5 µl
ddH ₂ O	Ad 50 µl

QuikChange Lightning Enzyme	1 µl

PCR-Programm

Fenster 1	95°C	2 min	1x
Fenster 2	95°C	20 sek	18x
	60°C	10 sek	
	68°C	30 sek/kb Plasmidlänge	
Fenster 3	68°C	5 min	1x

DpnI-Restriktionsverdau

Nachdem die Ansätze auf einem Agarosegel kontrolliert wurden, wurden 2 µl DpnI auf die Amplifikationsreaktion gegeben, auf- und abpipettiert, abzentrifugiert und für 5 min bei 37°C inkubiert.

Transformation der XL10-Gold-ultrakompetenten Zellen

Die XL10-Gold-ultrakompetenten Zellen wurden für 10-15 min auf Eis aufgetaut und 45 µl der Zellen in ein vorgekühltes Rundbodenröhrchen überführt. Im Anschluss wurden 2 µl β-Mercaptoethanol zugegeben und schonend gemischt. 2 µl der DpnI verdauten DNA wurden zu dem Ansatz hinzu pipettiert, 1 µl des Kontrollplasmids pUC18 (0,01 ng/µl) und 2 µl der zweiten Kontrolle pWhitescript wurden in separate Ansätze gegeben. Alle Ansätze wurden anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Danach wurde ein Hitzeschock der Zellen bei 42°C für 30 sek im Wasserbad durchgeführt. Die Zellen wurden für 2 min auf Eis abgekühlt und 500 µl S.O.C. Medium hinzugeben. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 250 rpm und 37°C im Bakterieneschüttler inkubiert.

Blau-Weiß-Selektion

Die Blau-Weiß-Selektion dient der Selektion der Bakterien, die das gewünschte Plasmid aufgenommen haben. Für die folgende Blau-Weiß-Selektion wurden auf die Agarplatten mit Ampicillin 20 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) und 80 µg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal) gegeben und 1 h bei 37°C im Brutschrank getrocknet. Von der Transformations-Reaktion wurden 100 µl auf die Agarplatten gegeben und mit gebogenen Glaskapillaren ausgestrichen. Von der pUC18-Transformationskontrolle wurden 5 µl auf der Platte ausgestrichen und von der pWhitescript-Mutagenese-Kontrolle 20 µl. Die Ansätze wurden bei 37°C mehr als 16 h im Brutschrank inkubiert. Das verwendete Plasmid trägt eine Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin, welches die ultrakompetenten Bakterien nicht

haben. Somit überleben nur jene Bakterien auf dem Agar, die das Plasmid mit der Resistenz aufgenommen haben. Des Weiteren wird durch die Blau-Weiß-Selektion angezeigt, ob die Bakterien das aufgenommene Plasmid modifizieren konnten. Das Plasmid hat an der Multiple Cloning Site (MCS) ein Gen für β -Galactosidase, welches als Reporter gen dient. Wird ein neues Gen in die MCS eingefügt, wird die β -Galactosidase inaktiviert und die Bakterien können den Farbstoff X-Gal nicht mehr in Galaktose und einen blauen Farbstoff spalten. Folglich haben weiße Klone in der Kolonie das Plasmid aufgenommen und modifiziert, blaue Klone nicht.

2.2.10 Plasmidtransfektion

Die Plasmidtransfektion mittels FuGENE[®]6 der Firma Roche wurde durchgeführt, um Plasmid-DNA transient in Zellen einzubringen, mit dem Ziel, Gene zu überexprimieren.

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion zu je 100.000 Zellen/Well in 6-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Zur Transfektion hatten die Zellen eine Konfluenz von 60-70% erreicht. In 2 ml-Einmalreaktionsgefäßen wurden 47 μ l serumfreies Medium, Opti-MEM, vorgelegt. Es wurden 3 μ l Fugene Reagenz direkt in das Medium gegeben, vermischt und 5 min bei Rt inkubiert. Eine Menge von 1 μ g DNA wurde zu dem Ansatz gegeben und für 30 min bei Rt inkubiert. Es wurde ein Mediumwechsel mit je 1 ml des benötigten Mediums durchgeführt. Ein Volumen von 50 μ l des Transfektionsansatzes wurde auf die Zellen gegeben und für 24 h bei 37°C 5% CO₂ im Zellkulturschrank inkubiert. Die Effizienz der Überexpression wurde im Anschluss auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR und auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analysen durchgeführt. Für die Analyse der mRNA musste die RNA zusätzlich mit einem DNase-I-Verdau prozessiert werden. Dieser zusätzliche Verdau wurde von dem RNeasy Mini Kit, Qiagen (Hilden, Deutschland) angeboten.

2.2.11 Luziferase-Reporter gen-Assay

Der Luziferase-Reporter gen-Assay beruht auf einer Biolumineszenzreaktion, wobei das Enzym Luziferase des Glühwürmchens ‚Firefly‘ Luziferin unter Verbrauch von zweiwertigen Magnesiumkationen in Oxyluziferin umwandelt. Diese Reaktion ist ATP-abhängig und es entsteht Licht einer Wellenlänge von 562 nm. Das Luziferase-Gen dient in diesem Versuchsaufbau als Reporter gen, um auf die Aktivität des zu untersuchenden Gens zu schließen. Das Luziferase-Gen wird nach dem Promotor des zu untersuchenden Gens kloniert, ist somit mit diesem gekoppelt und dessen Aktivität kann durch die Substratumsetzung des Luziferase-Enzyms quantifiziert werden. Die Renilla-Luziferase ist

ein Enzym, das unabhängig von Oxyluziferin arbeitet. Es setzt Coelenterazine zu Coelenteramid um und dient als Kontrollreportergen zur Normalisierung der Proben.

2.2.11.1 Transfektion der Reporterkonstrukte

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion zu je 100.000 Zellen/Well ausgesät. Zur Transfektion hatten die Zellen eine Konfluenz von 60-70% erreicht. Vor Beginn wurde bei den Zellen ein Mediumwechsel mit 950 µl Zellkulturmedium durchgeführt.

Reaktionsansatz

DNA-Plasmid mit Luziferase Gen	800 ng
Renillaplasmid	200 ng
Fugene	3 µl
Opti-MEM	Ad 50 µl

Opti-MEM wurde in 2 ml-Einmalreaktionsgefäßen vorgelegt, das Transfektionsreagenz Fugene hinzugegeben und für 5 min bei Rt inkubiert. Im Anschluss wurden die beiden Plasmide, Luziferaseplasmid und Renillaplasmid, zugegeben. Der Ansatz wurde für 30 min bei Rt inkubiert und 50 µl tropfenweise für 24 h bis zu 48 h zu den Zellen gegeben.

2.2.11.2 Ernte und Messung

Die Zellen wurden zweimal mit 500 µl PBS und 500 µl 1x Passive Lysis Buffer (5x Puffer verdünnt mit H₂O) gewaschen. Die 6-Loch-Zellkulturplatten wurden für 10 min bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst, in 1,5 ml Einmalreaktionsgefäße überführt und für 2 min bei 1.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Einmalreaktionsgefäß gegeben, welches bis zur Messung auf Eis gestellt wurde. Das Firefly-Substrat ATP wurde 1:1 mit Luziferin gemischt, 1 µl des Renillasubstrats Coelenterazine wurden in 800 µl H₂O verdünnt und auf Eis gegeben. Die Proben wurden in weißen 96-Loch-Platten in Triplikaten gemessen. Es wurden je 20 µl Substrat mit 20 µl Zelllysate in ein Well der 96-Loch-Platten gegeben. Die Messung der Lumineszenz erfolgte mit dem Luminometer GloMAX® 96 Microplate.

2.2.12 Untersuchung der transkriptionellen Regulation von Brn3a

Um mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren im Bereich des Brn3a-Promotors zu identifizieren, wurde der proximale Promotor von Brn3a in dem Vektorkonstrukt pGL4.10_luc2 verwendet. Es wurden Vektorkonstrukte erstellt, die trunkierte Bereiche des

Brn3a-Promotors von 50 bis zu 1.200 Basenpaaren (Bp) stromaufwärts des Startcodons von Brn3a enthielten (schematische Darstellung des proximalen Promotorbereichs von Brn3a, Abbildung 12).

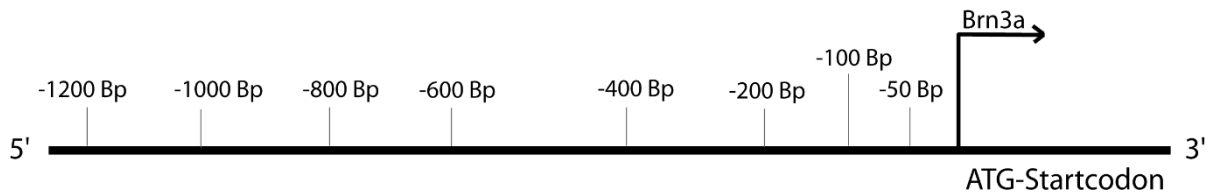


Abbildung 12: Schematische Darstellung des proximalen Bereichs des Brn3a-Promotors. Dargestellt ist der Bereich des Brn3a-Gens stromaufwärts des ATG-Startcodons von Brn3a. Die markierten Abschnitte zeigen die verschiedenen Längen der trunkierten Konstrukte von 50 Bp bis zu 1.200 Bp.

Die unterschiedlich langen Vektorkonstrukte wurden im Anschluss auf die Zu- oder Abnahme ihrer Promotoraktivität mithilfe von Luziferase-Reporter-Gen-Analysen untersucht (siehe 2.2.11).

2.2.13 Mykoplasmen-Test

Mykoplasmen sind einzellige, auto-replikative Bakterien, welche einen Einfluss auf den Metabolismus von Zellen in Kultur haben. Als Folge einer Mykoplasmen-Infektion können eingeschränktes Zellwachstum, Zelltod und chromosomale Veränderungen wie Mutationen auftreten. Mykoplasmen sind die häufigsten Kontaminationen in der Zellkultur und werden häufig nicht erkannt, da sie allein mithilfe mikroskopischer Untersuchungen unentdeckt bleiben. Jedoch können sie durch spezielle Testverfahren, wie zum Beispiel mit dem Venor GeM Mykoplasma Detection Kit von der Firma Minvera Biolabs festgestellt werden.

Von den kultivierten Zellen wurden 100 µl Zellkulturüberstand in ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, 5 min bei 95°C auf einem Heizblock inkubiert und anschließend 5 sek bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Alle Reagenzien des PCR-Kits müssen vor Gebrauch mit H₂O rehydratisiert werden. Nach der Zugabe des H₂O wurden die verdünnten Reagenzien 5 min bei Rt inkubiert, im Anschluss gemischt und abzentrifugiert.

Name	Menge
Primer/Nucleotide Mix	+ 65 µl H ₂ O
Internal control	+ 300 µl H ₂ O
Positive control	+ 300 µl H ₂ O

PCR-Ansatz (x1) Mastermix

Name	Menge
H ₂ O	15,3 µl
10x Reaction Buffer	2,5 µl
Primer/Nucleotide Mix	2,5 µl
Internal control	2,5 µl
Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
Zellkulturüberstand, Negativkontrolle oder Positivkontrolle	+ 2 µl
Gesamt	25 µl

PCR-Programm

Fenster 1	94°C	5 min	1x
Fenster 2	94°C	1 min	39x
	55°C	1 min	
	72°C	1 min	
Fenster 3	72°C	5 min	1x

Die Darstellung der Testergebnisse erfolgte in einem 1%-Agarosegel.

2.2.14 Gesamtzellprotein-Isolation

Um Gesamtzellproteine aus Zellen zu isolieren, wurden diese zweimal in 6-Loch-Zellkulturplatten mit je 1 ml PBS gewaschen. Zum Ablösen der adhären Zellen wurden 600 µl PBS mit 0,2% EDTA in die Wells pipettiert und für 5 min bei 37°C, 5% CO₂ im Zellkulturschrank inkubiert. Um die Reaktion abzustoppen, wurden 600 µl serumhaltiges Zellkulturmedium hinzugegeben. Die abgelösten Zellen wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 2 min bei 2.000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt

wurde, wurde das Pellet zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Hier konnten die Zellpellets bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren oder mit der Isolation weiter verfahren werden.

Es wurden 60 µl 1x CSH Zellyse-Puffer zu den Zellen gegeben und diese 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Zellen für 20 min bei 4°C 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand, in dem sich die Proteine befinden, in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Bis zur weiteren Behandlung wurden die isolierten Proteine bei -80°C eingefroren.

2.2.15 RNA-Isolation

Zur Isolation von RNA aus Zellen wurden diese in 6-Loch-Zellkulturplatten kultiviert. Vor der Ernte der adhären Zellen wurden sie zweimal mit je 1 ml PBS gewaschen. Im Anschluss wurden 400 µl RLT Puffer (RNeasy Mini Kit) auf die Zellen gegeben und für 5 min bei Rt inkubiert. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen aus den Wells gelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. An dieser Stelle wurden die Zellen entweder eingefroren oder nach Herstellerangaben mit der säulenbasierten Aufreinigung der RNA nach Protokoll weiter verfahren. Bis zur weiteren Bearbeitung wurde die isolierte RNA bei -80°C eingefroren.

2.2.16 Zytoplasma- und Nuklearextrakt-Isolation

Die Isolierung von Zytoplasma- sowie Nuklearextrakten dient der Gewinnung von nicht-denaturierten, aktiven Proteinen, welche sich in zytoplasmatischen und nuklearen Kompartimenten der Zellen befinden. Hierfür wurde das Nuclear Extract Kit der Firma Active Motif (La Hulpe, Belgien) verwendet. Die verwendeten Puffer wurden nach Herstellerangaben vor Beginn der Durchführung der Isolation vorbereitet.

Zellernte

Die Zellen wurden in T75-Zellkulturflaschen kultiviert und bei einer Konfluenz von ca. 100% wurde das komplette Medium abgesaugt. Die Zellen wurden mit 5 ml eiskaltem PBS/Phosphatase-Inhibitor gewaschen und abgesaugt. Anschließend wurde erneut 3 ml von eiskaltem PBS/Phosphatase-Inhibitor zugesetzt. Die adhären Zellen wurden mithilfe eines Zellschabers von den Zellkulturflaschen gelöst und in ein vorgekühltes 15 ml Einmalröhrchen überführt. Im Anschluss wurden die Zellen bei 4°C für 5 min 500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets auf Eis inkubiert.

Zytoplasmaextrakt-Isolation

Die Zellen wurden in 500 µl 1x hypotonem Puffer vorsichtig resuspendiert, in ein vorgekühltes 1,5 ml Einmalreaktionsgefäß überführt und für 15 min auf Eis inkubiert. Es wurden 25 µl Detergenz hinzugegeben und für 10 sek auf dem Vortexer geschüttelt. Die Proben wurden im Anschluss für 30 sek bei 4°C, 14.000 g zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich der Zytoplasmaextrakt befindet, wurde in ein vorgekühltes 1,5 ml Einmalreaktionsgefäß überführt und bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert. Das Pellet wurde für die Nuklearextrakt-Isolation weiterverwendet.

Nuklearextrakt-Isolation

Die Nuklear-Pellets wurden in 50 µl Complete Lysis Puffer vorsichtig resuspendiert und für 30 min auf Eis bei 150 rpm geschüttelt. Die Suspension wurde daraufhin für 30 sek auf dem Vortexer gemischt und bei 4°C für 10 min, 14.000 g zentrifugiert. Der Überstand, in dem sich der Nuklearextrakt befindet, wurde in ein vorgekühltes 1,5 ml Einmalreaktionsgefäß überführt und bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

2.2.17 Photometrische Konzentrationsbestimmungen

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäure- oder Proteinlösungen wurde das Photometer Smart Spec™ verwendet.

2.2.17.1 Proteinbestimmung nach Pierce

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinproben wurde der kolorimetrische Pierce-BCA-Proteinassay verwendet. Durch das Protein werden in dem Assay zweiwertige Kupfer-Ionen (Cu^{2+}) zu einwertigen Kupfer-Ionen (Cu^{1+}) reduziert. Die so entstandenen Kupferkationen werden mittels Bicinchoninsäure (BCA) nachgewiesen. Es entsteht ein violetter Farbstoff, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt werden kann.

Die Reagenzien des Kits A und B wurden im Verhältnis 1:50 vermischt und je 1 ml in Einmalküvetten überführt. Es wurden 10 µl der Probe in die Küvetten gegeben und gemischt. Um eine Standardkurve zu generieren, wurde eine BSA-Standardverdünnung mit je 8, 4, 2, 1, 0,5 µg/µl in 1x CSH Puffer hergestellt. Es wurden ebenfalls je 10 µl in die vorbereiteten Einmalküvetten gegeben und gemischt. Die Proben wurden 10-20 min bei Rt inkubiert, bis ein deutlicher Farbumschlag zu erkennen war. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Die Berechnung der Konzentration erfolgte über die BSA-Standardkurve.

2.2.17.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Um die Konzentration isolierter DNA oder RNA zu bestimmen, wurden diese 1:20 oder 1:40 in 10 mM Tris verdünnt. Die Messung im Photometer erfolgte bei einer Wellenlänge von 260/280 nm. Mithilfe der Wellenlänge 280 nm wird die Reinheit der Probe ermittelt. Es werden in der Probe enthaltene Proteine oder Lösungsmittelreste detektiert. Ist das Verhältnis von A_{260} zu A_{280} bei 1,8, so handelt es sich um eine reine DNA-Probe, bei 2,0 um eine reine RNA-Probe. Bei einer Kontamination der Proben ist der Wert entsprechend geringer. Liegt die Extinktion oder Optische Dichte (OD) bei 1,0 A_{260} entspricht dies einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ (=ng/ μl) doppelsträngiger DNA oder 40 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger RNA. Hieraus kann nun die Konzentration der gemessenen Proben berechnet werden:

Konzentration DNA = OD bei 260 nm * Verdünnungsfaktor (20 oder 40) * 50 ng/ μl

Konzentration RNA = OD bei 260 nm * Verdünnungsfaktor (20 oder 40) * 40 ng/ μl

2.2.17.3 Konzentrationsbestimmung von Zytoplasma- und Nuklearextrakten

Zur Bestimmung der Konzentration von Zytoplasma- und Nuklearextrakten wurde nach der Methode von Bradford eine photometrische Konzentrationsbestimmung durchgeführt. Dieser Assay basiert auf einer kolorimetrischen Methode, mit welcher die Konzentration der Proben quantifiziert werden kann. Hierzu wurde das Protein-Assay-Reagenz der Firma Bio-Rad (München, Deutschland) verwendet. Der Coomassie® Brilliant Blue G-250-Farbstoff aus dem Protein-Assay-Reagenz bindet an Aminosäurereste und ist somit in der Lage, je nach Konzentration der Proteine einen unterschiedlichen Farbumschlag zu generieren. Es wurden 795 μl H₂O in Einmalküvetten vorgelegt. Hierzu wurden jeweils 5 μl der zu untersuchenden Probe sowie 200 μl Protein-Assay-Reagenz hinzugegeben und mittels Vortexer gemischt. Die Proben wurden für ca. 5 min bei Rt inkubiert, bis ein deutlicher Farbumschlag zu erkennen war. Die Absorption wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Zur Quantifizierung der Konzentration diente eine BSA-Standardreihe mit je 8, 4, 2, 1, 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in 1x CSH-Puffer.

2.2.18 Quantitative Echtzeit-PCR

Bei einer Standard-PCR werden zuerst die beiden Stränge der DNA durch Denaturierung bei 94°C getrennt. Anschließend erfolgt die Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige DNA bei 55°C (Annealing). Durch Erhöhen der Temperatur auf 72°C, das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, werden die hybridisierten Primer verlängert und es entsteht wieder doppelsträngige DNA (Elongation). In jedem Zyklus verdoppelt sich die Zahl der Template-DNA.

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion hingegen dient der Quantifizierung der mRNA-Expression. Die Menge des PCR-Produkts kann direkt und in Echtzeit gemessen und quantifiziert werden.

2.2.18.1 Reverse Transkription (RT) von RNA zu cDNA

Um mRNA in der qRT-PCR detektieren zu können, muss eine cDNA (complementary DNA) -Bank erstellt werden. Dies erfolgt mithilfe der reversen Transkription. Das Enzym reverse Transkriptase kann RNA in die komplementäre einzelsträngige cDNA umschreiben, zu welchem dann durch eine DNA-Polymerase der komplementäre Doppelstrang synthetisiert wird.

Der Reaktionsansatz wurde in 0,5 ml-PCR-Einmalreaktionsgefäßen pipettiert. Die isolierte RNA (siehe 2.2.15) wurde auf 500 ng in 8,5 µl DEPC H₂O verdünnt und 2 µl Oligo dT (250 ng/µl) zugegeben. Der Ansatz wurde zur Anlagerung der Oligo-dTs für 10 min bei 65°C im RoboCycler prozessiert. Im Anschluss wurden die Proben auf Eis gegeben.

Reaktionsansatz der reversen Transkription

First Strand Puffer 5x	4,0 µl
DTT 0,1 M	2,0 µl
Na-dNTPs 10 mM	2,0 µl
RNasin	0,5 µl
Expand Reverse Transkriptase	1,0 µl

Ein Volumen von 9,5 µl des RT-Ansatzes wurde zur RNA mit angelagertem Oligo-dT gegeben und bei 42°C für 1 h im Wasserbad inkubiert. Die Template-cDNA-Proben wurden anschließend auf Eis gegeben, mit 40 µl DEPC H₂O verdünnt und bei -80°C gelagert oder direkt im Anschluss analysiert.

2.2.18.2 qRT-PCR mit spezifischen Hybridisierungssonden

Zur qRT-PCR wurde das LightCycler®TaqMan®Master Kit für das Karussell-basierte System mit Sonden der humanen Universal Probe Library verwendet. Die Primer wurden mithilfe des Assay Design Centers auf www.universalprobelibrary.com erstellt. Um Verunreinigungen genomischer DNA zu vermeiden, wurden nur Intron-umfassende Primer verwendet. Allerdings muss dafür das Intron größer als 200 Bp sein. Die 100 verschiedenen, spezifischen Hybridisierungssonden der humanen Universal Probe Library kombiniert mit den spezifischen Primern können in der qRT-PCRs beinahe für jedes Zielgen verwendet werden.

Die qRT-PCR mit LightCycler Sonden nutzt den Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) aus. Ein Fluorochrom 1 (Reporter) lässt sich durch eine bestimmte Wellenlänge anregen und strahlt diese in Form einer anderen Wellenlänge E1 wieder ab, welche gemessen wird. Ein weiteres Fluorochrom 2 (Quencher) befindet sich jedoch in räumlicher Nähe zu dem Reporter, nimmt die Energie der abgegebenen Wellenlänge (E1) auf und gibt diese als Wellenlänge E2 ab. Reporter und Quencher befinden sich auf derselben Hybridisierungssonde, die an die cDNA bindet. Vorwärts- und Rückwärtsprimer binden 5' und 3' der Hybridisierungssonde. Im Zuge der qRT-PCR setzt die Taq-Polymerase durch ihre 5'-3'-Exonukleaseaktivität den Reporter frei. Durch diese Trennung von Reporter und Quencher kommt es zu einem Fluoreszenzsignal, welches in Echtzeit während der PCR gemessen wird und zur Quantifizierung dient.

Reaktionsansatz

H ₂ O	4,5 µl
Spezifische Sonde 10 µM	0.1 µl
Primer vorwärts 10 µM	0,2 µl
Primer rückwärts 10 µM	0,2 µl
Mastermix 5x (Puffer, dNTPs, Referenzfarbstoff, thermostabile DNA-Polymerase und weitere)	2,0 µl

Es wurden 7 µl des Reaktionsansatzes in vorgekühlte Glaskapillaren vorgelegt, 3 µl der 500 ng Template-cDNA zugegeben und mit einem Plastikdeckel verschlossen. Die Proben wurden für 30 sek bei 800 rpm zentrifugiert.

Eine Standardverdünnung wurde bei jedem Lauf zur Bestimmung der Konzentration mit amplifiziert. Außerdem wurde für jede Probe die Expression eines Referenzgens bestimmt und damit normiert. Das Referenzgen HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase) ist ein Housekeeping-Gen, das ubiquitär und konstitutiv exprimiert wird. Da das HPRT-Gen nur für geringe Mengen von mRNA kodiert, ist es eine passende Referenz für seltene RNAs.

Programmierung des Robocycler™

Präinkubation	1 Zyklus		95°C	10 min
Quantifizierung	50 Zyklen	Denaturierung	95°C	10 sek
		Annealing	60°C	30 sek
		Elongation	72°C	1 sek
Abkühlung	1 Zyklus		40°C	30 sek

Zur Quantifizierung der vorangehenden mRNA-Menge wird die Korrelation der Zunahme der Emission mit dem PCR-Produkt verwendet. Zur Bestimmung wird die exponentielle Phase der PCR-Reaktion herangezogen. Nur in der exponentiellen Phase herrschen optimale Reaktionsbedingungen bezüglich der Verhältnisse und der Reaktionsprodukte. Zu Beginn der exponentiellen Phase kommt es zum ‚Crossing Point‘. An dieser Stelle überschreitet die Fluoreszenzkurve den Schwellenwert der Hintergrundfluoreszenz. In den letzten Zyklen der Quantifizierung kommt es zu einer Plateauphase, da hier die Reaktionsprodukte aufgebraucht sind. Durch die Verwendung der Standardkurve in Kombination mit dem Wert der einzelnen Proben am Crossing Point und der Normierung auf das Standardgen kann die Menge der eingesetzten cDNA quantifiziert werden.

2.2.19 siRNA-Transfektion

Mithilfe von Transfektion werden siRNAs transient in Zellen eingebracht, um dort definierte Gene zu hemmen. Die siRNAs wurden nach 2.1.5.1 entworfen und synthetisiert. Die Transfektionseffizienz wurde im Anschluss auf mRNA-Ebene mittels qRT-PCR bestimmt und auf Proteinebene mittels Western-Blot-Analysen.

2.2.19.1 Lipofectamin

Diese Art der Transfektion wurde ausschließlich bei Melanomzellen angewendet. Es wurden 24 h vor der Behandlung 100.000 Zellen/Well in 6-Loch-Zellkulturplatten kultiviert. Am nächsten Tag erreichten die Zellen eine Konfluenz von 60-70%. Eine Menge von 125 µl Serum-freien Medium Opti-MEM wurde in zwei 2 ml Einmalreaktionsgefäße pipettiert. In den siRNA-Ansatz wurden 1,5 µl siRNA (20 µM) in den Transfektionsgemisch-Ansatz 1,25 µl RNAiMax Lipofectamin gegeben. Die Ansätze wurden durch schonendes Schwenken gemischt und anschließend tropfenweise zusammengeführt. Zur Komplexierung der siRNA wurde der Ansatz 15 min bei Rt inkubiert. Bei den Zellen wurde ein Mediumwechsel mit je 1.250 µl TU2%-Melanomzellmedium durchgeführt. Es wurden 250 µl zu einer Endkonzentration der siRNA von 20 nm tropfenweise hinzugegeben und bei 37°C 5% CO₂ für 24 h bis zu 96 h inkubiert.

2.2.19.2 JetPRIME®

JetPRIME® ist ein Transfektionsreagenz, welches für die Transfektion von Melanozyten verwendet wurde. Die Melanozyten wurden für die Transfektion äquivalent zu den Melanomzellen ausgesät. Der Ansatz wurde in 2 ml-Einmalreaktionsgefäßen durchgeführt. Es wurden 200 µl JetPRIME®-Puffer vorgelegt und 2,2 µl siRNA (20 µM) hinzugegeben und vermengt. Danach wurden 4 µl JetPRIME® Transfektionsreagenz hinzu pipettiert und der Ansatz für 10 sek geschüttelt. Zur Komplexierung der siRNA wurde der Ansatz 10 min bei Rt inkubiert. Ein Mediumwechsel mit je 2 ml Medium (Hermes/ Melanozytenmedium) wurde durchgeführt. Ein Volumen von 206,2 µl des Ansatzes wurden mit dem Medium tropfenweise vermengt und bei 37°C 5% CO₂ für 24 h bis zu 96 h inkubiert.

2.2.20 Western-Blot

Der Western-Blot (Immunoblot) ist eine proteinbiochemische Methode zum Nachweis von Proteinen. Proteine aus Zelllysaten werden auf eine Membran übertragen und anschließend mithilfe von Antikörpern nachgewiesen.

2.2.20.1 Gelelektrophorese

Durch eine denaturierende Gelelektrophorese werden isolierte Proteine aufgrund ihrer Größe und Ladung aufgetrennt. Um die Proteine aufzutrennen, wurde das XCell SureLock™ Mini-Cell System von Invitrogen verwendet. Es wurden 10 µg der Proteinproben auf das Gel aufgetragen. Bei einem Gesamtvolumen von 24 µl wurden 6 µl 4x NuPAGE® LDS Sample Buffer, 2,4 µl 10x NuPAGE® Sample Reducing Agent, 15,6 µl H₂O und die entsprechende Menge Proteinprobe verdünnt in H₂O in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. Der Reaktionsansatz wurde zum Denaturieren für 10 min bei 70°C auf einem Heizblock inkubiert. Es wurden 20 µl der Proben in das NuPAGE® Novex Bis-Tris Gel geladen. Als Größenmarker wurden 10 µl SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Lösung verwendet. Für den Gellauf wurden folgende Puffer verwendet: 800 ml 1x Laufpuffer für die äußere Kammer und 200 ml 1x Laufpuffer versetzt mit 500 µl NuPAGE® Antioxidans für die innere Kammer (siehe 2.1.7). Der Gellauf dauert 50-60 min bei konstant 150 V, bis die blaue Lauffront das untere Ende des Gels erreicht hat.

2.2.20.2 Übertragen der Proteine (Blotting)

Im Anschluss wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde zuvor in 100% Methanol für 30 sek aktiviert, 2 min mit H₂O gewaschen und für 10-15 min in 1x Transferpuffer (siehe 2.1.7) gelegt. Die Übertragungskissen wurden ebenfalls in 1x Transferpuffer angefeuchtet. Das Gel wurde aus den Kammern genommen und das XCell-II-Modul aufgebaut. Der Aufbau der Apparatur war folgender: Kathode – 3

Übertragungskissen – Filterpapier – Membran – Filterpapier – 3 Blotting Pads – Anode. Der Sandwichaufbau wurde in die Apparatur geklemmt und mit 1x Transferpuffer aufgefüllt. Zum Kühlen wurde die äußere Kammer mit 600 ml H₂O aufgefüllt. Das Blotting dauerte bei 30 V ca. 60-70 min, je nach Größe der Proteine. Nachdem die Proteine auf die Membran übertragen wurden, wurde die Membran kurz in Waschpuffer (siehe 2.1.7) geschwenkt und anschließend für 1 h in Blockierlösung (siehe 2.1.7) bei Rt auf dem Schüttler inkubiert. Durch diese Blockierung wurden unspezifische Bindungen des primären Antikörpers vermieden.

Bei dem Brn3a-Western-Blot wurde die Membran nach dem Blotting (ohne Blockierung) mit einer Guanidinisothiocyanat (GT) Reihe (gelöst in 5% BSA/ 1% Tween) auf Eis behandelt, um die Proteine vollständig zu denaturieren. Die Membran wird zunächst durchsichtig und erscheint mit jedem Schritt der GT-Reihe zunehmend weißer zu werden.

Waschpuffer	kurz schwenken
4 M GT	10 min
2 M GT	5 min
1 M GT	5 min
0,5 M GT	5 min
0,25 M GT	5 min
0,125 M GT	5 min

Bei Raumtemperatur:

Waschpuffer	5 min
-------------	-------

Nach der Denaturierungsreihe wurde die Membran für 1 h mit Blockierlösung inkubiert und mit dem ersten Antikörper Anti-Brn3a 1:250 verdünnt in 0,05% Tween20 in PBS über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Die Detektion erfolgte mit Super Signal® West Femto Detektionsreagenz.

2.2.20.3 Hybridisierung

Um bestimmte Proteine auf der Membran nachzuweisen, wurden spezifische primäre Antikörper verwendet. Die Antikörper wurden je nach Datenblatt der Hersteller in Blockierlösung verdünnt und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler mit der Membran inkubiert. Die Membran wurde anschließend dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Der zweite Antikörper, der mit einer Horse-Raddish-Peroxidase (HRP) konjugiert ist, wurde ebenfalls je nach Datenblatt des Herstellers in Blockierlösung verdünnt und für 1 h bei Rt und

auf dem Schüttler auf die Membran gegeben. Die Membran wurde danach dreimal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen. Folgende Antikörperverdünnungen wurden verwendet:

Primäre Antikörper

Maus-Anti-Brn3a (14A6)	1: 250
Maus-Anti-HDAC11	1: 1.000
Maus-Anti-HDAC2 (neu)	1: 1.000
Maus-Anti- β -Aktin	1: 5.000

Sekundäre Antikörper

Anti-Maus IgG-HRP-linked	1: 5.000
Anti-Karnickel IgG-HRP	1: 2.000
Esel-Anti-Ziege IgG-HRP	1: 30.000

2.2.20.4 Detektion

Für die Detektion der Proteine wurde die Membran zunächst für 5 min mit 2 ml ECL (Enhanced Chemoluminescence) Plus Western Blotting Detection Reagent (Amersham) in Klarsichtfolie inkubiert. In der Dunkelkammer erfolgte anschließend die Detektion mithilfe eines ECL-Hyperfilm (GE Healthcare), der je nach Stärke des Signals 5 sek bis zu 5 min aufgelegt wurde. Die Filme wurden dann mit dem Western-Blot-Entwickler X-Omat entwickelt.

2.2.21 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung der experimentellen Daten erfolgte mittels Student-t-Test. Die Berechnungen wurden mithilfe des Softwareprogramms Microsoft Excel 2016 durchgeführt. Als signifikant (*) gelten p-Werte $\leq 0,05$, als nicht signifikant (n.s.) p-Werte $> 0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Expressionsanalysen in Zellen der humanen Haut

Um Unterschiede in der Expression von Brn3a in Melanozyten und Melanomzellen festzustellen, wurden Expressionsanalysen auf mRNA- und Proteinebene durchgeführt.

3.1.1 Brn3a-Expression

Die mRNA-Expression sowie die Proteinbiosynthese von Brn3a wurde in Melanozyten und Melanomzellen untersucht. Die mRNA wurde mittels Sonden-basierter qRT-PCR quantifiziert. Es wurde eine primäre Melanozyten-Zelllinie Hermes1 und sieben verschiedene Melanom-Zelllinien untersucht (Abbildung 13 (a)). In drei unabhängigen Experimenten konnte in Melanozyten lediglich eine sehr geringe Brn3a-mRNA-Expression nachgewiesen werden. In den Melanom-Zelllinien WM278 und WM9 wurde ebenfalls nur eine geringe Menge Brn3a-mRNA detektiert. Die Zelllinien WM3211, WM239A und WM1232 zeigten jeweils eine ähnliche höhere Expression von Brn3a im Vergleich zu Melanozyten. Die Melanomzellen WM35 und 1205Lu wiesen eine signifikant höhere Brn3a-mRNA-Expression auf.

Die Proteinbiosynthese wurde mithilfe von Western-Blot-Analysen ermittelt. Der Brn3a-Western-Blot wurde im Vergleich zur herkömmlichen Verfahrensart nach 2.2.20 modifiziert. In Abbildung 13 (b) sind die Untersuchungen dargestellt. Es wurden zwei verschiedene Melanozyten-Linien, und zwar immortalisierte Hermes1-Melanozyten und im Labor etablierte, primäre Melanozyten HM51, sowie sechs verschiedene Melanom-Zelllinien, nämlich WM239A, WM9, 1205Lu, WM35, WM1232 und WM793 analysiert. Die Melanozyten und die Melanom-Zelllinie WM9 zeigten nur minimale Proteinmengen von Brn3a. Die Melanomzellen WM239A, 1205Lu, WM35, WM1232 und WM792 wiesen demgegenüber eine hohe Brn3a-Proteinexpression auf. Die mRNA-Expression korrelierte in den meisten Proben mit der Proteinmenge. Diese Ergebnisse konnten nach der Publikation von Hohenauer et al. 2013 reproduziert werden [93].

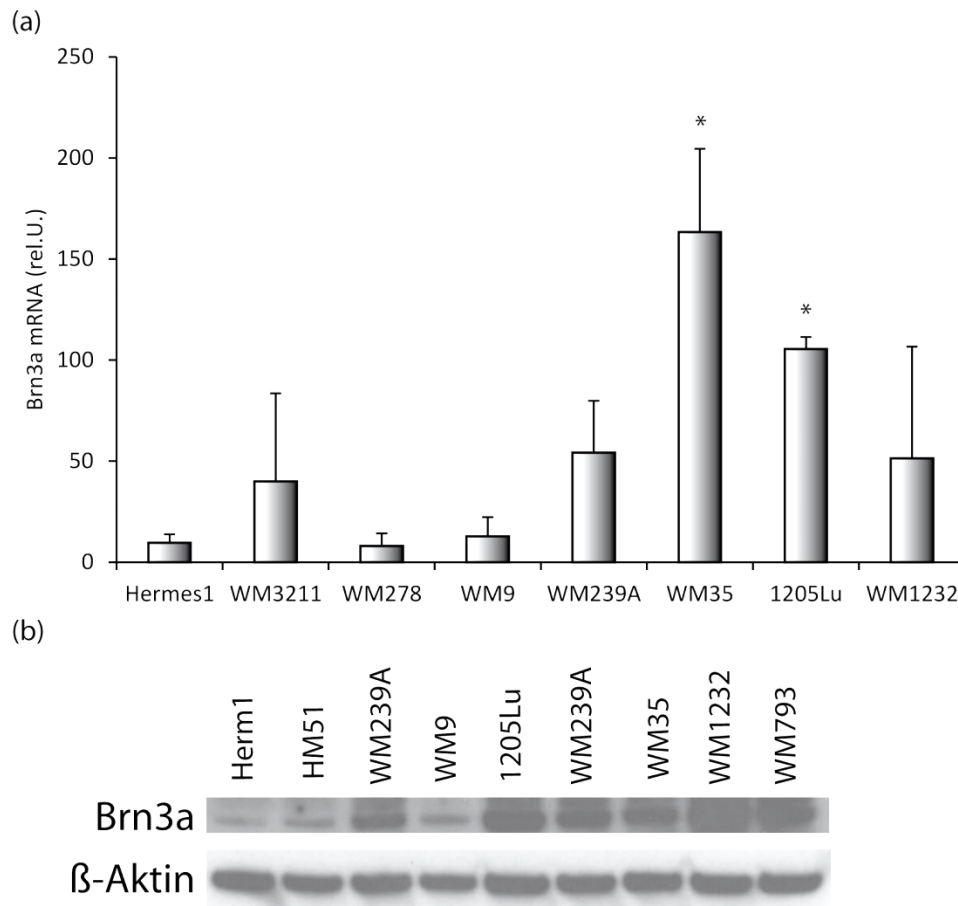


Abbildung 13: Brn3a-Expression in Melanozyten und Melanomzellen.

(a) Brn3a-mRNA-Expression. Die mRNA-Expression wurde mithilfe von qRT-PCR-Analysen ermittelt. Dargestellt sind Hermes1-Melanozyten und verschiedene Melanom-Zelllinien WM3211, WM278, WM9, WM239A, WM35, 1205Lu und WM1232. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, als Referenz dienten Hermes1.

(b) Brn3a-Proteinbiosynthese. Die Proteinbiosynthese von Brn3a wurde mittels Western-Blot-Analyse mit einem spezifischen Brn3a-Antikörper analysiert. Es wurden Proben von Melanozyten Hermes1 und HM51 (Humane Melanozyten 51), sowie von Melanomzellen WM239A, WM9, 1205Lu, WM35, WM1232 und WM793 untersucht. Als Ladekontrolle diente humanes β -Aktin. Western-Blots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

3.2 Expressionsanalysen von Transkriptionsfaktoren in Zellen der Haut

Um eine spezifische Expression von Brn3a im Melanom zu bestätigen, wurde die mRNA-Expression von weiteren neuronalen Transkriptionsfaktoren, die im Melanom eine Rolle spielen, in Melanozyten und Melanomzellen untersucht. Die Transkriptionsfaktoren wurden aufgrund der folgenden Eigenschaften ausgewählt. Brn2 ist wie Brn3a ein POU-Transkriptionsfaktor, welcher eine Rolle in der Proliferation und Migration von Melanomzellen spielt [56]. Durch die Expression von MITF differenzieren NCCs zu Melanoblasten [7, 50]. Mit

der Expression von SOX10 werden NCCs initial zu Melanozyten determiniert [7, 50]. SOX9 ist ein Transkriptionsfaktor, welcher in die Spezifizierung von NCCs involviert ist und eine zentrale Rolle in der Entwicklung der Neuralleiste spielt. SOX9 wird in sich entwickelnden Geweben, wie der Neuralleiste exprimiert [159].

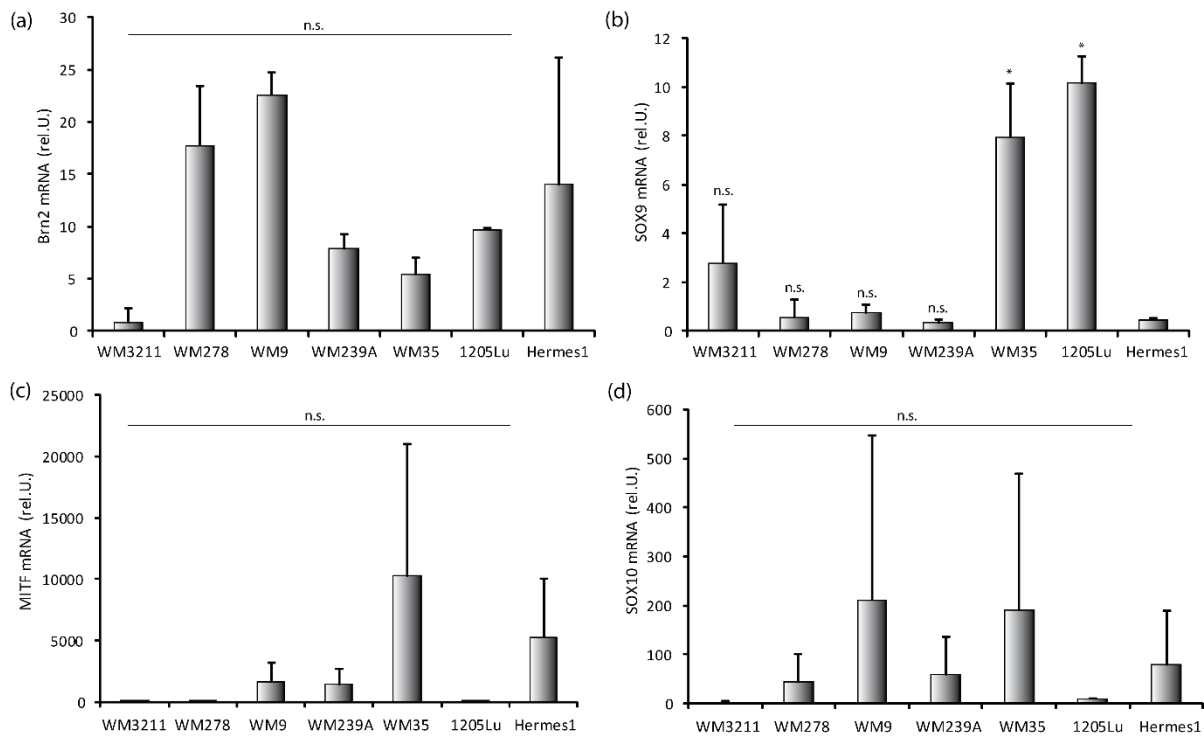


Abbildung 14: mRNA-Expression von verschiedenen neuronalen Transkriptionsfaktoren in Melanomzellen und Melanozyten. Die mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren Brn2, SOX9, MITF und SOX10 wurde mittels qRT-PCR in unterschiedlichen Melanomzellen und Hermes1-Melanozyten untersucht. Gezeigt sind von links Melanomzellen WM3211, WM278, WM9, WM239A, WM35 und 1205Lu sowie Melanozyten Hermes1. Es sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen dargestellt. $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, als Referenz diente jeweils Hermes1.

Es wurden 6 verschiedene Melanomzelllinien WM3211, WM278, WM9, WM239A, WM35 und 1205Lu sowie Hermes1-Melanozyten mittels qRT-PCR auf mRNA-Expression von Brn2, SOX9, MITF und SOX10 untersucht (Abbildung 14). Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente durchgeführt. Eine sehr geringe Brn2-mRNA-Expression fand sich bei WM3211 (Abbildung 14 (a)). WM239A, WM35, 1205Lu und Hermes1 wiesen moderate Mengen und WM278 und WM9 im Vergleich zu den anderen untersuchten Zellproben hohe Mengen von Brn2-mRNA auf. SOX9 war lediglich in WM35 und 1205Lu stark exprimiert (Abbildung 14 (b)). Alle anderen untersuchten Zellen wiesen geringe mRNA-Mengen auf. MITF konnte in drei Melanomzelllinien nicht und in zwei Melanomzelllinien in geringer Menge nachgewiesen werden (Abbildung 14 (c)). In WM9 und WM239A fand sich ebenfalls nur eine sehr geringe

MITF-Expression. Demgegenüber wiesen WM35-Melanomzellen und Melanozyten eine erhöhte MITF-Expression auf. In den Melanomzelllinien WM321 sowie 1205Lu konnte kaum eine SOX10-mRNA-Expression (Abbildung 14 (d)) und in WM278, WM239A und Hermes1 eine geringe SOX10-mRNA-Expression detektiert werden. Auch die Melanomzellen WM9 und WM35 zeigten eine nur geringe SOX10-mRNA-Expression, wobei die Standardabweichung bei den verschiedenen Messungen hoch war. Insgesamt konnte keine signifikante Erhöhung der SOX10-Expression in Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten festgestellt werden.

3.2.1 Brn3a-Expression in therapieresistenten Melanomzellen

Aufgrund der häufigen Entwicklung von Resistenzen gegenüber zielgerichteter Melanomtherapie mit Kinasehemmstoffen ist die Charakterisierung dieser resistenten Zellen von großem Interesse, um dadurch möglicherweise neue Wege der Überwindung solcher Resistenzen zu finden. Daher wurde die Expression von Brn3a in Melanomzelllinien, die durch chronische Exposition eine Resistenz gegen BRAF- und MEK-Inhibitoren erworben haben, untersucht.

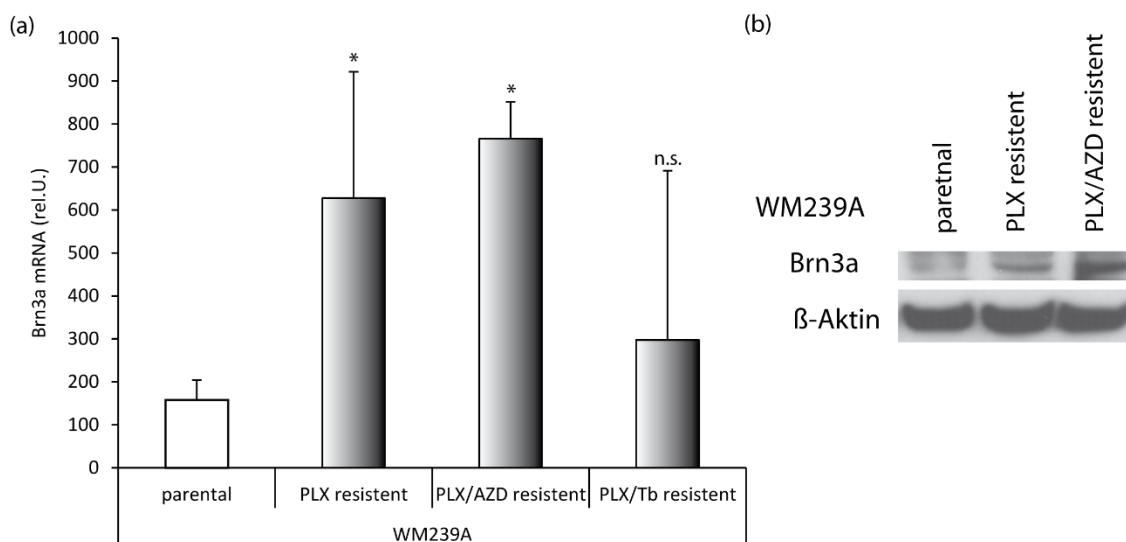


Abbildung 15: Brn3a-Expression in resistenten Melanomzellen WM239A im Vergleich zu parentalen WM239A-Melanomzellen. Die Resistenzen bestehen gegenüber den zielgerichteten Melanom-Therapeutika PLX4032 (Vemurafenib, ein BRAF-Inhibitor), AZD6244 (Selumetinib, ein MEK1/2-Inhibitor) und Tb (Trametinib, ein MEK1/2-Inhibitor). Gezeigt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit Standardabweichungen.

(a) Brn3a-mRNA-Expression. Die mRNA-Expression des Transkriptionsfaktors Brn3a wurde mittels qRT-PCR in parentalen WM239A-Melanomzellen und resistenten WM239A-Melanomzellen untersucht. Dargestellt sind von

links nach rechts parentale, PLX-resistente, PLX/AZD-doppeltresistente und PLX/Tb-doppeltresistente WM239A-Melanomzellen. $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, als Referenz dienten parentale WM239A-Zellen.

(b) Brn3a-Proteinbiosynthese. Die Proteinbiosynthese von Brn3a wurde mittels Western-Blot-Analyse mit einem spezifischen Brn3a-Antikörper bestimmt. Es wurden Proben von parentalen WM239A-Melanomzellen mit Proben von PLX-resistenten und PLX/AZD-doppelt resistenten WM239A-Zellen verglichen. Als Ladekontrolle diente humanes β -Aktin. Western-Blots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Es wurden WM239A-Melanomzellen, die Resistenzen gegen verschiedene Inhibitoren ausgebildet haben, untersucht. Die Resistenzen bestanden gegenüber PLX4032 (Vemurafenib, ein BRAF-Inhibitor), AZD6244 (Selumetinib, ein MEK1/2-Inhibitor) und Tb (Trametinib, ein MEK1/2-Inhibitor). Parental („elterlich“) bedeutet, dass die ursprünglichen Melanomzellen noch keinen Inhibitoren ausgesetzt waren und damit auch keine Resistenzen erworben haben. Um die Zellen resistent zu machen, wurden sie über mehrere Wochen mit den spezifischen Inhibitoren behandelt (2.2.4.). Als resistent werden die Zellen angesehen, die trotz Inhibitor-Exposition überleben und nicht absterben. In Abbildung 15 (a) wird die Brn3a-mRNA-Expression dargestellt. PLX- und PLX/AZD-resistente WM239A-Zellen zeigten eine signifikante höhere Brn3a-Expression als die parentalen WM239A-Zellen. Die gegenüber PLX und Tb doppelt-resistenten Zellen wiesen demgegenüber keine wesentlich erhöhte Brn3a-mRNA-Expression auf. Auf Proteinebene war ebenfalls eine erhöhte Brn3a-Expression in PLX- und PLX/AZD-resistenten Melanomzellen zu beobachten (Abbildung 15 (b)).

3.3 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren

Unsere Vorarbeiten, vor allem die spezifische Expression von Brn3a in Melanomzellen gegenüber Melanozyten, deuteten darauf hin, dass möglicherweise epigenetische Prozesse an der Regulation von Brn3a beteiligt sind. Um solche epigenetischen Regulationsmechanismen zu untersuchen, wurden Melanozyten und Melanomzellen mit verschiedenen Inhibitoren behandelt, welche auf der einen Seite in Methylierungsvorgänge und auf der anderen Seite in Acetylierungsprozesse eingreifen.

3.3.1 Behandlung mit DNA-Demethylierungsmitteln

Es wurde untersucht, ob sich im Promotorbereich von Brn3a CpG-reiche Inseln befinden. Unter Verwendung von UroGene (<http://www.urogene.org/methprimer/>), ein online basiertes Softwareinstrument, können CpG-Inseln in der Promotorregion von Genen gescannt und abgebildet werden (Abbildung 16). Das Vorhandensein von CpG-Inseln kann auf eine

Regulation durch Methylierung hindeuten. Inaktivierung durch Methylierung ist ein typischer regulatorischer Mechanismus für embryonale Proteine, was zu einer dauerhaften Deaktivierung führt. Ein Fehlen von Methylierungen am Genlokus von Brn3a in Melanomzellen könnte zu dessen Expression führen.

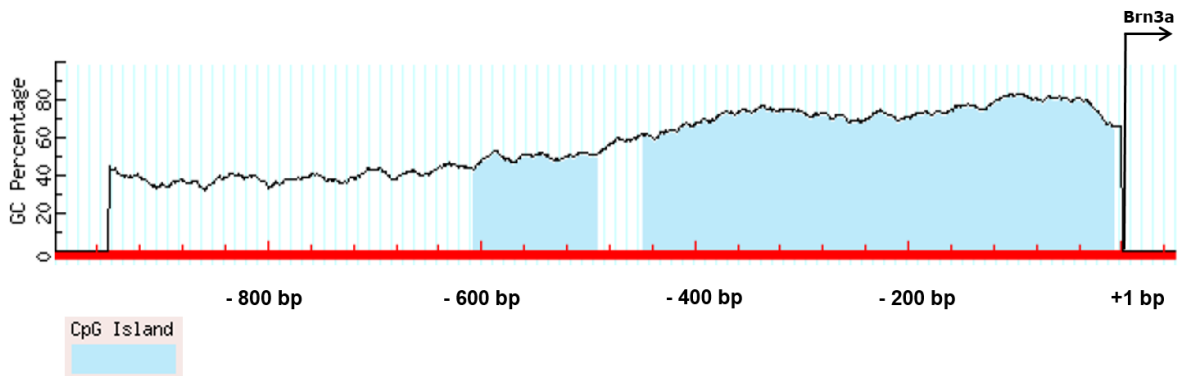


Abbildung 16: CpG-Inseln der Brn3a-Promotorregion 1.049 Bp stromaufwärts des Start-ATG. Die Basensequenz wurde mithilfe von Urogene gescannt. In blau sind CpG-reiche Abschnitte dargestellt.

Die Zellen wurden mit dem DNA-Demethylierungsmittel Aza behandelt. Aza inhibiert die Aktivität der DNA-Methyltransferase, was zu einer Relaxation der Chromatinfaltung führt, infolgedessen kann es zu einer erhöhten Genexpression kommen.

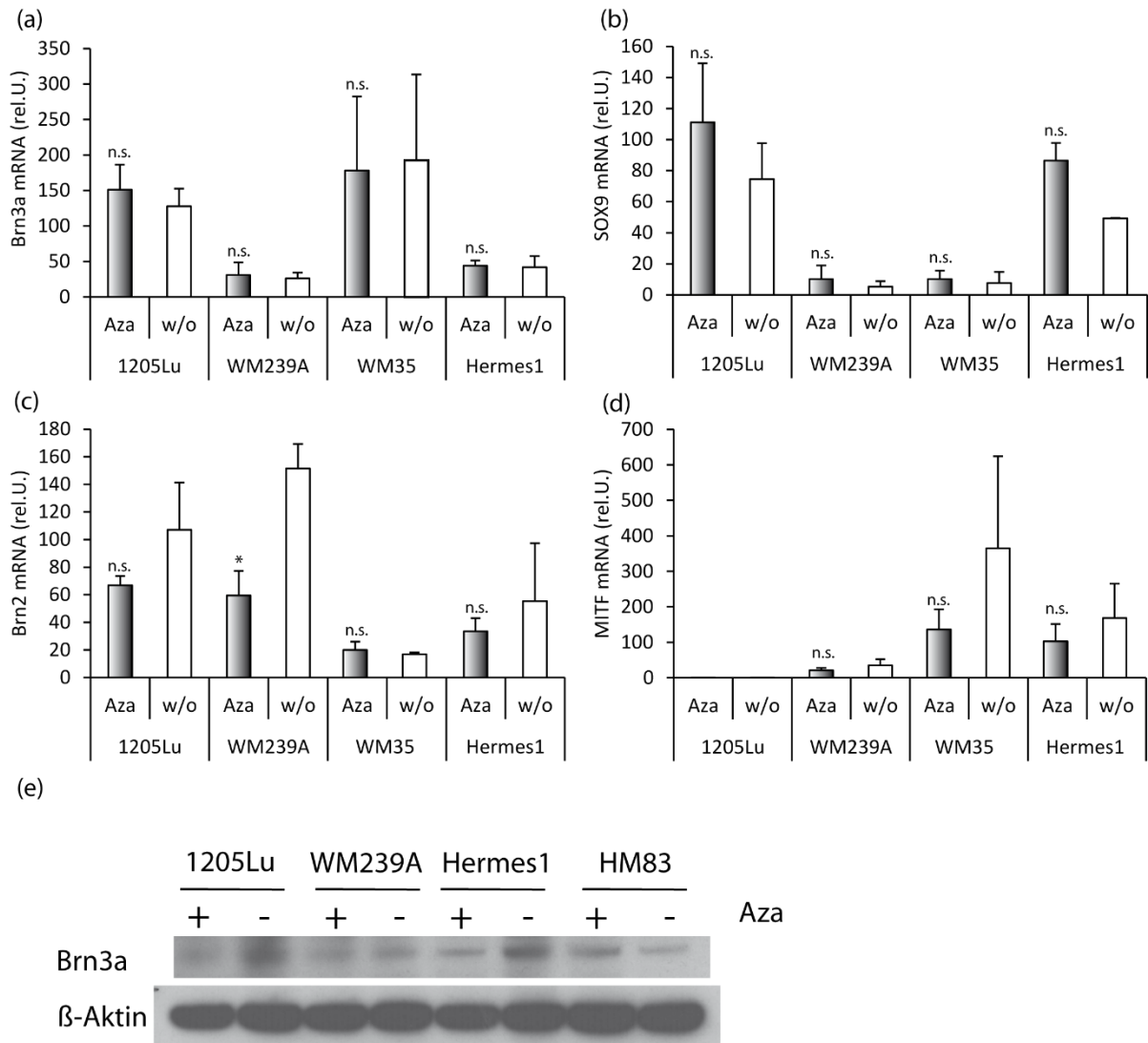


Abbildung 17: Expression von neuronalen Transkriptionsfaktoren in Melanozyten und Melanomzellen nach 48 h DNA-Demethylierung mittels Aza. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR untersucht. Verglichen wurden jeweils eine Aza-behandelte Zelllinie mit der jeweiligen unbehandelten (w/o) Zelllinie.

(a-d) Brn3a-, SOX9-, Brn2-, MITF-mRNA-Expression. Gezeigt sind Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten, sowie deren Standardabweichungen. $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, als Referenz dienten die jeweiligen unbehandelten Proben.

(e) Brn3a-Proteinbiosynthese. Es wurden die Melanom-Zelllinien 1205Lu, WM239A und die Melanozyten-Zelllinien Hermes1 und HM83 analysiert. Als Ladekontrolle diente humanes β -Aktin. Der gezeigte Western-Blot ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Melanozyten und Melanomzellen wurden für 48 h mit dem DNA-Demethylierungsagens Aza behandelt. Im Anschluss wurde die mRNA-Expression von Brn3a, SOX9, Brn2 und MITF mittels qRT-PCR untersucht (Abbildung 17 (a)-(d)). Auch auf Proteinebene wurde die Menge von synthetisiertem Brn3a untersucht (Abbildung 17 (e)). Die Melanomzellen 1205Lu, WM239A, WM35 und die Melanozyten-Zelllinie Hermes1 wurden für diese Untersuchungen

eingesetzt. Im Vergleich zur unbehandelten Probe (w/o) zeigte keine der Zelllinien eine signifikante Induktion der mRNA-Expression nach Behandlung mit Aza (Abbildung 17 (a)-(d)). Auch die Brn3a-Proteinbiosynthese war nicht signifikant unterschiedlich (Abbildung 17 (e)).

3.3.2 Behandlung mit unspezifischen HDACi

Epigenetische Regulationsmechanismen können eine wichtige Rolle in der Transkription von Genen spielen. Um eine mögliche Beteiligung der Acetylierung von Histonen in der Expression von Brn3a zu untersuchen, wurden sowohl Melanomzellen als auch Melanozyten mit HDACi behandelt und im Anschluss auf Veränderungen in der Brn3a-Expression untersucht.

3.3.2.1 Zeitreihen zur Bestimmung der optimalen Behandlungsdauer von TSA

Um zu untersuchen, wie schnell Brn3a durch TSA induziert wird und ob eher direkte oder indirekte Effekte zu einer Induktion von Brn3a führen, wurde eine Zeitreihe mit Zeitpunkten von 60 min bis zu 330 min in 30-minütigen Abständen durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die Brn3a-mRNA-Expression in den Zellen untersucht. Durch den Versuchsaufbau konnte außerdem die Zeitdauer bestimmt werden, wie lange die Zellen dem pan-HDACi TSA ausgesetzt werden können.

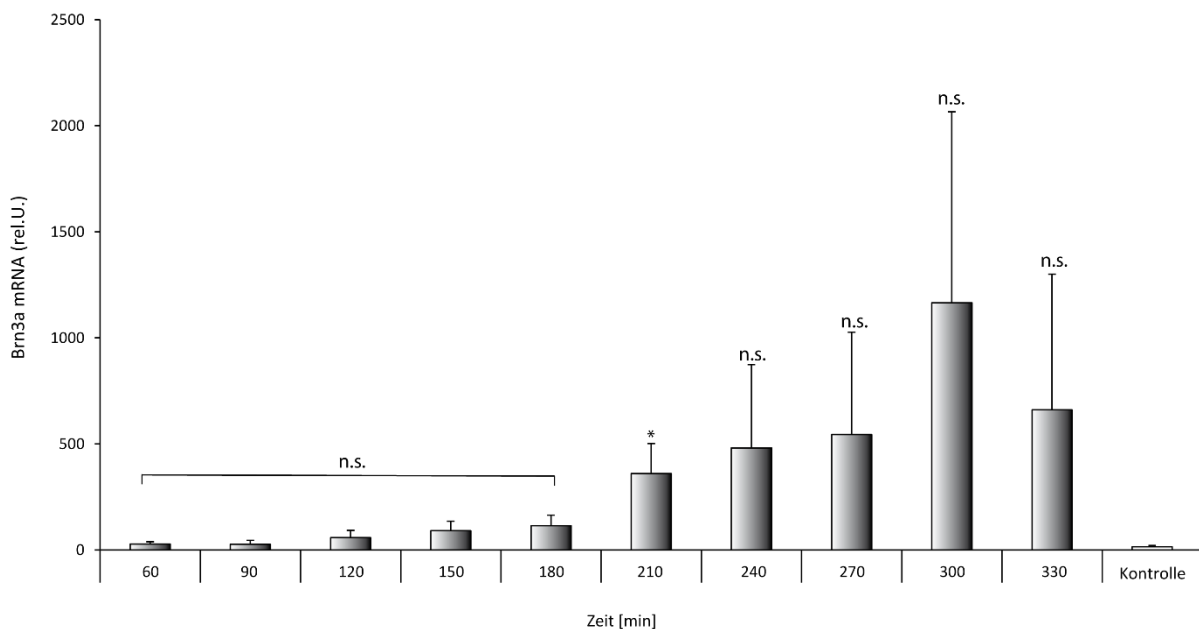


Abbildung 18: Zeitreihe der Brn3a-mRNA-Expression in Hermes1-Melanozyten nach Behandlung mit dem pan-HDAC-Inhibitor TSA. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR untersucht. Gezeigt sind Zeitpunkte von 60 min bis zu 330 min in 30-minütigen Abständen sowie unbehandelte Hermes1-Zellen. Es werden die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten sowie deren Standardabweichungen gezeigt. $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, als Referenz diente die unbehandelte Kontrolle nach 330 min.

In Abbildung 18 ist der Anstieg der Brn3a-mRNA in Hermes1-Melanozyten im Zeitverlauf der Behandlung mit TSA bis 300 min ersichtlich. Bei 330 min kam es zu einem Abfall der Brn3a-Expression vermutlich aufgrund von toxischen Effekten. Die Brn3a-Induktion war von 60 min bis 180 min nicht signifikant und bei 210 min signifikant im Vergleich zur Kontrolle. Die Kontrolle zeigte eine niedrige Brn3a-mRNA-Expression in unbehandelten Hermes1-Zellen nach 330 min.

Die Reduktion der Brn3a-mRNA-Expression nach 330 min deutete auf eine im Zeitverlauf toxische Wirkung von TSA hin. Es wurden weitere Experimente mit längeren Expositionszeiten von TSA durchgeführt. 1205Lu-Melanomzellen und Hermes1-Melanozyten wurden über 6 h, 24 h und 48 h mit TSA behandelt und lichtmikroskopisch untersucht.

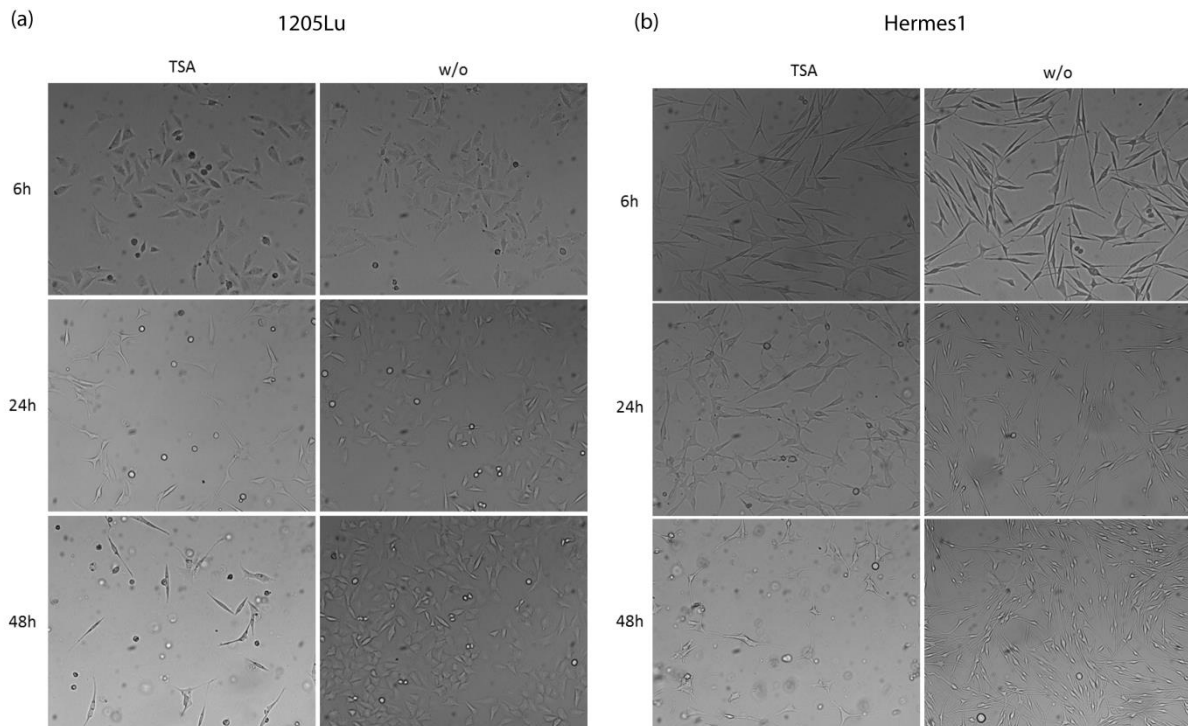


Abbildung 19: Lichtmikroskopische Aufnahmen nach TSA-Behandlung

(a) 1205Lu und (b) Hermes1-Melanozyten in einer Zeitreihe mit dem pan-HDAC-Inhibitor TSA und ohne Behandlung (w/o). Die Zellen wurden für 6 h, 24 h und 48 h mit TSA behandelt oder nicht behandelt (nur Zellkulturmedium) (w/o). Anschließend wurden lichtmikroskopische Aufnahmen mit einer 100-fachen Vergrößerung durchgeführt. Die Aufnahmen zeigen repräsentative Ausschnitte der jeweiligen Wells.

Die Melanomzelllinien zeigten im Zeitverlauf von 6 h bis 48 h mit TSA-Behandlung ein Absterben der Zellen (Abrundung der Zellen). Im selben Zeitverlauf konnte bei unbehandelten Zellen keine derartige Abrundung beobachtet werden, stattdessen bildete sich ein dichter Zellrasen (Abbildung 19 (a)). Bei Hermes1-Melanozyten konnte ein simultaner Verlauf

beobachtet werden. Die TSA-behandelten Zellen starben im Zeitverlauf bis 48 h immer mehr ab und die unbehandelten Zellen wuchsen dicht an (Abbildung 19 (b)).

Um das Absterben genauer zu untersuchen und zu quantifizieren, wurde das relative Zellüberleben nach Behandlung mit TSA gleichermaßen in einer Zeitreihe von 6 h, 24 h und 48 h untersucht.

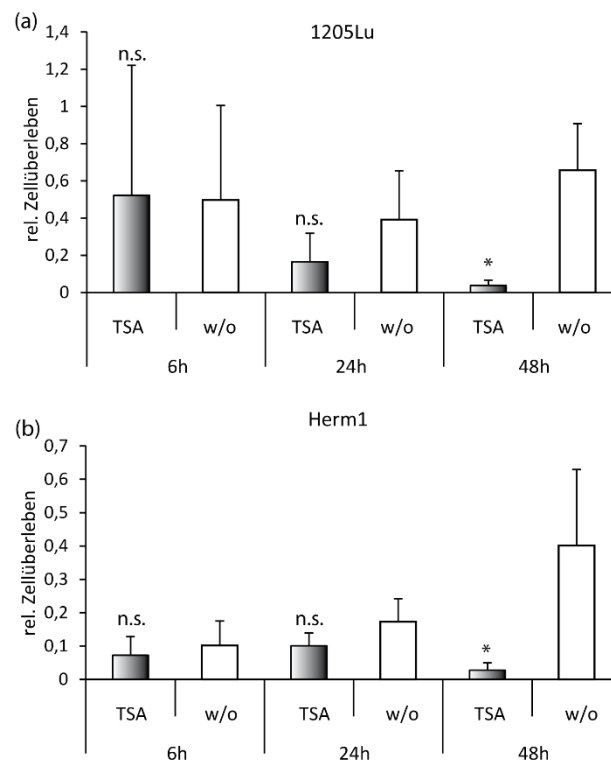


Abbildung 20: Relatives Zellüberleben nach TSA-Behandlung (a) 1205Lu-Melanomzellen und (b) Hermes1-Melanozyten nach Behandlung mit dem pan-HDAC-Inhibitor TSA in einer Zeitreihe. Das relative Zellüberleben wurde mittels Cell-Titer-Blue-Analyse bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, als Referenz dienten die jeweils unbehandelten Zellen (w/o).

Abbildung 20 (a) und (b) zeigen das relative Zellüberleben von 1205Lu-Melanomzellen und Hermes1-Melanozyten nach TSA-Behandlung. Nach 48 h TSA-Behandlung kam es sowohl bei Melanomzellen als auch bei Melanozyten zu einem signifikanten Absterben der Zellen, nicht aber zu den früheren Zeitpunkten.

3.3.2.2 TSA- und NaB-Behandlungen

TSA und NaB inhibieren die Enzymaktivität von HDACs unspezifisch, was zu einer Hyperacetylierung der Histone führt und somit zur einer Lockerung der Chromatinfaltung (Dekondensierung). Aufgrund dessen sind Transkriptionsfaktoren in der Lage, besser an

Promotorbereiche zu binden, was eine Erhöhung der globalen Genexpression zur Folge haben kann. Es gibt verschiedene Arten von HDACi. TSA ist ein starker HDACi, welcher bereits bei niedrigen Konzentrationen wirksam ist. TSA ist eine Hydraxamsäure. Dagegen ist NaB ein eher schwacher Inhibitor. Butyrat ist eine kurzkettige Fettsäure, welche unter anderem im Bakterienmetabolismus erzeugt wird [160].

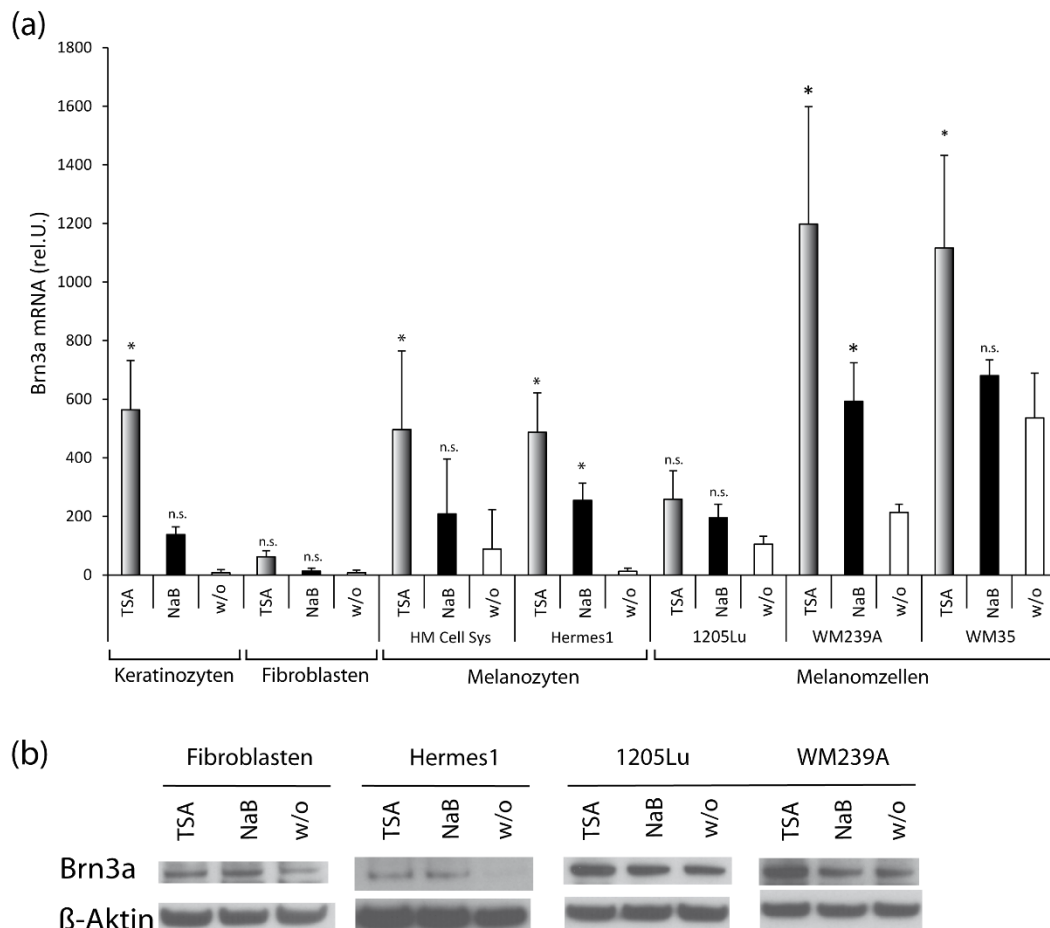


Abbildung 21: Unspezifische HDAC-Inhibition mit TSA und NaB in Hautzellen und Melanomzellen.

(a) Brn3a-mRNA-Expression. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR untersucht. Verglichen wurden jeweils die TSA/NaB-behandelten Zelllinien mit der jeweiligen unbehandelten (w/o) Zelllinie. Die Zellen wurden mit 10 μ M TSA, 2 mM NaB für 6 h oder nicht behandelt. Gezeigt sind die Mittelwerte mit Standardabweichung von humanen Keratinozyten, Fibroblasten, HM Cell System- und Hermes1-Melanozyten sowie die Melanomzelllinien 1205Lu, WM239A und WM35. $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, als Referenz dienten die jeweils unbehandelten Zellen (w/o).

(b) Brn3a-Proteinbiosynthese. Nach Behandlung mit TSA und NaB. Western-Blot-Analyse von Proteinextrakten aus Fibroblasten, Melanozyten und zwei Melanomzelllinien. Als Ladekontrolle diente humanes β -Aktin. Western-Blots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Normale Zellen humaner Haut, nämlich Keratinozyten, Fibroblasten und Melanozyten, sowie Melanomzellen wurden mit 10 μ M TSA oder 2 mM NaB für 6 h behandelt (Abbildung 21). Die Kontrollen wurden nur dem jeweiligen Zellkulturmedium ausgesetzt. In Keratinozyten, welche einer sehr geringen basalen Expression von Brn3a haben, kam es zu einer starken Brn3a-mRNA-Induktion durch TSA und zu einer geringen Induktion durch NaB (Abbildung 21 (a)). Fibroblasten zeigten lediglich eine geringfügig, nicht signifikant erhöhte Brn3a-mRNA-Expression durch TSA und keine Veränderung durch NaB. Bei den Melanozyten Hermes1 und HM Cell System demgegenüber kam es jeweils zu einer signifikant erhöhten Brn3a-mRNA-Expression durch TSA und in geringerem Maße auch durch NaB. Die Melanomzellen zeigten ein ähnliches Muster. Hier kam es ebenfalls zu einer stärkeren Erhöhung der Brn3a-mRNA-Expression durch TSA als durch NaB. Die Induktion der Brn3a-mRNA-Expression ist in Melanomzellen Zelllinien-spezifisch, da nicht alle untersuchten Melanomzellen eine gleich starke Induktion zeigten. Die gebildete Proteinmenge ist in Abbildung 21 (b) dargestellt. In allen untersuchten Zelltypen wurde eine unterschiedlich deutliche Erhöhung der Brn3a-Proteinmenge im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen festgestellt.

Um die Auswirkungen der HDACi auf weitere neuronale Transkriptionsfaktoren zu untersuchen, wurden Hermes1-Melanozyten für 6 h mit 10 μ M TSA oder 5 mM NaB behandelt. Daraufhin wurde die mRNA-Expression von MITF und SOX10 mittels qRT-PCR untersucht.

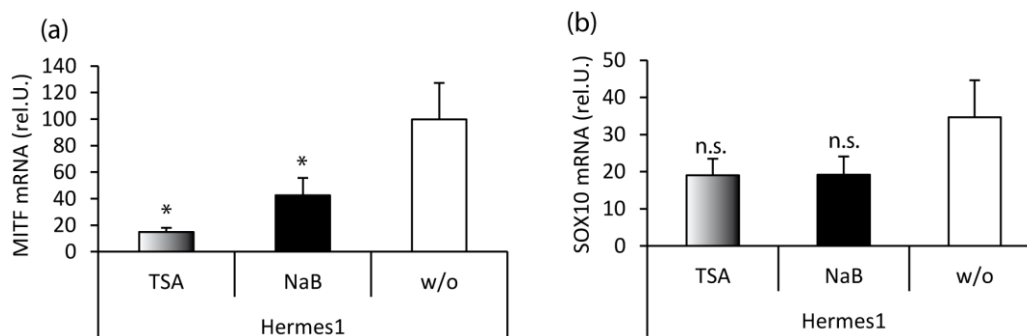


Abbildung 22: mRNA-Expression von MITF und SOX10 in Hermes1-Melanozyten. Expressionsanalyse nach 6 h Behandlung mit pan-HDAC-Inhibitoren TSA (10 μ M), NaB (2 mM) oder ohne Behandlung. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR untersucht. Verglichen wurden jeweils die relativen mRNA-Expressionswerte nach Behandlung mit TSA oder NaB mit der unbehandelten Probe (w/o). Mittelwerte mit Standardabweichungen werden für je drei unabhängige Experimente gezeigt. $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, als Referenz dienten die unbehandelten Hermes-Zellen (w/o).

Es zeigte sich eine signifikante Reduktion der MITF-mRNA-Expression nach Behandlung der Zellen sowohl mit TSA als auch mit NaB (Abbildung 22 (a)). Die SOX10-Expression

demgegenüber zeigte keine signifikante Änderung der mRNA-Menge nach Behandlung mit HDACi.

3.3.3 Behandlung mit spezifischen HDACi Mocetinostat und PCI-34051

Zur Identifizierung spezifischer HDACs, die Brn3a regulieren, wurden selektive HDACi in folgenden Experimenten verwendet. Mocetinostat (MGCD0103) ist ein selektiver HDACi, welcher keine HDACs der Klasse II, sondern ausschließlich HDAC1, 2, 3 und 11 inhibiert. PCI-34051 ist ebenfalls ein spezifischer HDACi und inhibiert selektiv HDAC1, 6, 8 und 10 (Abbildung 23).

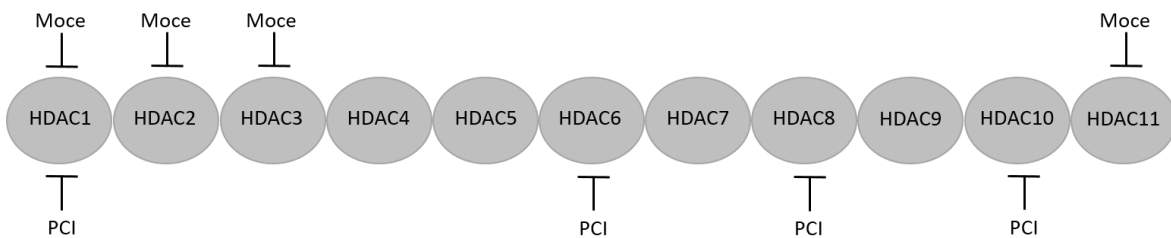


Abbildung 23: Spezifität der HDACi Mocetinostat und PCI-34051 gegenüber den einzelnen HDACs

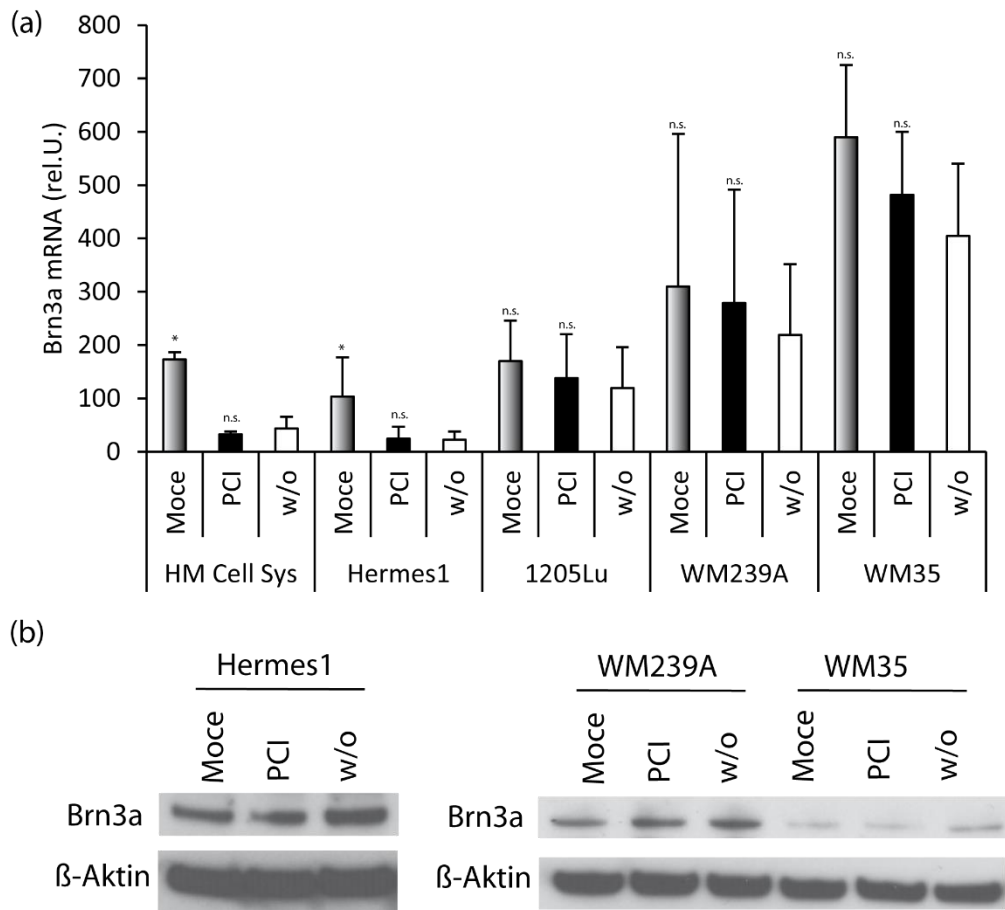


Abbildung 24: Spezifische HDAC-Inhibition in Melanozyten (Hermes1 und HM Cell Sys) und Melanomzellen (1205Lu, WM239A, WM35). (1,66 μ M Mocetinostat und 13 μ M PCI-34051 für 6 h oder ohne Behandlung (w/o))

(a) Brn3a-mRNA-Expression. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR untersucht. Verglichen wurden jeweils die Moce/PCI-behandelte Zelllinie mit der jeweiligen unbehandelten (w/o) Zelllinie. $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant.

(b) Brn3a-Proteinbiosynthese. Nach Behandlung mit spezifischen HDAC-Inhibitoren. Die Proteinbiosynthese wurde mittels Western-Blot-Analyse mit einem spezifischen Brn3a-Antikörper analysiert. Abgebildet sind von links Hermes1-Melanozyten und die zwei Melanom-Zelllinien WM239A und WM35. Als Ladekontrolle diente humanes β -Aktin. Western-Blots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Verschiedene Melanozyten-Linien und die Melanomzellen 1205Lu, WM239A und WM35 wurden für je 6 h mit 1,66 μ M Mocetinostat, 13 μ M PCI oder nur mit Zellkulturmedium (w/o) behandelt. Melanozyten wiesen eine signifikante Induktion der Brn3a-mRNA-Expression nach Mocetinostat-, nicht aber nach PCI-Behandlung auf. Bei den Melanomzellen konnte keine signifikant erhöhte Brn3a-mRNA-Expression festgestellt werden (Abbildung 24 (a)). Auf Proteinebene wurden keine Veränderungen beobachtet (Abbildung 24 (b)). Im Vergleich zu dem pan-HDACi TSA ist der spezifische HDACi Moce eher ein schwacher Inhibitor, was eine mögliche Erklärung sein könnte.

3.3.4 Effekte von HDACi auf potentielle Brn3a-Zielgene

In einem anderen wissenschaftlichen Projekt im Labor wurden potentielle neue Zielgene von Brn3a mit Hilfe von Überexpressions- und Microarray-Analysen identifiziert (Stephanie Kellner, nicht publizierte Daten). Zu diesen Genen zählen Timeless und FAM139A, die von Brn3a aktiviert werden, sowie NTN4 und Wnt5A, die von Brn3a supprimiert werden. Das Timeless-Gen (TIM) spielt eine Rolle in der embryonalen Entwicklung, im Zellzyklus, in der DNA-Replikation und in der Reparatur von DNA-Schäden [161]. FAM129A (auch bekannt unter NIBAN oder C1orf24) ist involviert in die Regulation der Proteintranslation [162]. Im metastatischen Melanom wird das Gen NTN4 (Netrin4) hochexprimiert und spielt eine funktionelle Rolle in der Melanom-Zellinvasion [163]. Das Gen Wnt5A spielt eine Rolle in der Entwicklung und Selbstregulierung von Gewebe. Die vermehrte Expression von Wnt5A wird mit verschiedenen Krankheiten in Verbindung gebracht, wie beispielsweise Entzündung und Krebs [164]. In dieser Arbeit wurden daher diese Gene nach HDACi-Behandlung ebenfalls untersucht.

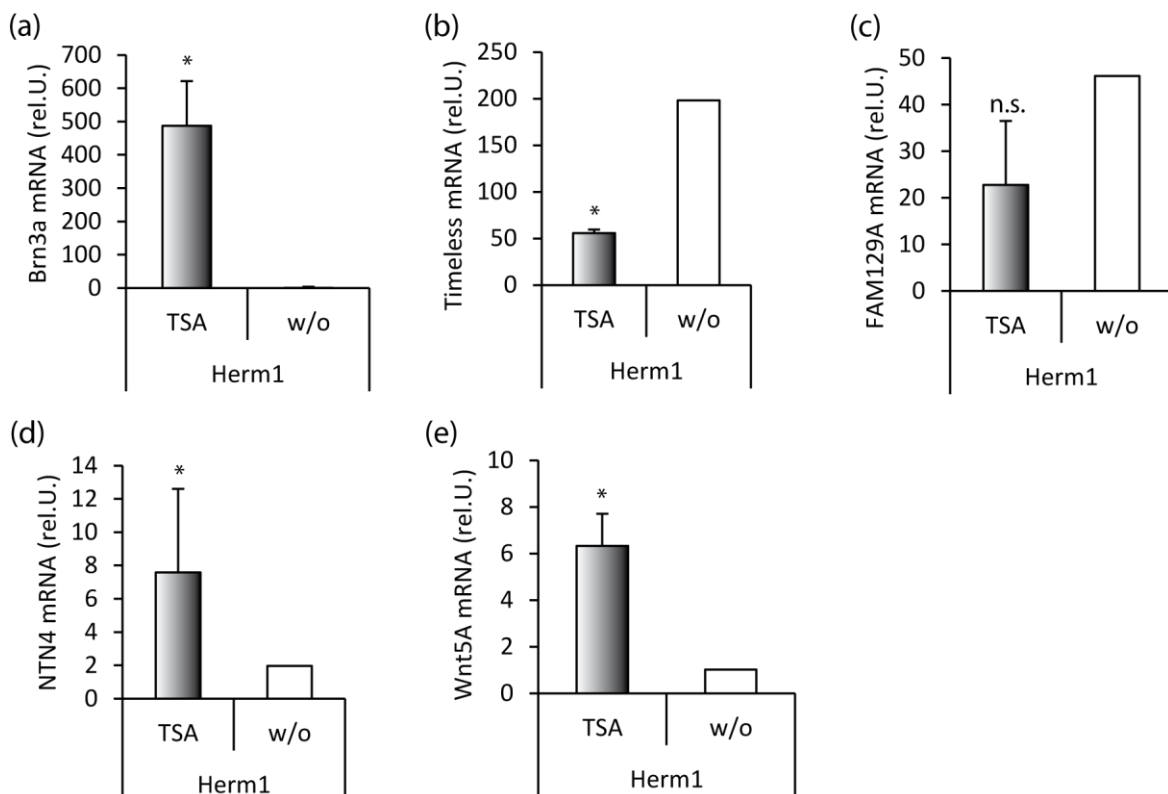


Abbildung 25: mRNA-Expression potentieller Zielgene von Brn3a in Hermes1-Melanozyten. Nach Behandlung mit 10 µM des pan-HDAC-Inhibitors TSA.

(a) Brn3a-mRNA, (b) Timeless-mRNA, (c) FAM129A-mRNA, (d) NTN4-mRNA, (e) Wnt5A-mRNA nach TSA-Behandlung. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR untersucht. Probe (w/o). $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, als Referenz dienten die jeweils unbehandelten Zellen (w/o).

Hermes1-Melanozyten wurden für 6 h mit 10 μM TSA behandelt und die mRNA-Expression dieser Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen gemessen (Abbildung 25).

Die mRNA-Expression von Timeless war signifikant verringert durch die HDAC-Inhibition mit TSA (Abbildung 25 (b)). Die Expression von FAM129A änderte sich nicht (c). Hingegen waren sowohl NTN4 (Abbildung 25 (d)) als auch Wnt5A (Abbildung 25 (e)) signifikant erhöht vergleichbar mit den Daten für Brn3a.

3.4 HDAC2-GloTM-Enzymaktivität

Die unterschiedliche Expression von Brn3a in Melanomzellen verglichen mit Melanozyten könnte auf mögliche Unterschiede in der Aktivität des HDAC2-Enzyms zurückzuführen sein. Um das zu untersuchen, wurde ein Aktivitätsassay verwendet, mit dem in Melanozyten und Melanomzellen nach 6 h Behandlung mit 10 μM TSA, 1,66 μM Mocetinostat oder ohne Behandlung die Enzymaktivität von HDAC2 mittels Lumineszenz gemessen wurde (beschrieben in Material und Methoden 2.2.7).

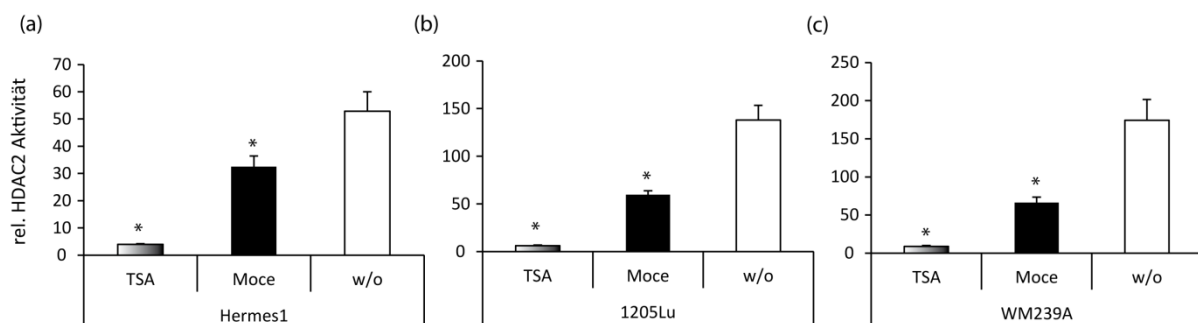


Abbildung 26: Relative HDAC2-Aktivität. Nach Behandlung mit 10 μM TSA, 1,66 μM Mocetinostat oder ohne Behandlung (w/o). Getestet wurden Hermes1-Melanozyten, 1205Lu- und WM239A-Melanomzellen nach 6 h Behandlung mit dem jeweiligen HDACi. Die Aktivität wurden mit einem enzymatischen HDAC2-GloTM Assay von Promega gemessen. $p \leq 0,05$, als Referenz dienten die jeweils unbehandelten Zellen (w/o).

In drei untersuchten Zelllinien konnte eine signifikante Reduktion der Enzymaktivität nach Behandlung sowohl mit TSA als auch mit Mocetinostat im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gezeigt werden (Abbildung 26).

3.5 Expressionsanalysen von HDACs in Melanozyten und Melanomzellen

Aufgrund der Annahme, dass Brn3a möglicherweise durch eine Deacetylierung der HDACs reguliert sein könnte, müsste eine hohe Expression einzelner/einer HDAC/s in einer Zelllinie mit einer niedrigen Expression von Brn3a in derselben Zelllinie korrelieren. Gleiches gilt für eine niedrige HDAC-Expression, diese müsste mit einer hohen Brn3a-Expression korrelieren. Dies könnte darauf hindeuten, dass die identifizierten HDACs in der Brn3a-Regulation involviert sind.

3.5.1 Untersuchung der HDAC-mRNA

Es wurden Expressionsanalysen von allen Histondeacetylasen aller bekannten Klassen in Melanozyten und Melanomzellen durchgeführt, um einen Zusammenhang der HDAC-Expression mit der Brn3a-Expression zu untersuchen.

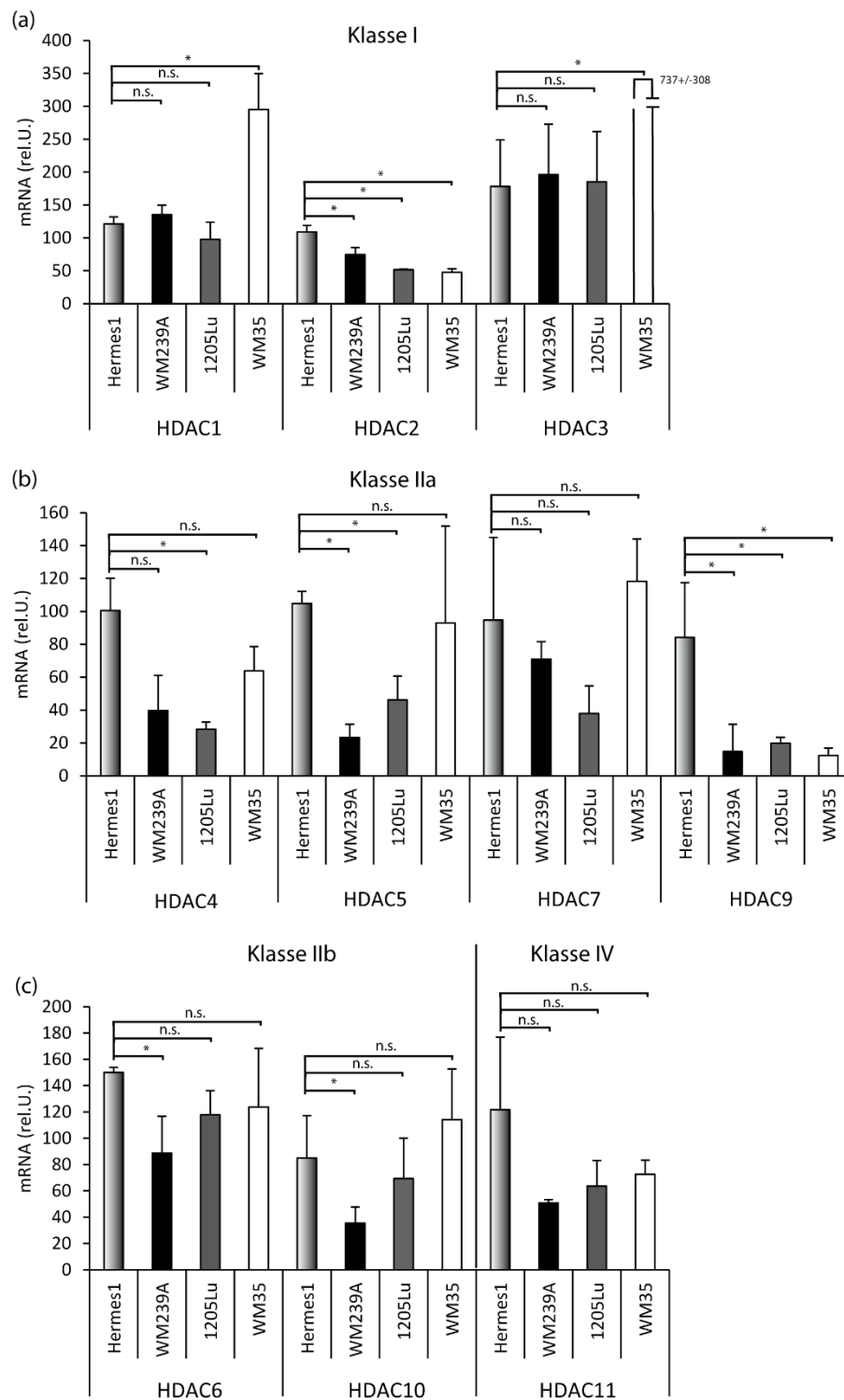


Abbildung 27: mRNA-Expression aller HDACs in Melanozyten und drei verschiedenen Melanom-Zelllinien. Aufgeteilt in Klassen

(a) Klasse I: HDAC1, 2, 3; (b) Klasse IIa: HDAC4, 5, 7, 9; (c) Klasse IIb: HDAC6, 10 und Klasse IV: HDAC11. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR untersucht. Verglichen wurden jeweils die relativen Expressionswerte der einzelnen HDACs in den unterschiedlichen Zellen. Von links wurden untersucht Hermes1, WM239A, 1205Lu und WM35. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, verglichen wurde jeweils Hermes1 mit den drei verschiedenen Melanomzelllinien.

Es wurde die HDAC-Expression in Hermes1-Melanozyten sowie in drei verschiedenen Melanomzelllinien 1205Lu, WM35 und WM239A untersucht (Abbildung 27). Da keine messbaren Mengen von HDAC8-mRNA detektiert werden konnten, wurden sie nicht dargestellt.

Eine höhere HDAC-mRNA-Expression in Melanozyten im Vergleich zu allen drei Melanomzelllinien konnte für HDAC2, 4, 9 und 11 beobachtet werden (Abbildung 27).

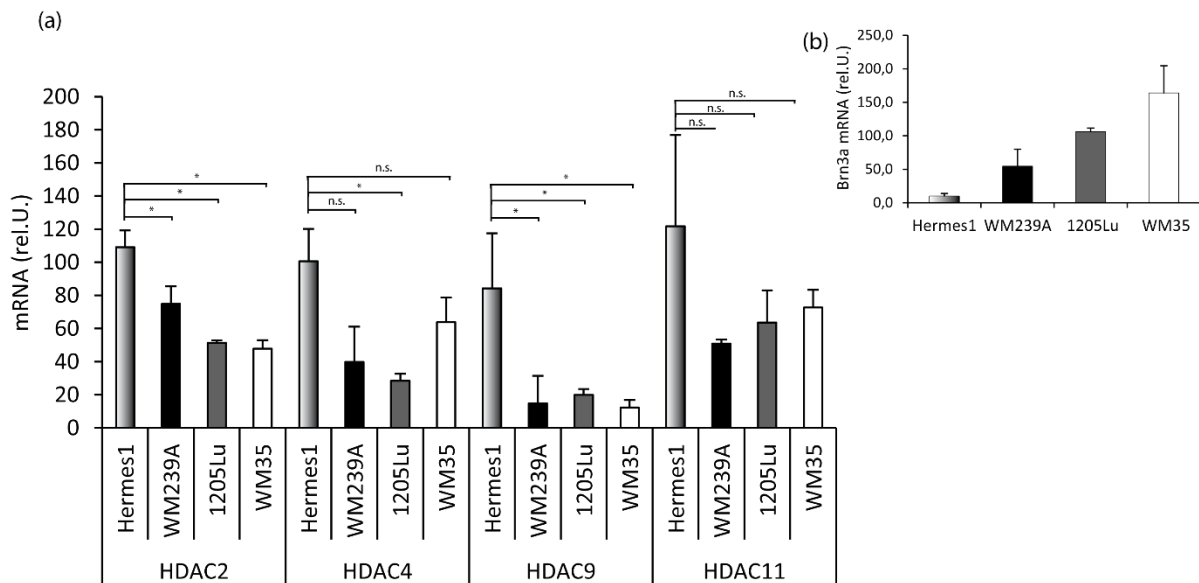


Abbildung 28: (a) Darstellung von HDAC2, HDAC4, HDAC9 und HDAC11 mit einer relativ erhöhten HDAC-mRNA-Expression in Melanozyten gegenüber Melanomzellen. Gezeigt sind Hermes1-Melanozyten und Melanomzellen WM239A, 1205Lu und WM35. Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR untersucht. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, verglichen wurde jeweils Hermes1 mit den drei verschiedenen Melanomzelllinien.

(b) Brn3a-mRNA-Expression. Zum Vergleich die inverse Korrelation der Brn3a-mRNA- zur HDAC-mRNA-Expression in denselben Zellen wie in (a) beschrieben.

Diese inverse Korrelation der HDAC-Expression für HDAC2, 4, 9 und 11 wurde zur besseren Übersicht nochmals in Abbildung 28 zusammengefasst. Für HDAC2 und HDAC9 konnte eine signifikante Erhöhung der mRNA-Expression in Melanozyten im Vergleich zu allen untersuchten Melanomzellen gezeigt werden. Für HDAC4 und 11 konnte ebenfalls im Trend eine höhere Expression in Melanozyten gegenüber Melanomzellen beobachtet werden. Abbildung 28 (b) zeigt die niedrigere Brn3a-mRNA-Expression in Melanozyten im Vergleich zu Melanomzellen.

Die HDAC2- und HDAC11-mRNA-Expression wurde ebenfalls in resistenten Zellen gegenüber zielgerichteten Melanom-Therapeutika untersucht. Hier konnte keine signifikante Veränderung der HDAC-mRNA-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 29).

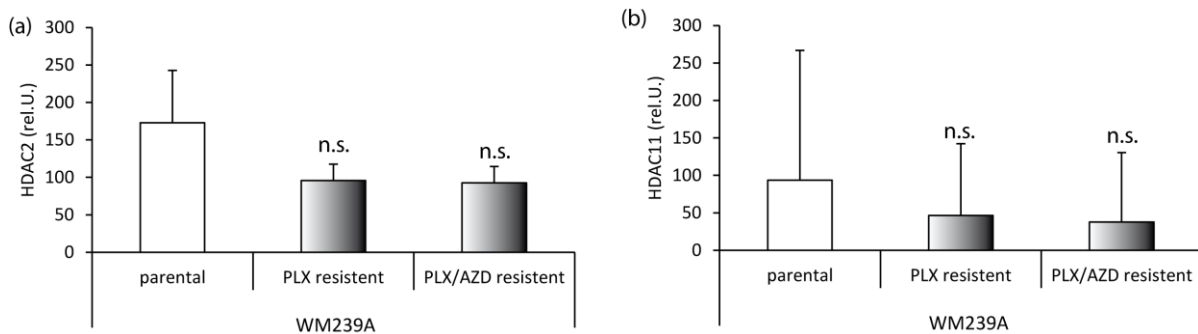


Abbildung 29: mRNA-Expression in resistenten Melanomzellen WM239A im Vergleich zu parentalen WM239A Melanomzellen. (a) HDAC2 und (b) HDAC11. Die Resistenzen bestehen gegenüber PLX4032 (Vemurafenib, ein BRAF-Inhibitor) und AZD6244 (Selumetinib, ein MEK1/2-Inhibitor). Die mRNA-Expression wurde mittels qRT-PCR untersucht. Verglichen wurde jeweils der Unterschied der HDAC mRNA-Expression von parentalen WM239A zu PLX-resistenten oder PLX/AZD-doppelt resistenten WM239A-Zellen. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, verglichen wurde jeweils resistente WM239A mit parentalen WM239A.

3.5.2 Untersuchung von HDAC2- und HDAC11-Protein

Aufgrund der Ergebnisse der mRNA-Expressionsanalysen wurde die Expression der zwei HDACs, HDAC2 und 11, ebenfalls auf Proteinebene untersucht. Hierfür wurden zwei verschiedene Melanozyten-Zelllinien sowie zwei Melanom-Zelllinien herangezogen und mittels Western-Blot-Analysen auf die Proteinbiosynthese in Zytoplasma- als auch Nuklearextrakten von HDAC2 und HDAC11 untersucht. Die Gewinnung der Proteine aus Zytoplasma- und Nuklearextrakten wurde herangezogen, um einen hohen Ertrag an qualitativ hochwertigen, reinen Proteinproben zu erhalten.

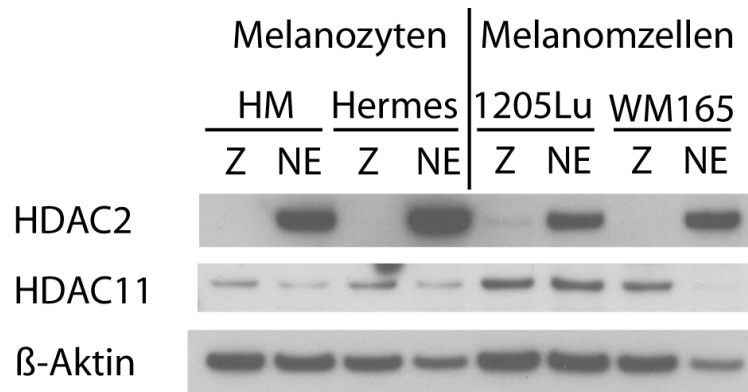


Abbildung 30: HDAC-Proteinbiosynthese von HDAC2 und HDAC11 in Zytoplasma- und Nuklearextrakten.

Die Proteinbiosynthese wurde mittels Western-Blot-Analyse mit spezifischen HDAC2- und HDAC11-Antikörpern analysiert. Dargestellt sind von links Melanozyten HM und Hermes sowie Melanomzellen 1205Lu und WM165. Als Ladekontrolle diente humanes β -Aktin. Western-Blots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Z = Zytoplasma; NE = Nuklearextrakt.

HDAC2-Protein wurde ausschließlich in Nuklearextrakten synthetisiert (Abbildung 30). Die HDAC2-Proteinmenge war in Melanozyten deutlich erhöht gegenüber Melanomzellen. Analog zu den mRNA-Daten zeigte die Untersuchung der HDAC2-Proteine in Hermes-Melanozyten die größte Menge. Die Proteinbiosynthese des HDAC11-Proteins konnte sowohl im Zytoplasma, als auch im Nukleus gezeigt werden. Die Melanom-Zelllinie 1205Lu wies die höchste Menge des HDAC11-Proteins auf. Die anderen untersuchten Zellen zeigten eine eher geringe HDAC11-Menge. Die Verwendung von β -Aktin als Ladekontrolle ist in diesem Setting ebenfalls möglich, da β -Aktin im Zytoplasma, als auch im Zellkern gleichermaßen synthetisiert wird (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ACTB>).

3.6 siRNA-Experimente

RNA-Interferenz-Experimente werden durchgeführt, um Veränderungen in den Zellen zu untersuchen, nachdem ein Gen zielgerichtet ausgeschaltet wird (Silencing).

3.6.1 siHDAC2 und siHDAC11

Die bisher erlangten Daten der spezifischen HDACi-Untersuchungen deuteten darauf hin, dass die von Mocetinostat inhibierten HDACs (HDAC1, 2, 3 und 11) eine mögliche Rolle in der Brn3a-Expression spielen könnten. Zusätzlich zeigten die HDAC-Expressionsanalysen inverse Korrelationen der HDAC- zur Brn3a-Expression für HDAC2, 4, 9 und 11. Diese Untersuchungen zusammengenommen grenzen die HDACs weiter ein auf HDAC2 und

HDAC11, welche für eine Deacetylierung in der Regulation des Brn3a-Gens zuständig sein könnten.

Aufgrund dieser Vorarbeiten wurden die Auswirkungen der Behandlung mit siHDAC2 und siHDAC11 auf die Brn3a-Expression untersucht. Zu Beginn wurden die Zellen 6 h, 24 h und 48 h mit siHDAC2 behandelt, um einen passenden Zeitpunkt der Behandlung festzulegen. Die Zellen wurden je mit 20 μ M siHDAC2, C03-siRNA (Kontroll-siRNA) oder mit Transfektionsreagenz behandelt. Im Anschluss daran wurden zu den angegebenen Zeitpunkten lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen gemacht.

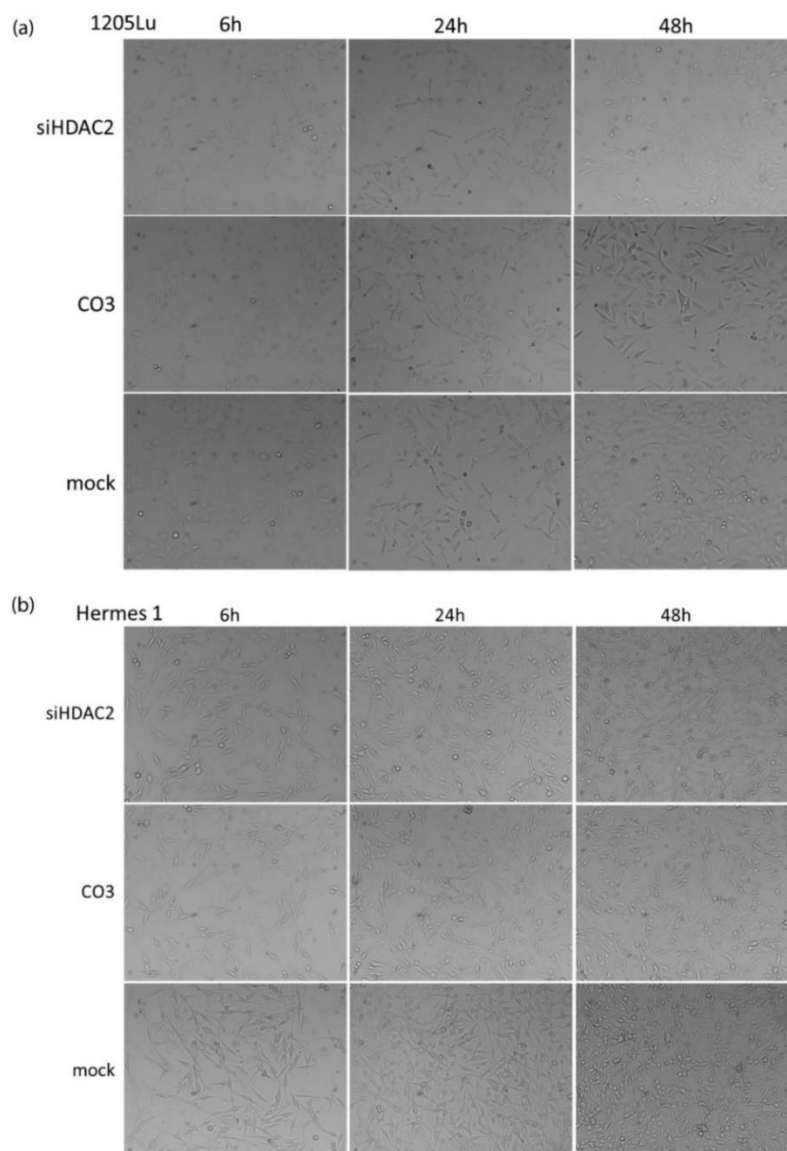


Abbildung 31: HDAC-Inhibition in 120Lu-Melanomzellen und Hermes1-Melanozyten. Mit spezifischer siRNA für HDAC2 im Vergleich zu Kontroll-siRNA (C03) oder nur Transfektionsreagenz (mock) in einer Zeitreihe von 6 h, 24 h und 48 h. Die Zellen wurden mit 20 μ M siRNA, Kontroll-siRNA oder mit Reagenz für den beschriebenen Zeitraum behandelt. Lichtmikroskopische Aufnahmen sind dargestellt mit einer 100-fachen Vergrößerung (repräsentative Ausschnitte).

Unter HDAC2-Hemmung mittels siRNA war in 1205Lu-Melanomzellen nach 6 h kaum ein Unterschied zu den Kontrollen zu beobachten (Abbildung 31 (a)). Nach 24 h war die Zelldichte reduziert und nach 48 h zeigte sich ein deutlich verringertes Wachstum HDAC2-gehemmter Zellen. In Hermes1-Melanozyten führte die HDAC2-Hemmung zu ähnlichen Ergebnissen (Abbildung 31 (b)).

Zur Quantifizierung der Zellvitalität wurden mittels Cell-Titer-Blue-Assay die Zellen (1205Lu, WM278 und Hermes1) 6 h, 24 h und 48 h nach siRNA-Transfektion untersucht. Hier fanden sich keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen außer nach 48 h bei WM278 (Abbildung 32 (b)).

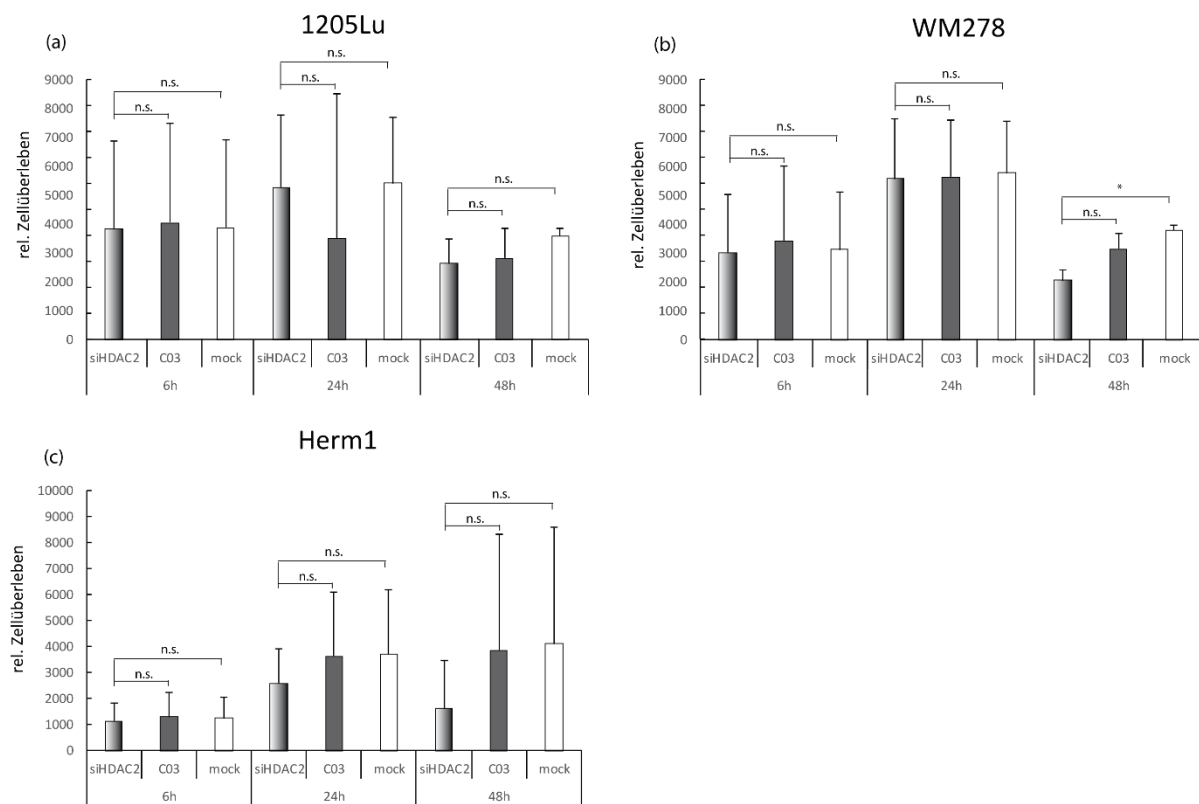


Abbildung 32: Zellvitalität nach siHDAC2, C03-siRNA oder mock (nur Transfektionsreagenz).

(a) 1205Lu- und (b) WM278-Melanomzellen sowie (c) Hermes1-Melanozyten. Nach Behandlung der Zellen wurde das relative Zellüberleben mittels Cell-Titer-Blue-Analyse bestimmt. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus je zwei unabhängigen Experimenten. $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, verglichen wurden jeweils siHDAC2-transfizierte mit C03-transfizierten Zellen und siHDAC2-transfizierte mit mock-behandelten Zellen.

Die mRNA-Expression von HDAC2, HDAC11 und Brn3a wurde 24 h nach Behandlung mit siHDAC2, siHDAC11, einer Kombination siHDAC2/11 und einer Kontroll-siRNA C03

untersucht. Es wurden zwei verschiedene Melanomzellen (1205Lu, WM278) und Hermes1-Melanozyten eingesetzt.

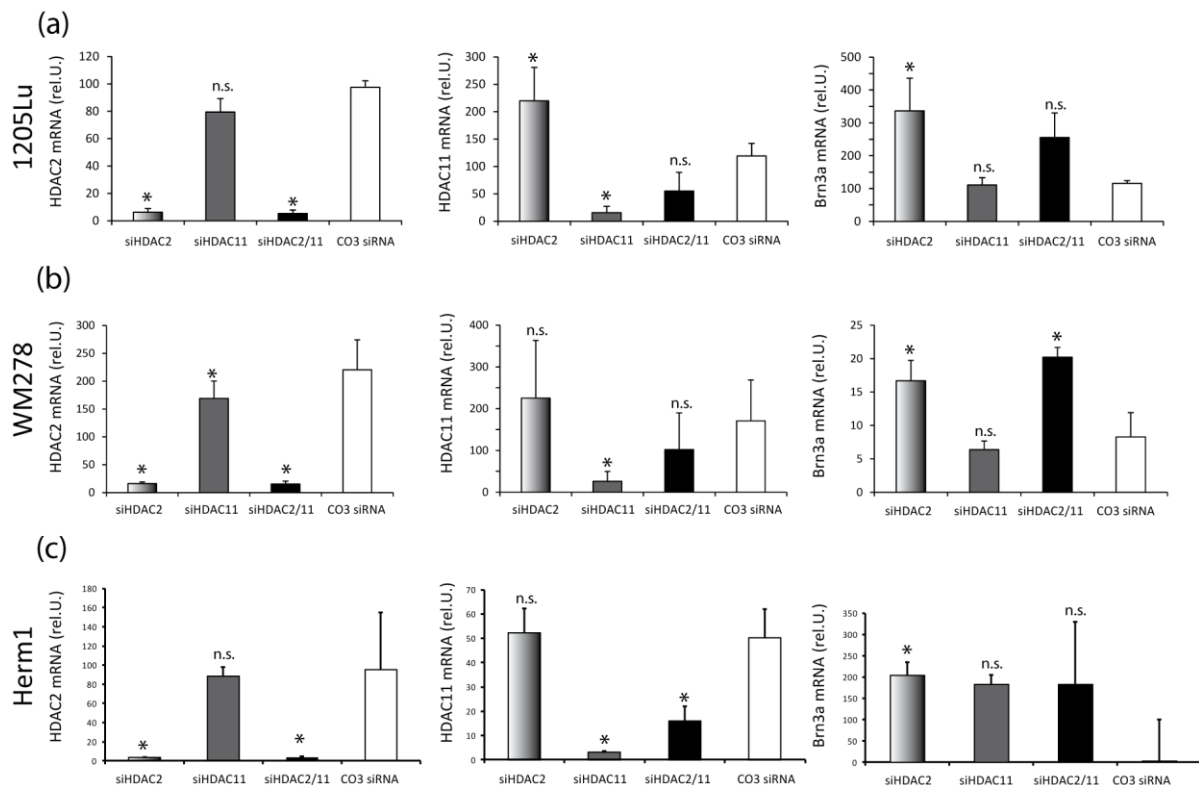


Abbildung 33: HDAC2- und HDAC11-mRNA-Expression nach siHDAC2- und siHDAC11-Behandlung.

(a) 1205Lu- und (b) WM278-Melanomzellen sowie (c) Hermes1-Melanozyten wurden für 48 h mit spezifischen siRNAs (siHDAC) oder Kontroll-siRNA (C03) transfiziert. Die mRNA-Expression für HDAC2, HDAC11 und Brn3a wurde mittels qRT-PCR ermittelt. $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, als Referenz dienten jeweils die C03-behandelten Zellen.

Die HDAC2-mRNA-Expression konnte signifikant in allen Zelllinien mittels einfacher siRNA-Behandlung (siHDAC2) und kombinierter siRNA-Behandlung (siHDAC2 plus siHDAC11) gehemmt werden. Die HDAC11-mRNA-Expression konnte in allen Zelllinien signifikant durch einfache siRNA-Behandlung (siHDAC11) gehemmt werden, aber nur nicht signifikant durch die kombinierte Behandlung (siHDAC11 plus siHDAC2) in Melanomzellen reduziert werden. In Hermes1-Melanozyten demgegenüber kam es auch zu einer signifikanten Reduktion der HDAC11 mRNA-Expression nach kombinierter siRNA-Behandlung (siHDAC2 plus siHDAC11). Die Brn3a-mRNA-Expression war im Vergleich zu den Kontrollen in allen Zelllinien nach HDAC2-Inhibition signifikant erhöht, während die Hemmung von HDAC11 keinen eindeutigen Unterschied bewirkte (Abbildung 33).

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde die siRNA-vermittelte Hemmung von HDAC2 in weiteren Zellen untersucht. Es wurden zwei Melanozyten-Zelllinien Hermes1 und HM83 und zwei Melanom-Zelllinien 1205Lu und WM239A verwendet. Diese wurden je 24 h mit 20 μ M siHDAC2, C03-siRNA oder nur mit Transfektionsreagenz behandelt.

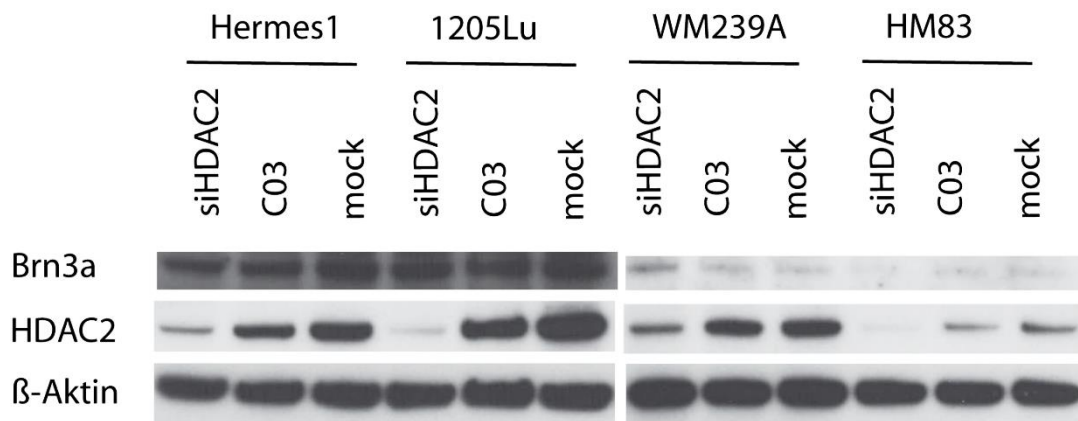


Abbildung 34: Proteinbiosynthese nach HDAC2-Hemmung. Die Zellen wurden für 48 h mit spezifischen siRNAs oder Kontroll-siRNA transfiziert. Es wurden Hermes1- und HM83-Melanozyten sowie 1205Lu- und WM278-Melanomzellen behandelt. Nach Behandlung der Zellen wurde die Proteinbiosynthese mittels Western-Blot-Analyse analysiert. Als Ladekontrolle diente humanes β -Aktin. Western-Blots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

Die Hemmung von HDAC2 mittels siRNA funktionierte in allen vier Zelllinien (Abbildung 34). Eine Induktion der Brn3a-Proteinbiosynthese konnte nur für die Melanomzellen 1205Lu und WM239A in geringem Maße gezeigt werden.

Außerdem wurden weitere neuronale Transkriptionsfaktoren, Brn2, SOX9 und MITF, untersucht. Es wurden Hermes1-Melanozyten und 1205Lu-Melanomzellen eingesetzt, welche für 24 h mit 20 μ M siHDAC2 oder C03-siRNA behandelt wurden.

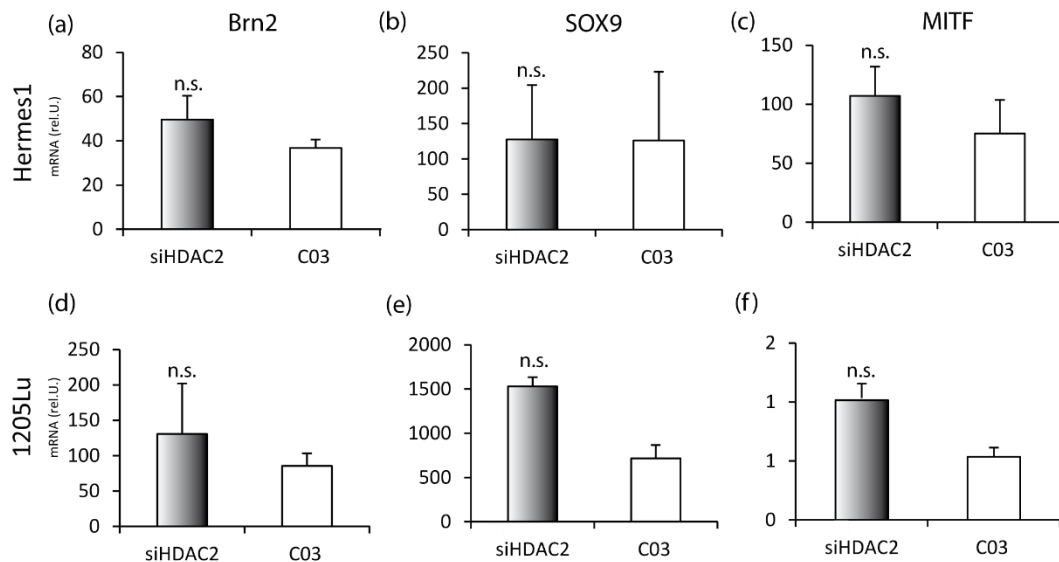


Abbildung 35: mRNA-Expression von neuronalen Transkriptionsfaktoren. In Hermes1-Melanozyten und 1205Lu-Melanomzellen 48 h nach Transfektion mit siHDAC2 oder C03-siRNA. Nach Behandlung der Zellen wurde die mRNA-Expression mittels qRT-PCR ermittelt. Es wurden die Transkriptionsfaktoren Brn2, SOX9 und MITF untersucht. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, als Referenz dienten jeweils die C03-behandelten Zellen.

Abbildung 35 zeigt keine signifikanten Auswirkungen der Behandlung mit HDAC2-siRNA, weder in Hinblick auf die zwei unterschiedlichen Zelllinien noch auf die unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren Brn2, SOX9 oder MITF.

3.6.2 siHDAC1 und siHDAC3

Mocetinostat inhibiert sowohl HDAC2 und HDAC11, als auch HDAC1 und HDAC3. Die Daten der spezifischen Inhibition zeigten, dass eine oder mehrere von Mocetinostat inhibierten HDACs an der epigenetischen Regulation von Brn3a beteiligt sein könnten.

Im Folgenden wurden die HDACs 1 und 3 mittels siRNA herunterreguliert. Daraufhin wurden die Auswirkungen der siRNA-Transfektion auf die Brn3a-mRNA-Expression untersucht.

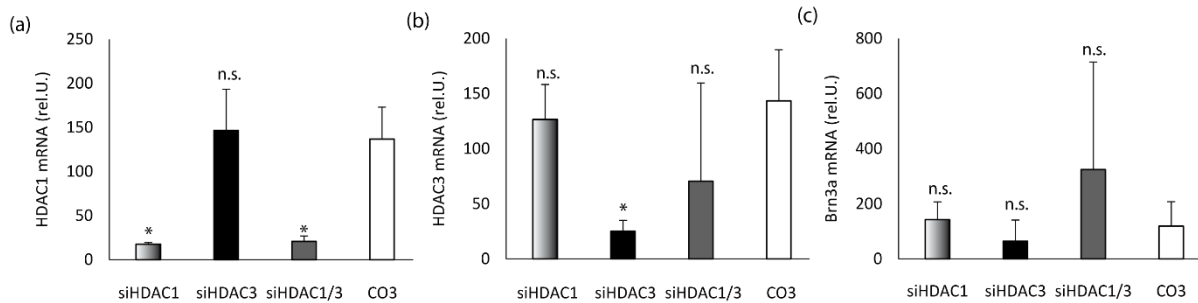


Abbildung 36: siHDAC1- und siHDAC3-Hemmung in Hermes1-Melanozyten. Die Zellen wurden für 48 h mit spezifischen siRNAs oder Kontroll-siRNA transfiziert. Nach Behandlung der Zellen wurde die mRNA-Expression für HDAC1, HDAC3 und Brn3a mittels qRT-PCR ermittelt. $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, als Referenz dienten jeweils die CO3-behandelten Zellen.

Die siRNA-vermittelte Hemmung von HDAC1 und HDAC3 war effektiv, weniger allerdings für HDAC3 in der kombinierten Hemmung (Abbildung 36 (b)). Eine signifikante Änderung der Brn3a-Expression war in keinem Fall zu beobachten.

3.7 HDAC2-Überexpression

Die Überexpression mittels HDAC2-Plasmid pCMV6-HDAC2 wurde durchgeführt, um eine mögliche Interaktion zwischen der Brn3a- und der HDAC2-Expression weiter zu untersuchen. Sollte HDAC2 eine Rolle in der Brn3a-Expression spielen, müsste eine Überexpression in Melanomzellen zu einer Reduktion der Brn3a-Expression führen.

Es wurden die verschiedenen Melanomzellen 1205Lu, WM35, WM239A sowie Hermes1-Melanozyten mit 1 μ g DNA des HDAC2-Plasmids behandelt oder Leervektor als Kontrolle. Nach 24 h wurden die Zellen über Licht-Mikroskopie evaluiert.

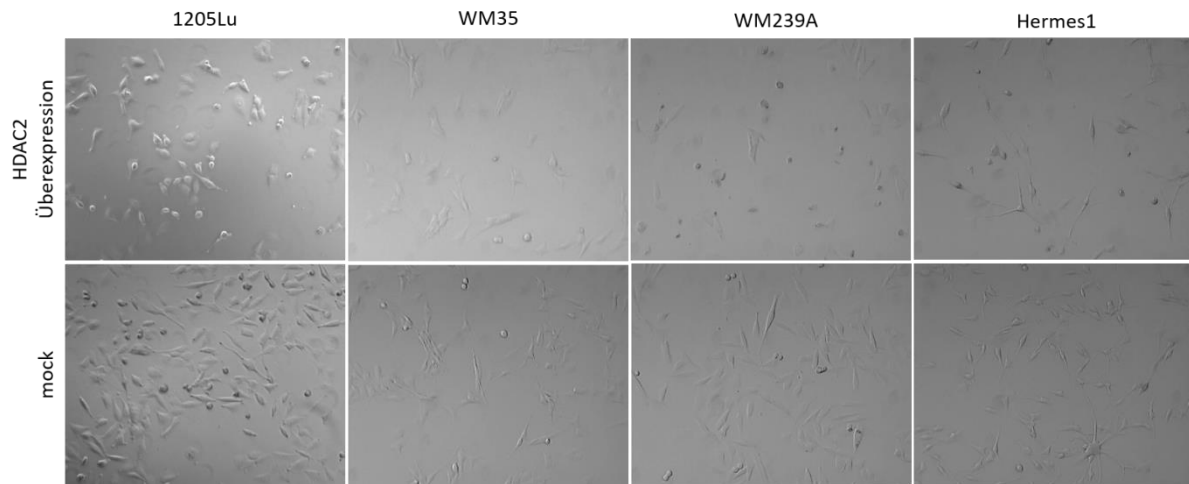


Abbildung 37: Lichtmikroskopische Aufnahmen von 1205Lu-, WM35- und WM239A-Melanomzellen sowie Hermes1-Melanozyten. Nach Behandlung mit einem HDAC2-Überexpressionsplasmid oder ohne Behandlung für 24 h. Die Zellen wurden für den beschriebenen Zeitraum mit einem HDAC2-Plasmid transfiziert, anschließend wurden lichtmikroskopische Aufnahmen mit einer 10-fachen Vergrößerung durchgeführt. Die Aufnahmen zeigen repräsentative Ausschnitte der jeweiligen Wells.

Die unbehandelten Kontrollzellen zeigten ein normales Wachstum (Abbildung 37). Während die HDAC-Überexpression nach 24 h in allen Proben zu einem verlangsamten Wachstum führte (Abbildung 37). Eine Abrundung der Zellen war besonders deutlich bei den 1205Lu-Melanomzellen sichtbar.

Die mRNA-Expression von HDAC2 und Brn3a wurde 24 h nach Transfektion mit HDAC2-Plasmid bestimmt (Abbildung 38). Gezeigt sind die HDAC2- und Brn3a-mRNA-Expression nach HDAC2-Überexpression sowie die mock-transfizierten Proben als Referenzkontrolle.

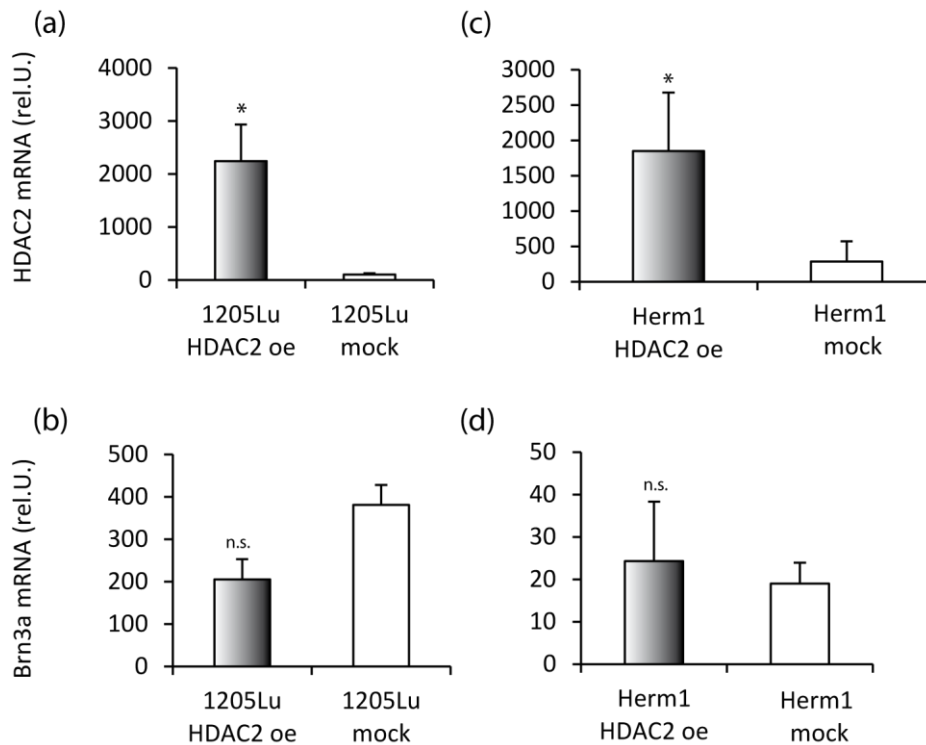


Abbildung 38: mRNA-Expression von HDAC2 (a, c) und Brn3a (b, d) nach HDAC2-Überexpression in 1205Lu-Melanomzellen (a, b) und Hermes1-Melanozyten (c, d). Die Zellen wurden für 24 h mit dem HDAC2-Plasmid transfiziert. Danach wurde die mRNA-Expression für HDAC2 und Brn3a mittels qRT-PCR ermittelt. $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant, oe = overexpression (Überexpression), als Referenz dienten jeweils die mock-behandelten Zellen.

Die Überexpression von HDAC2 ging mit einer verringerten Brn3a-mRNA-Expression in Melanomzellen und einer geringfügig erhöhten Brn3a-mRNA-Expression in Melanozyten einher, wobei die Unterschiede zu der Kontrolle nicht signifikant waren (Abbildung 38).

Die Expression von HDAC2 und Brn3a nach HDAC2-Überexpression wurde auch auf Proteinebene untersucht. Dafür wurden verschiedene Melanomzellen mit unterschiedlicher basaler HDAC2-Expression und Melanozyten verwendet.

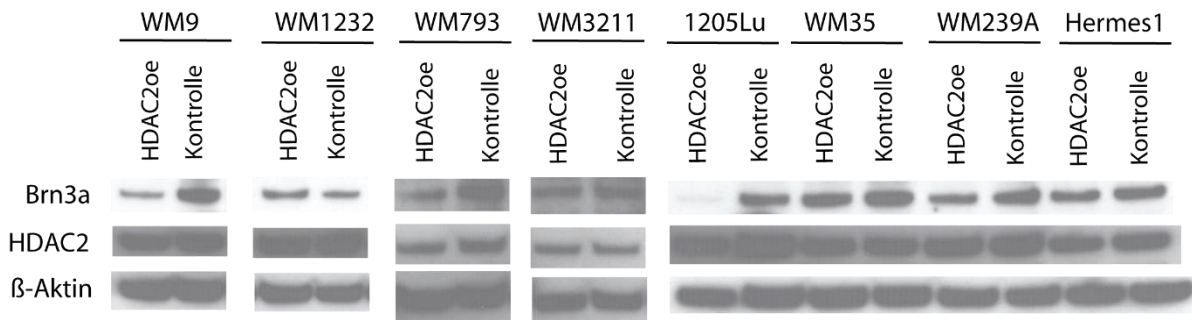


Abbildung 39: Proteinbiosynthese von Brn3a und HDAC2. Nach Überexpression von HDAC2 in 7 Melanomzelllinien und Hermes1-Melanozyten. Die Zellen wurden für 24 h mit dem HDAC2-Plasmid transfiziert und anschließend Proteinextrakte mittels Western-Blot analysiert. Die Kontrollen sind jeweils unbehandelte Zellen. Humanes β -Aktin diente als Ladekontrolle. Western-Blots sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. oe = overexpression (Überexpression)

Die Proteinmenge von Brn3a war nach HDAC2-Überexpression in den Melanomzellen WM9, WM793, 1205Lu und WM239A gegenüber den unbehandelten Kontrollen deutlich verringert (Abbildung 39). In den Melanomzellen WM1232, WM3211 und WM35 sowie in Hermes1-Melanozyten kam es zu keiner Reduktion von Brn3a. HDAC2-Protein war in keinem der Versuchsansätze in erhöhter Menge detektierbar.

Es wird vermutet, dass HDAC2-Überexpression aufgrund der Bindesequenz des Antikörpers nicht detektiert werden konnte (siehe auch 4.6). Jedoch impliziert die deutliche Reduktion von Brn3a in vier Melanomzelllinien, dass ein aktives HDAC2-Protein gebildet wurde. Der Bereich, in dem HDAC2-Antikörper binden, überschneidet sich nur um 18 Aminosäuren mit der Überexpressionssequenz. Es ist außerdem nicht sicher, ob die Antikörper überhaupt an der überschneidenden Sequenz binden. Dagegen ist es sehr wahrscheinlich, dass die Antikörper einige Aminosäuren weiter binden und deswegen nur die basale HDAC2-Proteinmenge detektieren. Es wurden mehrere Antikörper auf deren Bindung und Funktionalität in diesem Kontext hin getestet. Letztlich war es nicht möglich, auch nach Rücksprache mit mehreren Firmen, einen passenden Antikörper zu finden, der an der Region bindet. Die Menge von β -Aktin zeigte eine gleichmäßige Ladung der Proben.

3.8 Promotorstudien

Zusätzlich zur epigenetischen Regulation sind wahrscheinlich spezifische Transkriptionsfaktoren an der Expression von Brn3a involviert.

Die transkriptionelle Regulation von Brn3a wurde in Promotorstudien untersucht. Der proximale Promotorbereich von Brn3a stromaufwärts des Startcodons wurde in

unterschiedlich lange Konstrukte trunkiert. Die Konstrukte hatten eine Länge von 50 bis zu 1.200 Bp (siehe auch Abbildung 12).

Die Promotorkonstrukte wurden in 1205Lu-Melanomzellen transfiziert (800 ng) und nach 48 h die relative Luziferase-Aktivität gemessen, welche Rückschlüsse über die Aktivität des Promotorbereichs gibt. Zur Kontrolle wurden die Zellen mit dem Leervektor pGL4.10 ohne Promotorkonstrukte transfiziert oder nur mit Transfektionsreagenz behandelt.

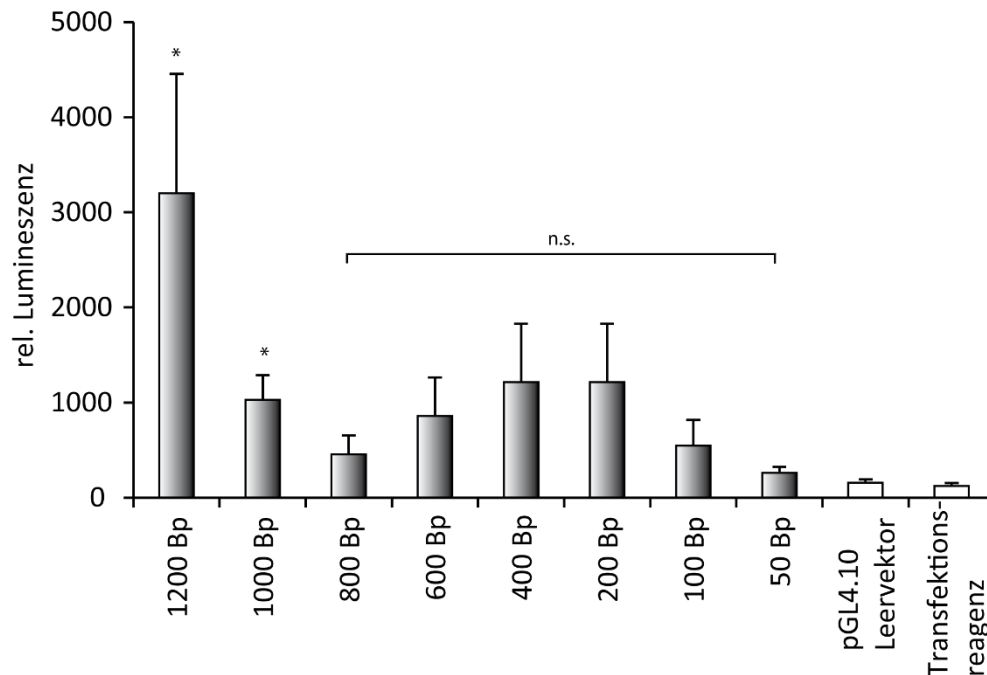


Abbildung 40: Luziferase-Aktivität in 1205Lu-Melanomzellen. Nach Transfektion mit 800 ng der generierten Promotorkonstrukte, mit pGL4.10 Leervektor oder dem Transfektionsreagenz. Die Luziferase-Aktivität wurde nach 48 h gemessen und normalisiert (relative Lumineszenz). $p \leq 0,05$, n.s. = nicht signifikant. Als Referenz diente jeweils der pGL4.10-Leervektor.

Eine signifikante Induktion der relativen Lumineszenz konnte für die beiden größten Konstrukte (1.200 Bp und 1.000 Bp) gegenüber dem transfizierten Leervektor pGL4.10 gezeigt werden. Die übrigen Konstrukte (800 Bp bis 50 Bp) zeigten keine signifikante Erhöhung der relativen Lumineszenz.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation des embryonalen Transkriptionsfaktors Brn3a in Melanomzellen und Melanozyten auf epigenetischer sowie auf transkriptioneller Ebene untersucht. HDACs, welche unter anderem als epigenetische Regulationsfaktoren von Genen agieren, könnten ein interessantes Target in der Melanomtherapie darstellen.

Zu Beginn wurden Expressionsanalysen von Brn3a und anderen neuronalen Transkriptionsfaktoren, welche eine Rolle in der Melanomentstehung spielen, durchgeführt. Es wurde eine erhöhte Expression von Brn3a in Melanomzellen gegenüber Melanozyten beobachtet. Für die Transkriptionsfaktoren Brn2, SOX9 und SOX10 konnte kein spezifisches Expressionsmuster in den untersuchten Zellen festgestellt werden.

In der Arbeit wurden unterschiedliche HDACi verwendet, um einerseits die Regulation durch HDACs näher zu erforschen und andererseits spezifische HDACs zu identifizieren, die eine Rolle in der Brn3a-Expression spielen könnten. Bei der Verwendung von pan-HDACi kam es vor allem in Melanozyten zu einer starken Induktion von Brn3a. Durch Verwendung spezifischer HDACi, wie Mocetinostat und PCI, konnten HDACs, welche eine mögliche Funktion in der Brn3a-Expression innehaben, auf HDAC1, 2, 3 und 11 eingegrenzt werden.

Es wurden Expressionsanalysen für alle HDACs durchgeführt, um mögliche Unterschiede in der Expression in Melanomzellen und Melanozyten festzustellen und um Zusammenhänge zwischen HDAC- und Brn3a-Expressions Mengen zu untersuchen. Dabei konnte eine inverse Korrelation der HDAC- und Brn3a-Expression für die HDACs 2, 4, 9 und 11 beobachtet werden.

In dieser Arbeit wurden die spezifischen HDACs, welche eine mögliche Rolle in der Brn3a-Expression spielen, mithilfe von siRNA-Transfektionen gezielt inhibiert, um deren Funktion in der Regulation von Brn3a zu charakterisieren. Außerdem wurde HDAC2 in Melanomzellen und Melanozyten überexprimiert, um die Folgen auf die Expression von Brn3a zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von HDAC2 mit einer erhöhten Expression von Brn3a einhergeht. Demgegenüber führte eine Überexpression von HDAC2 in 4 von 7 Melanomzelllinien zu einer Verringerung der Brn3a-Expression. Die Aussagekraft dieser Beobachtung wurde dadurch eingeschränkt, dass die Überexpression von HDAC2 in Western-Blot-Analysen nicht bewiesen werden konnte.

Darüber hinaus wurden HDAC2-Enzymaktivitätsassays in Melanomzellen und Melanozyten nach Behandlung mit HDACi durchgeführt. Hieraus sollten Erkenntnisse über die Aktivitäten des HDAC2-Enzyms in den verschiedenen Zelltypen und nach HDAC-Inhibitoren gewonnen werden. Die Effektivität der untersuchten HDACi konnte in allen Zellen bestätigt werden.

Außerdem wurde der Promotorbereich von Brn3a untersucht, um mögliche aktive Transkriptionsfaktor-Bindestellen zu identifizieren. Hierzu wurde der proximale Promotorbereich stromaufwärts des Startcodons von Brn3a in unterschiedlich lange Promotor-Konstrukte trunziert. Die Konstrukte wurden mithilfe eines Luziferase-Lumineszenz-Assays auf ihre Aktivität hin untersucht. Dabei konnte ein ca. 1.200 Bp langer Bereich identifiziert werden, welcher eine erhöhte Aktivität aufwies und somit möglicherweise über aktive Bindestellen für Transkriptionsfaktoren in der Brn3a-Expression eine Rolle spielt.

4.1 Expressionsanalysen von Brn3a

Wie bereits von Hohenauer et al. [93] aus unserer Arbeitsgruppe beschrieben, konnte der embryonale Transkriptionsfaktor Brn3a vornehmlich in Melanomzellen in hohen Mengen, jedoch nicht in Melanozyten nachgewiesen werden. Auf Proteinebene war die Expression von Brn3a in allen Melanomzellen mit nur einer Ausnahme konstant hoch. Diese Unterschiede in der Expression wurden darauf zurückgeführt, dass Brn3a eine positive Rolle in der Proliferation spielt, die in Melanomzellen im Vergleich zu Melanozyten deutlich erhöht ist [53, 93].

In der Melanomtherapie kommt es durch die Verwendung von mutationsbasierten zielgerichteten Therapien häufig zu einer Resistenzbildung der Zellen gegenüber den verwendeten Agenzien [26]. Diese resistenten Zellen wurden im Hinblick auf Unterschiede in der Expression von Brn3a untersucht. Es konnten signifikante Induktionen der Brn3a-mRNA für BRAF-Inhibitor-resistente sowie BRAF- und MEK-Inhibitor-resistente Zellen gezeigt werden. Auf Proteinebene wurden ebenfalls deutlich höhere Mengen von Brn3a in den resistenten gegenüber den nicht-resistenten parentalen Zelllinien beobachtet. Dies könnte darauf hindeuten, dass Brn3a eine Rolle in der Resistenzbildung spielt. Wie in 1.2.3.2 beschrieben, ist Brn3a ein essentieller Transkriptionsfaktor für das Überleben von Melanomzellen. Überdies könnten die antiapoptotischen Eigenschaften von Brn3a in der Resistenzbildung einen Vorteil der Melanomzellen gegenüber den Therapeutika darstellen. Außerdem könnte durch die erhöhte Brn3a-Expression das onkogene Wachstum der Zellen gesteigert werden (1.2.3.2) und somit die Resistenzbildung forciert werden.

4.2 HDAC-Hemmung durch unspezifische und spezifische Inhibitoren

Um herauszufinden, ob epigenetische Regulationsmechanismen eine Rolle in der Expression von Brn3a spielen, wurden Experimente mit verschiedenen Inhibitoren von DNA-Methylierungen und Acetylierungen durchgeführt. Die Expression von Genen unterliegt einer

strengen Regulation, um sicher zu stellen, dass die spezifischen Gene zum richtigen Zeitpunkt in den Zellen ein- oder ausgeschaltet werden [165].

Die Ergebnisse aus den Untersuchungen mit DNA-Demethylierungsagenzien zeigten keinen wesentlichen Einfluss auf die Brn3a-Expression. Der Inhibitor Aza wird bereits in der Melanomtherapie in verschiedenen Studien untersucht. Beispielsweise wird Aza in Kombination mit Interleukin-2 in einer Phase-I-Studie an Patienten mit malignem Melanom oder Nierenzellkarzinom getestet [166]. Der Hintergrund dieser Studie ist, dass es durch DNA-Methylierungen zu einer Hemmung von Onkogenen kommt. Zudem kann dies zu Defekten in der Antigenpräsentation sowie zu Apoptose führen [166]. Chen H. et al. haben durch Versuche mit Aza in Melanomzellen gezeigt, dass eine Hypermethylierung des Promotors der Glutathion-Peroxidase 3 (GPX3), ein möglicher Tumorsuppressor, eine Rolle bei der Melanomentwicklung spielt [167].

In dieser Arbeit wurde eine deutliche Induktion von Brn3a, vor allem in Melanozyten, durch die pan-HDAC-Inhibitoren (TSA, NaB) beobachtet. Aufgrund dieser eindeutigen Unterschiede zwischen unbehandelten und behandelten Melanozyten und Melanomzellen ist von einer Beteiligung der Acetylierung an der Genregulation von Brn3a auszugehen. Vor allem die nach 210 min festgestellte, relativ zeitnahe Hochregulation von Brn3a weisen auf direkte Effekte durch die Deacetylierung der Histone am Genlokus von Brn3a hin. Indirekte Effekte über weitere Transkriptionsfaktoren, welche an die Promotorregion von Brn3a binden, würden eine wesentlich längere Zeitdauer in Anspruch nehmen. Dass diese Effekte ausschließlich für Brn3a gezeigt werden konnten, nicht aber für weitere neuronale Transkriptionsfaktoren, wie MITF oder SOX10, bekräftigt die Hypothese der epigenetischen Regulation vorrangig von Brn3a.

Der pharmakologische Einfluss von HDACi auf die HDAC-Aktivität und infolgedessen auf die Genexpression im Melanom übt verschiedene Effekte, wie aberrante Genexpression, Differenzierung, Zellüberleben, Zellzyklusarrest und Apoptose aus [165, 168]. Die Funktionen von HDACs und HATs (Histonacetyltransferasen) sind häufig in Tumorzellen dereguliert, was zu einer veränderten Gen-Transkription führt [165]. Das Potential von HDACi als mögliche therapeutische Agenzien konnte bereits in *in vivo* Modellen, wie beispielsweise humanen Melanom-Xenograft-Maus-Modellen und in klinischen Studien gezeigt werden. In den Studien wurden HDACi, wie SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid, Vorinostat), TSA oder Depsipeptid eingesetzt [165, 169-171]. Beispielsweise ist HDAC4 in der Lage, die Expression von mda-7/IL-24 (Melanoma differentiation-associated gene/interleukin-24) zu unterdrücken. Was aber durch den Einsatz des HDACi TSA wieder rückgängig gemacht werden kann [172].

Die Ergebnisse der Behandlung der Zellen mit Isotypen-selektiven HDACi wie Mocetinostat und PCI-34051 wiesen darauf hin, dass eine oder mehrere von Mocetinostat inhibierte HDACs, HDAC1, 2, 3 und/oder 11, eine mögliche Rolle in der Brn3a-Expression spielen könnten. Diese Ergebnisse ließen auch folgern, dass die von PCI-34051 inhibierten HDAC1, 8, 6 und 10 für die epigenetische Regulation von Brn3a eher nicht relevant sind. Beide HDACi, Mocetinostat und PCI-34051, wurden bisher nicht experimentell im Melanom getestet. Mocetinostat ist in der Lage, bereits bei niedrigen mikromolaren Konzentrationen Zellzyklusarrest und Apoptose in humanen Krebszellen auszulösen, jedoch nicht in normalen humanen Zellen. Hauptsächlich wurde die Wirkung von Mocetinostat in hämatologischen und lymphoproliferativen Erkrankungen beschrieben [173, 174]. PCI-34051, ein Hydroxamat-Derivat, ist in der Lage, Apoptose ausschließlich in Zelllinien aus T-Zell-Lymphomen oder Leukämien auszulösen [175]. Der Vorteil von Isotypen-selektiven HDACi ist die Vermeidung von unspezifischer Toxizität und die zielgenaue Wirkweise [176].

Um zusätzliche Belege für direkte Effekte der epigenetischen Genregulation von Brn3a zu generieren, wurden die Effekte von HDACi auf potentielle Zielgene untersucht. Für zwei der vier getesteten Gene (NTN4 und Wnt5A) konnten simultane Veränderungen der Expression zu Brn3a festgestellt werden. Das Gen Timeless zeigte eine im Vergleich zu Brn3a inverse Expression in Folge der HDAC-Inhibition. Die Änderung der Expression dieser Gene gibt weitere Hinweise auf direkte epigenetische Effekte in der Brn3a-Gen-Expression.

Mit diesen Ergebnissen wird die Rolle der HDACs in der Expression von Brn3a als epigenetische Regulatoren bestätigt. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die verantwortlichen HDACs Histone am Genlokus von Brn3a deacetylieren. Indirekte Effekte durch Deacetylierung von Brn3a-regulierenden Nicht-Histon-Proteinen (Enzyme, Transkriptionsfaktoren) sind aufgrund der schnellen Brn3a-Induktion zu vernachlässigen.

4.3 HDAC2-Enzymaktivität

Die Intention für die Verwendung des HDAC2-Glo™ Assays war, einen Unterschied in der Enzymaktivität von HDAC2 in Melanomzellen und Melanozyten festzustellen. Jedoch war es aufgrund der unterschiedlichen Wachstumsgeschwindigkeiten der verschiedenen Zellen und dadurch der fehlenden Möglichkeit einer internen Normierung nicht möglich, eine gleiche Anzahl an Zellen in den Wells zu vergleichen. Die unterschiedlichen Behandlungen der einzelnen Zelllinien führten hingegen zu deutlichen Ergebnissen. Es stellte sich eine unterschiedliche Stärke der Wirksamkeit der zwei verschiedenen HDACi TSA und NaB heraus. In der Verwendung von HDACi spielen Kriterien wie Effektivität und Selektivität eine große Rolle [177]. HDACi als Therapeutika müssen aufgrund von Off-target-Effekten, also

ungerichtete Wirkungen gegenüber anderen Genen oder Proteinen als das beabsichtigte Ziel, viele Qualitätstests durchlaufen [178, 179]. Ein solcher Test, wie der HDAC2-Glo™, ist in der Lage, die Spezifität eines Inhibitors gegenüber dem HDAC2-Enzym aufzuzeigen.

4.4 HDAC-Expressionsanalysen in melanozytären Zellen

In dieser Arbeit konnte eine inverse Korrelation zwischen der Brn3a-mRNA-Expression und der Expression von HDAC2, 4, 9 und 11 gezeigt werden. Beispielsweise korrelierte vornehmlich in Melanozyten eine hohe HDAC-Expression mit einer niedrigen Brn3a-Expression. Umgekehrt ging in Melanomzellen eine niedrige HDAC-Expression mit einer hohen Brn3a-Expression einher. Eine hohe HDAC-Expression in Kombination mit einer niedrigen Brn3a-Expression könnte bedeuten, dass diese HDACs eine Rolle in der Expression von Brn3a spielen. Für HDAC2 konnte die erhöhte Expression in Melanozyten gegenüber Melanomzellen ebenfalls auf Proteinebene bestätigt werden. Die Proteinbiosynthese des HDAC2-Proteins ausschließlich im Nukleus und nicht im Zytoplasma der Zellen wird in der Literatur beschrieben und wurde auch in dieser Arbeit nachgewiesen (Abbildung 30) [146]. Die Detektion des HDAC11-Proteins im Zytoplasma und im Nukleus der Zellen könnte darauf hinweisen, dass HDAC11 an Enzymaktivitäten an Nicht-Histon-Proteinen im Zytoplasma beteiligt sein könnte (siehe auch Tabelle 2) [146, 153].

HDACs sind in der Lage, die Acetylgruppen auf den Lysinresten der Histone am Genlokus von Brn3a zu entfernen. In diesem Fall würde es zu einer verringerten Zugänglichkeit an die Promotorregion von Brn3a kommen und in Folge dessen zu einer geringeren Brn3a-Expression.

Die Limitation der Analyse der HDAC-Expressionsmenge ist, dass die Proteinbiosynthese nicht proportional zur Enzymaktivität ist. Eine Aussage darüber zu treffen, mit welcher Rate die untersuchten HDACs Acetylgruppen entfernen, ist folglich nicht möglich.

Um die Kausalität besser zu belegen, wäre die Chromatin-Immunpräzipitation eine sehr geeignete Methode. Hier wird die Acetylierung der Histone an bestimmten Promotorregionen in aktiv zugänglichem Chromatin nachgewiesen. In dieser Arbeit wurden die Proben mit Formaldehyd fixiert, in einzelne Fragmente zerlegt und mithilfe eines spezifischen Antikörpers gegen Brn3a die gesuchten Fragmente gebunden. Die Quantifizierung erfolgte anschließend mittels qRT-PCR mithilfe passender Primer für die Promotorregion (siehe auch Material und Methoden 2.2.6 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)). Die technische Durchführung dieser Experimente gelang trotz mehrerer Modifikationen, Wiederholungen und Optimierungen im Rahmen dieser Arbeit nicht.

4.5 HDAC-Hemmung durch spezifische siRNAs

Mithilfe selektiver Hemmung einzelner Histondeacetylasen durch siRNA-Transfektion sollte deren Rolle in der Brn3a-Expression untersucht werden. Da die Behandlung von Melanomzellen und Melanozyten mit siHDAC2 zu einer Induktion von Brn3a führte, wies dies auf eine Rolle von HDAC2 in der Brn3a-Expression hin. Vermutlich wird Brn3a durch die Deacetylierung der Histone am Genlokus durch HDAC2 reguliert. Lediglich in Hermes1-Melanozyten führte außerdem die Hemmung von HDAC11 zu einer Induktion von Brn3a. Keine Effekte konnten hingegen nach Inhibition von HDAC1 und 3 beobachtet werden.

Die Inhibition der HDAC-Aktivität könnte als Monotherapie, aber auch in Kombination mit anderen Agenzien ein vielversprechender Therapieansatz in der Krebsbehandlung sein [180]. Allerdings ist die Verwendung von pan-HDACi mit einem breiten Wirkungsspektrum und somit einer hohen Toxizität verbunden. HDACi führt zu einer Verringerung der Proteinbiosynthese zellulärer Proteine um bis zu 10%, was zu globalen Effekten im Organismus führen kann [181]. Ein möglicher Lösungsansatz wären selektive Inhibitoren, die spezifisch einzelne Mitglieder der HDAC-Familien blockieren [180]. Durch Depletionsstudien zeigten Deubzer et al., dass HDAC11 eine wichtige Rolle in der Kontrolle von Proliferation und Überlebenssignalwegen in Krebszellen spielt. Normale Zellen wurden durch die Depletion nicht beeinflusst. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das gezielte Ausschalten von einzelnen HDAC-Enzymen eine interessante Therapieform darstellen könnte. Ein großes Problem für die Therapie mittels HDACi könnten allerdings auftretende kompensatorische Induktionen anderer HDACs darstellen. Ritter et al. sowie Sleiman et al. beschreiben die Gegenregulation von HDACs bei Inhibition einzelner HDACs [182, 183]. Dies würde eine Umleitung der HDAC-Funktion zur Folge haben und die eingesetzten spezifischen HDACi unwirksam machen.

HDACs können auch als Substrat Nicht-Histon-Proteine, wie Transkriptionsfaktoren oder Enzyme haben [145]. Es ist beispielsweise bekannt, dass der Tumorsuppressor p53 durch HDAC1 direkt deacetyliert werden kann [184, 185]. Eine Untereinheit von NF- κ B, p65, kann durch HDAC3 deacetyliert werden, was dazu führt, dass NF- κ B aus dem Nukleus transportiert wird [186]. Diese Art der Regulation durch Deacetylierung kann Einfluss auf Apoptose, Differenzierung, Entzündung und Stoffwechsel haben [184].

Die Hemmung von HDAC2 in Melanomzellen hatte keine Änderung der Expression verschiedener anderer Transkriptionsfaktoren wie Brn2, SOX9 und MITF zur Folge. Der Einfluss von HDAC2 beschränkt sich nach diesen Ergebnissen also auf Brn3a.

4.6 Überexpression von HDAC2 in Melanomzellen

Das HDAC2-Gen wurde in einen Plasmidvektor kloniert und im Anschluss in Melanomzellen und Melanozyten transfiziert, sodass es zu einer Überexpression von HDAC2 in den behandelten Zellen kam. Auf mRNA-Ebene konnte die Überexpression von HDAC2 deutlich gezeigt werden. Auf Proteinebene war eine vermehrte Proteinbiosynthese nicht belegbar. Es gab aufgrund der Schnittstellen der Restriktionsenzyme in der Klonierungsphase keinen passenden Antikörper, welcher nicht an die durch Restriktionsenzyme abgeschnittenen Sequenzen von HDAC2 gebunden hätte (siehe Abbildung 41). Alle kommerziell erhältlichen HDAC2-Antikörper binden C'-terminal an die Proteinsequenz von HDAC2, jedoch ist diese Sequenz in dem klonierten HDAC2-Gen nicht vorhanden. Somit konnte durch den verwendeten Antikörper lediglich das basale, natürlich in den Zellen vorkommende HDAC2 im Immunoblot gezeigt werden. Dennoch konnte im Western-Blot eine Reduktion der Brn3a-Proteinmenge in den Melanomzellen WM9, WM793, 1205Lu und WM239A deutlich gezeigt werden.

N'- maysqgggkkkvcyyddgignyyygqghpmkphirmthnllnyglyrkmeiyphkataeemtkyhsdeyikflrsirpdmseysk
qmqrfnvgedcpvfdglfqcqstggsvagavklnrqtdmavnwagglhhakkseasgfcyvndivlaillellkyhqrlyididihhgdv
eeafyttdrvmtvsfhkygeyfpgtgdldrdigagkgkyyavnfpmrdgiddesyggifkpiiskvmemyqpsavvlqcgadslsgdrlgcfnl
tvkghakcvevktfnlpllmgggytirvarcwtyetavaldeipnelpyndyfevfgpdfklhispsnmtngntpeymekikqrlfenl
rmiphappgvqmaipedavhedsgdedgedpdkrisirasdkriacdeefsdsedegeggrnvadhkkgakkarieedkketedkktd
 vkeedkskdnsgekttdtkgtkseqsnp -C'

Abbildung 41: Humane Proteinsequenz HDAC2 mit N'- und C'-terminalem Ende. Der unterstrichene Bereich wurde in die Zellen kloniert. C'-terminal sind die Bindestellen für HDAC2-Antikörper. Die Proteinsequenz stammt aus der NCBI-Datenbank.

Für 1205Lu-Melanomzellen konnte eine deutliche Herabregulierung von Brn3a durch HDAC2 beobachtet werden, jedoch war dieses Ergebnis nicht signifikant. Für Melanozyten konnte dies, wie erwartet, nicht gezeigt werden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass HDAC2 eine mögliche Funktion in der Brn3a-Expression und/oder Regulation innehat. Folglich bleibt die Hypothese der Regulation von Brn3a durch HDAC2 erhalten, konnte jedoch in dieser Arbeit nicht bewiesen werden.

4.7 Promotoraktivität des Brn3a-Gens

Es gibt Hinweise darauf, dass zusätzlich zur epigenetischen Regulation von Brn3a ein Melanozyten-spezifischer Transkriptionsfaktor die Expression von Brn3a beeinflusst. Beispielsweise konnte in Vorarbeiten gezeigt werden, dass Brn3a ausschließlich in

melanozytären Zellen, nicht aber in anderen Hautzellen (Fibroblasten, Keratinozyten) exprimiert wird [93].

Um einen aktiven Promotorbereich von Brn3a zu identifizieren, wurden Promotorstudien in Melanomzellen durchgeführt. Die Untersuchungen von *cis*-regulatorischen Elementen brachten einen 200 Bp langen Bereich in der Promotorregion proximal des Brn3a-Gens hervor. Die identifizierten *cis*-regulatorischen Elemente bedeuten eine mögliche Regulation ausgehend von diesen Abschnitten, beispielsweise über die Bindung von Transkriptionsfaktoren. Wohingegen *trans*-regulatorische Effekte eine indirekte Regulation von Brn3a über epigenetische Modifikationen anderer Transkriptionsfaktoren beschreiben würde. Brn3a wäre im Fall *trans*-regulatorischer Regulation ein Zielgen eines epigenetisch regulierten Transkriptionsfaktors. Der lokalisierte 200 Bp lange Bereich wies eine erhöhte transkriptionelle Aktivität auf. Transkriptionsfaktoren, welche an diese regulatorischen Promotorelemente binden können, sind in der Lage die Expression von Brn3a zu beeinflussen. Dieser aktive Bereich muss im Folgenden noch weiter charakterisiert und auf mögliche Bindestellen für Transkriptionsfaktoren, die in der Neuralleistenentwicklung wichtig sind, untersucht werden. Allerdings zeigt das bisher längste Promotorkonstrukt auch die höchste Aktivität. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass noch weitere regulative DNA-Abschnitte distal von diesem Bereich lokalisiert sind. Daher ist in weiteren Experimenten geplant, den Promotorbereich bis 5.000 Bp weiter aufwärts des Brn3a-Gens in denselben Luziferase-Vektor einzuklonieren, der bisher verwendet wurde (pGI4.10_luc), und die Luziferase-Experimente auch mit diesen Konstrukten durchzuführen.

4.8 Ausblick

In Melanozyten und Melanomzellen induzierte die Behandlung mit TSA eine hohe und zeitnahe Expression von Brn3a. Die Arbeiten haben gezeigt, dass diese Induktion schon nach 210 min deutlich ist und bis 300 min zu einem Maximalwert ansteigt. Unklar ist jedoch, ob die TSA-induzierten Veränderungen der Chromatin-Zugänglichkeit die Brn3a-Expression über sogenannte *cis*- oder *trans*-Effekte steuern. Im Grunde konnte bisher nicht nachgewiesen werden, ob es sich tatsächlich um direkte Effekte der HDACs handelt oder ob Brn3a indirekt über weitere Transkriptionsfaktoren oder Enzyme reguliert wird.

Um die bisher erlangten Ergebnisse weiter zu stützen, wären weitere Studien an verschiedenen anderen Zelllinien sinnvoll. Darüber hinaus wären Überexpressionstudien mit HDAC11 ein weiterer Schritt.

Schließlich ist die Rolle der Acetylierung von Histonen am Genlokus von Brn3a interessant und könnte mittels CHIP-Experimenten untersucht werden [183]. Durch diese Studien könnte die Rolle der epigenetischen Regulation von Brn3a durch Acetylierung aufgedeckt werden.

5 Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist ein in den letzten Jahrzehnten zunehmend häufiger vorkommender Hauttumor, der bereits frühzeitig Metastasen ausbilden kann. Maligne Melanome entstehen aus Melanozyten, welche sich in der Embryogenese aus Vorläuferzellen aus dem Neuroektoderm entwickeln. Während dieser Entwicklung spielen zahlreiche Transkriptionsfaktoren, die Proliferation, Überleben, Migration und Differenzierung regulieren, eine Rolle. Viele dieser Prozesse in der Melanozyten-Entstehung ähneln malignen Eigenschaften von Melanomzellen.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass der embryonale Transkriptionsfaktor Brn3a eine essentielle Rolle für das Überleben von Melanomzellen spielt. Durch relative Quantifizierung mittels qPCR und Western-Blot-Analysen konnte sowohl in Vorarbeiten und auch in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Brn3a vermehrt in Melanomzellen, nicht aber oder nur in geringem Maße in normalen Zellen der Haut exprimiert wird.

Eine erhöhte Expression von Brn3a wurde in dieser Arbeit auch in Kinase-Inhibitor-resistenten Melanomzellen gefunden. Dies könnte auf eine Funktion von Brn3a in der Resistenzbildung gegenüber Melanomtherapeutika hindeuten.

Hauptziel dieser Arbeit war die Untersuchung einer möglichen epigenetischen Regulation von Brn3a in melanozytären Zellen.

Unter Verwendung des DNA-Demethylierungsmittels Aza (5-Aza-2'-deoxycytidin) konnte keine Veränderung der Brn3a-Expression gezeigt werden, so dass eine Regulation durch Demethylierung unwahrscheinlich erschien. Daher wurden im Folgenden vornehmlich Acetylierungsprozesse untersucht. HDACs (Histondeacetylasen) sind in der Lage, die Genexpression zu regulieren. Eine Dysbalance der Enzymaktivitäten von HDACs und HATs (Histonacetyltransferasen) kann zu aberranter Genexpression und somit zur Bildung von Tumoren führen.

Durch die Verwendung von pan-HDACi (Histondeacetylase-Inhibitoren) konnte eine starke und schnelle Induktion von Brn3a vor allem in Melanozyten und Melanomzellen gezeigt werden. Dadurch konnte eine epigenetische Regulation von Brn3a durch Acetylierung dargestellt werden.

Um die für die Brn3a-Expression entscheidend regulierenden HDACi zu identifizieren, wurden die spezifischen HDACi Mocetinostat (MGCD0103) und PCI-34051 für die weiteren Versuche verwendet. Dabei war besonders Mocetinostat wirkungsvoll, der HDAC1, 2, 3 und 11 hemmt. In weiteren mRNA-Expressionsanalysen korrelierte die Expression von HDAC2, 4, 9 und 11 invers mit der Expression von Brn3a. Durch die Zusammenführung dieser

Ergebnisse waren HDAC2 und HDAC11 die wahrscheinlichsten Kandidaten als spezifische Regulatoren der Brn3a-Expression.

Um epigenetische Regulationsmechanismen in der Expression von Brn3a zu bestätigen wurde die Expression potentieller Zielgene von Brn3a nach Behandlung der Zellen mit HDACi analysiert. Die daraufhin ebenfalls veränderten Expressions-Ergebnisse gaben zusätzliche Rückschlüsse auf eine epigenetische Regulation von Brn3a.

Inhibitionsexperimente mit spezifisch designten siRNAs (small interfering RNAs) gegen HDAC1, 2, 3 und 11 und Überexpressionsexperimente mit HDAC2 wiesen über eine inverse Korrelation auf eine Rolle von HDAC2 in der epigenetischen Regulation von Brn3a hin. Zusätzlich wurde die HDAC2-Enzymaktivität mithilfe des spezifischen HDAC2-Glo™-Assays untersucht. Hiermit konnte die effektive HDAC2-Inhibition bestätigt werden.

Schließlich wurde der proximale Promotorbereich von Brn3a trunkiert, um aktive Bereiche für die transkriptionelle Regulation von Brn3a zu identifizieren. Hier wurde ein 200 Bp (Basenpaar) langes Konstrukt identifiziert, welches zu einer erhöhten Gen-Aktivität von Brn3a in diesem Assay führte. An diesen Bereich können Transkriptionsfaktoren binden, welche Regulatoren für Brn3a sein können.

Aufgrund der in dieser Arbeit gefundenen, sehr wahrscheinlichen Rolle von HDAC2 in der Regulation von Brn3a könnte ein neuer Therapieansatz beim Melanom Anwendung finden. Da Brn3a in Melanomzellen essentiell für das Überleben ist, könnte eine spezifische Regulation von HDAC2 in Melanomzellen ein interessantes therapeutisches Target darstellen.

Literaturverzeichnis

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
3. Vincent J. Hearing, S.P.L.L., *From Melanocytes to Melanoma*, in *The progression to malignancy*, S.P.L.L. Vincent J. Hearing, Editor. 2006, Humana Press, Totowa New Jersey. p. 672.
4. Garbe, C. and A. Blum, *Epidemiology of cutaneous melanoma in Germany and worldwide*. Skin Pharmacol Appl Skin Physiol, 2001. **14**(5): p. 280-90.
5. Crane, J.F. and P.A. Trainor, *Neural crest stem and progenitor cells*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 267-86.
6. Bosserhoff, A.K., *Melanoma Development - Molecular Biology, Genetics and Clinical Application*. 2011: Springer-Verlag Wien. 376.
7. Mort, R.L., I.J. Jackson, and E.E. Patton, *The melanocyte lineage in development and disease*. Development, 2015. **142**(4): p. 620-32.
8. 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.
9. Miller, A.J. and M.C. Mihm, Jr., *Melanoma*. N Engl J Med, 2006. **355**(1): p. 51-65.
10. Davies, M.A. and Y. Samuels, *Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma*. Oncogene, 2010. **29**(41): p. 5545-55.
11. Munoz-Couselo, E., et al., *Recent advances in the treatment of melanoma with BRAF and MEK inhibitors*. Ann Transl Med, 2015. **3**(15): p. 207.
12. Kumar, R., et al., *BRAF mutations are common somatic events in melanocytic nevi*. J Invest Dermatol, 2004. **122**(2): p. 342-8.
13. Millington, G.W., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*, by Davies et al. (*Nature* 2002; 417: 949-54). Clin Exp Dermatol, 2013. **38**(2): p. 222-3.
14. 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.
15. Carlino, M.S., et al., *Correlation of BRAF and NRAS mutation status with outcome, site of distant metastasis and response to chemotherapy in metastatic melanoma*. Br J Cancer, 2014. **111**(2): p. 292-9.
16. 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.

17. Bastian, B.C., *The molecular pathology of melanoma: an integrated taxonomy of melanocytic neoplasia*. *Annu Rev Pathol*, 2014. **9**: p. 239-71.
18. Li, G., et al., *Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development*. *Oncogene*, 2001. **20**(56): p. 8125-35.
19. Mancianti, M.L. and M. Herlyn, *Tumor progression in melanoma: the biology of epidermal melanocytes in vitro*. *Carcinog Compr Surv*, 1989. **11**: p. 369-86.
20. Shain, A.H. and B.C. Bastian, *From melanocytes to melanomas*. *Nat Rev Cancer*, 2016. **16**(6): p. 345-58.
21. Vennepureddy, A., et al., *Novel Drugs and Combination Therapies for the Treatment of Metastatic Melanoma*. *J Clin Med Res*, 2016. **8**(2): p. 63-75.
22. Shtivelman, E., et al., *Pathways and therapeutic targets in melanoma*. *Oncotarget*, 2014. **5**(7): p. 1701-52.
23. de Souza, C.F., A.S. Morais, and M.G. Jasiulionis, *Biomarkers as key contributors in treating malignant melanoma metastases*. *Dermatol Res Pract*, 2012. **2012**: p. 156068.
24. Wong, D.J. and A. Ribas, *Targeted Therapy for Melanoma*. *Cancer Treat Res*, 2016. **167**: p. 251-62.
25. Marzuka, A., et al., *Melanoma Treatments: Advances and Mechanisms*. *J Cell Physiol*, 2015. **230**(11): p. 2626-33.
26. Heppt, M.V., et al., *Combination therapy of melanoma using kinase inhibitors*. *Curr Opin Oncol*, 2015. **27**(2): p. 134-40.
27. Jubb, A.M., et al., *Impact of MET expression on outcome in BRAF(V600E/K) advanced melanoma*. *Histopathology*, 2013. **63**(3): p. 351-61.
28. Nazarian, R., et al., *Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation*. *Nature*, 2010. **468**(7326): p. 973-7.
29. Poulikakos, P.I., et al., *RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E)*. *Nature*, 2011. **480**(7377): p. 387-90.
30. Shi, H., et al., *Melanoma whole-exome sequencing identifies (V600E)B-RAF amplification-mediated acquired B-RAF inhibitor resistance*. *Nat Commun*, 2012. **3**: p. 724.
31. Johannessen, C.M., et al., *COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation*. *Nature*, 2010. **468**(7326): p. 968-72.
32. Villanueva, J., et al., *Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K*. *Cancer Cell*, 2010. **18**(6): p. 683-95.
33. Shi, H., et al., *Combinatorial treatments that overcome PDGFRbeta-driven resistance of melanoma cells to V600EB-RAF inhibition*. *Cancer Res*, 2011. **71**(15): p. 5067-74.
34. Flaherty, K.T., et al., *Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma*. *N Engl J Med*, 2010. **363**(9): p. 809-19.

35. Falchook, G.S., et al., *Dabrafenib in patients with melanoma, untreated brain metastases, and other solid tumours: a phase 1 dose-escalation trial*. *Lancet*, 2012. **379**(9829): p. 1893-901.
36. Long, G.V., et al., *Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(20): p. 1877-88.
37. Tarhini, A.A., H. Gogas, and J.M. Kirkwood, *IFN-alpha in the treatment of melanoma*. *J Immunol*, 2012. **189**(8): p. 3789-93.
38. Bottoni, U., et al., *Melanoma and IFN alpha: potential adjuvant therapy*. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2014. **28**(2): p. 271-9.
39. Hauschild, A., *Adjuvant interferon alfa for melanoma: new evidence-based treatment recommendations?* *Curr Oncol*, 2009. **16**(3): p. 3-6.
40. Callahan, M.K., *Immune Checkpoint Therapy in Melanoma*. *Cancer J*, 2016. **22**(2): p. 73-80.
41. Camacho, L.H., *Novel therapies targeting the immune system: CTLA4 blockade with tremelimumab (CP-675,206), a fully human monoclonal antibody*. *Expert Opin Investig Drugs*, 2008. **17**(3): p. 371-85.
42. Heppt, M.V., et al., *Immune checkpoint blockade with concurrent electrochemotherapy in advanced melanoma: a retrospective multicenter analysis*. *Cancer Immunol Immunother*, 2016. **65**(8): p. 951-9.
43. Ancuceanu, R. and M. Neagu, *Immune based therapy for melanoma*. *Indian J Med Res*, 2016. **143**(2): p. 135-44.
44. Long, G.V., et al., *Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma: a multicentre, double-blind, phase 3 randomised controlled trial*. *Lancet*, 2015. **386**(9992): p. 444-51.
45. Reddy, S.M., A. Reuben, and J.A. Wargo, *Influences of BRAF Inhibitors on the Immune Microenvironment and the Rationale for Combined Molecular and Immune Targeted Therapy*. *Curr Oncol Rep*, 2016. **18**(7): p. 42.
46. Prieto, P.A., et al., *Targeted Therapies Combined With Immune Checkpoint Therapy*. *Cancer J*, 2016. **22**(2): p. 138-46.
47. Knecht, A.K. and M. Bronner-Fraser, *Induction of the neural crest: a multigene process*. *Nat Rev Genet*, 2002. **3**(6): p. 453-61.
48. Ernfors, P., *Cellular origin and developmental mechanisms during the formation of skin melanocytes*. *Exp Cell Res*, 2010. **316**(8): p. 1397-407.
49. Henion, P.D. and J.A. Weston, *Timing and pattern of cell fate restrictions in the neural crest lineage*. *Development*, 1997. **124**(21): p. 4351-9.
50. Mull, A.N., A. Zolekar, and Y.C. Wang, *Understanding Melanocyte Stem Cells for Disease Modeling and Regenerative Medicine Applications*. *Int J Mol Sci*, 2015. **16**(12): p. 30458-69.
51. Gammill, L.S. and M. Bronner-Fraser, *Genomic analysis of neural crest induction*. *Development*, 2002. **129**(24): p. 5731-41.

52. Segal, N.H., et al., *Classification of clear-cell sarcoma as a subtype of melanoma by genomic profiling*. J Clin Oncol, 2003. **21**(9): p. 1775-81.
53. Besch, R. and C. Berking, *POU transcription factors in melanocytes and melanoma*. Eur J Cell Biol, 2014. **93**(1-2): p. 55-60.
54. Phillips, K. and B. Luisi, *The virtuoso of versatility: POU proteins that flex to fit*. J Mol Biol, 2000. **302**(5): p. 1023-39.
55. 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.
56. Carreira, S., et al., *Mitf cooperates with Rb1 and activates p21Cip1 expression to regulate cell cycle progression*. Nature, 2005. **433**(7027): p. 764-9.
57. Cook, A.L. and R.A. Sturm, *POU domain transcription factors: BRN2 as a regulator of melanocytic growth and tumorigenesis*. Pigment Cell Melanoma Res, 2008. **21**(6): p. 611-26.
58. Goodall, J., et al., *Brn-2 represses microphthalmia-associated transcription factor expression and marks a distinct subpopulation of microphthalmia-associated transcription factor-negative melanoma cells*. Cancer Res, 2008. **68**(19): p. 7788-94.
59. 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.
60. Herr, W. and M.A. Cleary, *The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain*. Genes Dev, 1995. **9**(14): p. 1679-93.
61. 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.
62. Rosenfeld, M.G., *POU-domain transcription factors: pou-er-ful developmental regulators*. Genes Dev, 1991. **5**(6): p. 897-907.
63. 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.
64. Ring, C.J. and D.S. Latchman, *The human Brn-3b POU transcription factor shows only limited homology to the Brn-3a/RDC-1 factor outside the conserved POU domain*. Nucleic Acids Res, 1993. **21**(12): p. 2946.
65. Weishaupt, J.H., N. Klocker, and M. Bahr, *Axotomy-induced early down-regulation of POU-IV class transcription factors Brn-3a and Brn-3b in retinal ganglion cells*. J Mol Neurosci, 2005. **26**(1): p. 17-25.
66. Sajgo, S., et al., *Dynamic expression of transcription factor Brn3b during mouse cranial nerve development*. J Comp Neurol, 2016. **524**(5): p. 1033-61.
67. 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.
68. Rhee, J.M., et al., *Highly cooperative homodimerization is a conserved property of neural POU proteins*. J Biol Chem, 1998. **273**(51): p. 34196-205.

69. Trieu, M., et al., *Direct autoregulation and gene dosage compensation by POU-domain transcription factor Brn3a*. Development, 2003. **130**(1): p. 111-21.
70. 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.
71. Wood, J.N., et al., *Novel cell lines display properties of nociceptive sensory neurons*. Proc Biol Sci, 1990. **241**(1302): p. 187-94.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. Vahava, O., et al., *Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans*. Science, 1998. **279**(5358): p. 1950-4.
76. 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.
77. 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.
78. 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.
79. 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.
80. 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.
81. Erkman, L., et al., *A POU domain transcription factor-dependent program regulates axon pathfinding in the vertebrate visual system*. Neuron, 2000. **28**(3): p. 779-92.
82. 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.
83. Lanier, J., et al., *Brn3a regulates the transition from neurogenesis to terminal differentiation and represses non-neural gene expression in the trigeminal ganglion*. Dev Dyn, 2009. **238**(12): p. 3065-79.
84. 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.
85. 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.

86. 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.
87. 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.
88. 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.
89. 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.
90. 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.
91. 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.
92. Zou, M., et al., *Brn3a/Pou4f1 regulates dorsal root ganglion sensory neuron specification and axonal projection into the spinal cord*. Dev Biol, 2012. **364**(2): p. 114-27.
93. Hohenauer, T., et al., *The neural crest transcription factor Brn3a is expressed in melanoma and required for cell cycle progression and survival*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(6): p. 919-34.
94. Lanier, J., et al., *Brn3a target gene recognition in embryonic sensory neurons*. Dev Biol, 2007. **302**(2): p. 703-16.
95. Eng, S.R., et al., *Coordinated regulation of gene expression by Brn3a in developing sensory ganglia*. Development, 2004. **131**(16): p. 3859-70.
96. Francis, N.J. and R.E. Kingston, *Mechanisms of transcriptional memory*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(6): p. 409-21.
97. 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.
98. 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.
99. 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.
100. Gascoyne, D.M., et al., *EWS/ETS proteins promote expression and regulate function of the homeodomain transcription factor BRN3A*. Oncogene, 2010. **29**(21): p. 3134-45.
101. Das Purkayastha, B.P. and J.K. Roy, *Molecular analysis of oncogenicity of the transcription factor, BRN3A, in cervical cancer cells*. J Cancer Res Clin Oncol, 2011. **137**(12): p. 1859-67.

102. Nakai, S., et al., *The POU domain transcription factor Brn-2 is required for the determination of specific neuronal lineages in the hypothalamus of the mouse*. Genes Dev, 1995. **9**(24): p. 3109-21.
103. Schonemann, M.D., et al., *Development and survival of the endocrine hypothalamus and posterior pituitary gland requires the neuronal POU domain factor Brn-2*. Genes Dev, 1995. **9**(24): p. 3122-35.
104. Cook, A.L., et al., *Human melanoblasts in culture: expression of BRN2 and synergistic regulation by fibroblast growth factor-2, stem cell factor, and endothelin-3*. J Invest Dermatol, 2003. **121**(5): p. 1150-9.
105. Flammiger, A., et al., *SOX9 and SOX10 but not BRN2 are required for nestin expression in human melanoma cells*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(4): p. 945-53.
106. Harris, M.L., et al., *Sox proteins in melanocyte development and melanoma*. Pigment Cell Melanoma Res, 2010. **23**(4): p. 496-513.
107. Kiefer, J.C., *Back to basics: Sox genes*. Dev Dyn, 2007. **236**(8): p. 2356-66.
108. Wegner, M., *All purpose Sox: The many roles of Sox proteins in gene expression*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(3): p. 381-90.
109. Cook, A.L., et al., *Co-expression of SOX9 and SOX10 during melanocytic differentiation in vitro*. Exp Cell Res, 2005. **308**(1): p. 222-35.
110. Graf, S.A., et al., *SOX10 promotes melanoma cell invasion by regulating melanoma inhibitory activity*. J Invest Dermatol, 2014. **134**(8): p. 2212-20.
111. Bakos, R.M., et al., *Nestin and SOX9 and SOX10 transcription factors are coexpressed in melanoma*. Exp Dermatol, 2010. **19**(8): p. e89-94.
112. Widlund, H.R., et al., *Beta-catenin-induced melanoma growth requires the downstream target Microphthalmia-associated transcription factor*. J Cell Biol, 2002. **158**(6): p. 1079-87.
113. Vance, K.W. and C.R. Goding, *The transcription network regulating melanocyte development and melanoma*. Pigment Cell Res, 2004. **17**(4): p. 318-25.
114. Vachtenheim, J. and L. Ondrusova, *Microphthalmia-associated transcription factor expression levels in melanoma cells contribute to cell invasion and proliferation*. Exp Dermatol, 2015. **24**(7): p. 481-4.
115. Wellbrock, C. and I. Arozarena, *Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy*. Pigment Cell Melanoma Res, 2015. **28**(4): p. 390-406.
116. King, R., et al., *Microphthalmia transcription factor expression in cutaneous benign, malignant melanocytic, and nonmelanocytic tumors*. Am J Surg Pathol, 2001. **25**(1): p. 51-7.
117. Park, H.Y., et al., *Cellular mechanisms regulating human melanogenesis*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(9): p. 1493-506.
118. Hartman, M.L. and M. Czyz, *MITF in melanoma: mechanisms behind its expression and activity*. Cell Mol Life Sci, 2015. **72**(7): p. 1249-60.

119. Lee, J.J., G.F. Murphy, and C.G. Lian, *Melanoma epigenetics: novel mechanisms, markers, and medicines*. Lab Invest, 2014. **94**(8): p. 822-38.
120. Hsiao, K., H. Zegzouti, and S.A. Goueli, *Methyltransferase-Glo: a universal, bioluminescent and homogenous assay for monitoring all classes of methyltransferases*. Epigenomics, 2016. **8**(3): p. 321-39.
121. Blancafort, P., J. Jin, and S. Frye, *Writing and rewriting the epigenetic code of cancer cells: from engineered proteins to small molecules*. Mol Pharmacol, 2013. **83**(3): p. 563-76.
122. Roadmap Epigenomics, C., et al., *Integrative analysis of 111 reference human epigenomes*. Nature, 2015. **518**(7539): p. 317-330.
123. Cao, J., *The functional role of long non-coding RNAs and epigenetics*. Biol Proced Online, 2014. **16**: p. 11.
124. Connelly, C.F., J. Wakefield, and J.M. Akey, *Evolution and genetic architecture of chromatin accessibility and function in yeast*. PLoS Genet, 2014. **10**(7): p. e1004427.
125. Matouk, C.C. and P.A. Marsden, *Epigenetic regulation of vascular endothelial gene expression*. Circ Res, 2008. **102**(8): p. 873-87.
126. Costa, F.F., *Non-coding RNAs: lost in translation?* Gene, 2007. **386**(1-2): p. 1-10.
127. de Unamuno, B., S. Palanca, and R. Botella, *Update on melanoma epigenetics*. Curr Opin Oncol, 2015. **27**(5): p. 420-6.
128. Schultz, J., et al., *MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth*. Cell Res, 2008. **18**(5): p. 549-57.
129. Schinke, C., et al., *Aberrant DNA methylation in malignant melanoma*. Melanoma Res, 2010. **20**(4): p. 253-65.
130. Bhattacharjee, D., S. Shenoy, and K.L. Bairy, *DNA Methylation and Chromatin Remodeling: The Blueprint of Cancer Epigenetics*. Scientifica (Cairo), 2016. **2016**: p. 6072357.
131. Gallagher, S.J., J.C. Tiffen, and P. Hersey, *Histone Modifications, Modifiers and Readers in Melanoma Resistance to Targeted and Immune Therapy*. Cancers (Basel), 2015. **7**(4): p. 1959-82.
132. Herman, J.G. and S.B. Baylin, *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. N Engl J Med, 2003. **349**(21): p. 2042-54.
133. Howell, P.M., Jr., et al., *Epigenetics in human melanoma*. Cancer Control, 2009. **16**(3): p. 200-18.
134. Christman, J.K., *5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy*. Oncogene, 2002. **21**(35): p. 5483-95.
135. Hoon, D.S., et al., *Profiling epigenetic inactivation of tumor suppressor genes in tumors and plasma from cutaneous melanoma patients*. Oncogene, 2004. **23**(22): p. 4014-22.

136. Xu, X.C., *Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor-beta in cancer*. Cancer Lett, 2007. **253**(1): p. 14-24.
137. Verbeek, B., et al., *O6-Methylguanine-DNA methyltransferase inactivation and chemotherapy*. Br Med Bull, 2008. **85**: p. 17-33.
138. Lian, C.G., et al., *Loss of 5-hydroxymethylcytosine is an epigenetic hallmark of melanoma*. Cell, 2012. **150**(6): p. 1135-46.
139. Thomas, N.E., et al., *DNA methylation profiles in primary cutaneous melanomas are associated with clinically significant pathologic features*. Pigment Cell Melanoma Res, 2014. **27**(6): p. 1097-105.
140. Delcuve, G.P., D.H. Khan, and J.R. Davie, *Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors*. Clin Epigenetics, 2012. **4**(1): p. 5.
141. Pons, D., et al., *Epigenetic histone acetylation modifiers in vascular remodelling: new targets for therapy in cardiovascular disease*. Eur Heart J, 2009. **30**(3): p. 266-77.
142. Micelli, C. and G. Rastelli, *Histone deacetylases: structural determinants of inhibitor selectivity*. Drug Discov Today, 2015. **20**(6): p. 718-735.
143. Hornig, E., et al., *Inhibition of histone deacetylases in melanoma-a perspective from bench to bedside*. Exp Dermatol, 2016. **25**(11): p. 831-838.
144. Weichert, W., *HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies*. Cancer Lett, 2009. **280**(2): p. 168-76.
145. Glozak, M.A., et al., *Acetylation and deacetylation of non-histone proteins*. Gene, 2005. **363**: p. 15-23.
146. Dokmanovic, M., C. Clarke, and P.A. Marks, *Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives*. Mol Cancer Res, 2007. **5**(10): p. 981-9.
147. Jazirehi, A.R. and D. Arle, *Epigenetic regulation of the TRAIL/Apo2L apoptotic pathway by histone deacetylase inhibitors: an attractive approach to bypass melanoma immunotherapy resistance*. Am J Clin Exp Immunol, 2013. **2**(1): p. 55-74.
148. Woods, D.M., et al., *HDAC Inhibition Upregulates PD-1 Ligands in Melanoma and Augments Immunotherapy with PD-1 Blockade*. Cancer Immunol Res, 2015. **3**(12): p. 1375-85.
149. Woods, D.M., et al., *The antimelanoma activity of the histone deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) is mediated by direct tumor cytotoxicity and increased tumor immunogenicity*. Melanoma Res, 2013. **23**(5): p. 341-8.
150. Woan, K.V., et al., *Targeting histone deacetylase 6 mediates a dual anti-melanoma effect: Enhanced antitumor immunity and impaired cell proliferation*. Mol Oncol, 2015. **9**(7): p. 1447-57.
151. Valentini, A., et al., *Valproic acid induces apoptosis, p16INK4A upregulation and sensitization to chemotherapy in human melanoma cells*. Cancer Biol Ther, 2007. **6**(2): p. 185-91.

152. Lisiero, D.N., et al., *The histone deacetylase inhibitor, LBH589, promotes the systemic cytokine and effector responses of adoptively transferred CD8+ T cells*. J Immunother Cancer, 2014. **2**: p. 8.
153. Micelli, C. and G. Rastelli, *Histone deacetylases: structural determinants of inhibitor selectivity*. Drug Discov Today, 2015. **20**(6): p. 718-35.
154. Witt, O., et al., *HDAC family: What are the cancer relevant targets?* Cancer Lett, 2009. **277**(1): p. 8-21.
155. Woan, K.V., et al., *Modulation of antigen-presenting cells by HDAC inhibitors: implications in autoimmunity and cancer*. Immunol Cell Biol, 2012. **90**(1): p. 55-65.
156. Reynolds, A., et al., *Rational siRNA design for RNA interference*. Nat Biotechnol, 2004. **22**(3): p. 326-30.
157. 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.
158. 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.
159. Cheung, M. and J. Briscoe, *Neural crest development is regulated by the transcription factor Sox9*. Development, 2003. **130**(23): p. 5681-93.
160. Rahman, M.M., et al., *Two histone deacetylase inhibitors, trichostatin A and sodium butyrate, suppress differentiation into osteoclasts but not into macrophages*. Blood, 2003. **101**(9): p. 3451-9.
161. Mazzocchi, G., et al., *A Timeless Link Between Circadian Patterns and Disease*. Trends Mol Med, 2016. **22**(1): p. 68-81.
162. Sigstad, E., et al., *The new molecular markers DDIT3, STT3A, ARG2 and FAM129A are not useful in diagnosing thyroid follicular tumors*. Mod Pathol, 2012. **25**(4): p. 537-47.
163. Jayachandran, A., et al., *Identifying and targeting determinants of melanoma cellular invasion*. Oncotarget, 2016.
164. Shao, Y., et al., *Biological functions of macrophage-derived Wnt5a, and its roles in human diseases*. Oncotarget, 2016.
165. Peltonen, K., et al., *Melanoma cell lines are susceptible to histone deacetylase inhibitor TSA provoked cell cycle arrest and apoptosis*. Pigment Cell Res, 2005. **18**(3): p. 196-202.
166. Gollob, J.A., et al., *Phase I trial of sequential low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine plus high-dose intravenous bolus interleukin-2 in patients with melanoma or renal cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(15): p. 4619-27.
167. Chen, H., et al., *Hypermethylation and downregulation of glutathione peroxidase 3 are related to pathogenesis of melanoma*. Oncol Rep, 2016. **36**(5): p. 2737-2744.

168. Diaz-Nunez, M., et al., *Histone deacetylase inhibitors induce invasion of human melanoma cells in vitro via differential regulation of N-cadherin expression and RhoA activity*. BMC Cancer, 2016. **16**: p. 667.
169. Kelly, W.K., et al., *Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(10 Pt 1): p. 3578-88.
170. Qiu, L., et al., *Anti-tumour activity in vitro and in vivo of selective differentiating agents containing hydroxamate*. Br J Cancer, 1999. **80**(8): p. 1252-8.
171. Sandor, V., et al., *Phase I trial of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228, NSC 630176), in patients with refractory neoplasms*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(3): p. 718-28.
172. Pan, L., et al., *HDAC4 inhibits the transcriptional activation of mda-7/IL-24 induced by Sp1*. Cell Mol Immunol, 2010. **7**(3): p. 221-6.
173. Le Tourneau, C. and L.L. Siu, *Promising antitumor activity with MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor*. Expert Opin Investig Drugs, 2008. **17**(8): p. 1247-54.
174. Fournel, M., et al., *MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor, has broad spectrum antitumor activity in vitro and in vivo*. Mol Cancer Ther, 2008. **7**(4): p. 759-68.
175. Balasubramanian, S., et al., *A novel histone deacetylase 8 (HDAC8)-specific inhibitor PCI-34051 induces apoptosis in T-cell lymphomas*. Leukemia, 2008. **22**(5): p. 1026-34.
176. Rettig, I., et al., *Selective inhibition of HDAC8 decreases neuroblastoma growth in vitro and in vivo and enhances retinoic acid-mediated differentiation*. Cell Death Dis, 2015. **6**: p. e1657.
177. Kupcho KR, E.N., Niles AL, Kirkland TA and Lazar DF, *Selective Bioluminogenic HDAC Activity Assays for Profiling HDAC Inhibitors*. 2014.
178. Copeland, R.A., D.L. Pompliano, and T.D. Meek, *Drug-target residence time and its implications for lead optimization*. Nat Rev Drug Discov, 2006. **5**(9): p. 730-9.
179. Lauffer, B.E., et al., *Histone deacetylase (HDAC) inhibitor kinetic rate constants correlate with cellular histone acetylation but not transcription and cell viability*. J Biol Chem, 2013. **288**(37): p. 26926-43.
180. Deubzer, H.E., et al., *HDAC11 is a novel drug target in carcinomas*. Int J Cancer, 2013. **132**(9): p. 2200-8.
181. Benedetti, R., M. Conte, and L. Altucci, *Targeting Histone Deacetylases in Diseases: Where Are We?* Antioxid Redox Signal, 2015. **23**(1): p. 99-126.
182. Sleiman, S.F., et al., *Histone Deacetylase Inhibitors and Mithramycin A Impact a Similar Neuroprotective Pathway at a Crossroad between Cancer and Neurodegeneration*. Pharmaceuticals (Basel), 2011. **4**(8): p. 1183-1195.

183. Ritter, C., et al., *Reversal of epigenetic silencing of MHC class I chain-related protein A and B improves immune recognition of Merkel cell carcinoma*. *Sci Rep*, 2016. **6**: p. 21678.
184. Chen, H.P., Y.T. Zhao, and T.C. Zhao, *Histone deacetylases and mechanisms of regulation of gene expression*. *Crit Rev Oncog*, 2015. **20**(1-2): p. 35-47.
185. Luo, J., et al., *Deacetylation of p53 modulates its effect on cell growth and apoptosis*. *Nature*, 2000. **408**(6810): p. 377-81.
186. Chen, L., et al., *Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation*. *Science*, 2001. **293**(5535): p. 1653-7.

Abkürzungsverzeichnis

APC	antigen presenting cell (Antigen-präsentierende Zelle)
ATP	Adenosintriphosphat
Aza	5-aza-2'-deoxycytidine
AZD6244	Selumetinib (MEK1/2-Inhibitor)
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BET	bromodomain and extraterminal domain family
bHLH	basic helix-loop-helix
Bp	Basenpaare
BPE	bovine pituitary extract
BRAF	b-rapidly accelerated fibrosarcoma
Brn3a	brain-3A
BSA	Bovines Serum Albumin
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	complementary DNA
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CP	crossing point
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CSH	Cold Spring Harbor
CTB	Cell Titer Blue
DAPK	death-associated protein kinase
ECL	enhanced chemoluminescence
EGF	epidermal growth factor
EMA	European Medicines Agency
EMT	Epithelial to mesenchymal transition
ERK	extracellular-signal regulated kinase

FACS	fluorescence activated cell sorting (Durchflusszytometrie)
FDA	Food and Drug Administration
FKS	Fötale Kälberserum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GPX3	glutathione peroxidase 3
GT	Guanidinisothiocyanat
HATs	Histonacetyltransferasen
HBSS	Hank's balanced salt solution
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
HM	Humane Melanozyten
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
HRP	Horse Raddish Peroxidase
IFN α	Interferon α
IL-2	Interleukin-2
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobase
KO-Maus	Knockout-Maus
L1	Ligand 1
LB	LuriaBroth
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MB	Melanoblast
MCS	multiple cloning site
mda-7/IL-24	melanoma differentiation-associated gene/interleukin-24
MGMT	O6-methylguanine DNA methyltransferase
MHC	Major Histocompatibility Complex; Haupthistokompatibilitätskomplex
MITF	microphthalmia transcription factor
Moce	Mocetinostat

mRNA	messenger RNA
MZ	Melanozyt
n.s.	nicht signifikant
NCC	neural crest cell (Neuralleistenzelle)
ncRNA	non-coding RNA
NGS	next generation sequencing
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom
OD	Optische Dichte
oe	overexpression
ORF	open-reading-frame
PBS	Phosphat-gepuffertes Salz
PD-1	programmed cell death protein-1
PLX4032	Vemurafenib (BRAF-Inhibitor)
POU	Pit-Oct-Unc
PTEN	phosphatase and tensin homolog
qRT-PCR	quantitative Real Time (Echtzeit)-Polymerasekettenreaktion
RAR-b2	retinoic acid receptor-b2
RASSF1A	RAS association domain family protein 1A
RGP	radial growth phase
RNaseA	Ribonuclease A
Rt	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid
siRNAs	small interfering RNAs
SOX10	SRY (sex determining region Y)-box 10
Tb	Trametinib - Mekinist (MEK1/2-Inhibitor)
TBE	Tris/Borate/EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

TrkA	Tropomyosin Rezeptor Kinase A
TSA	Trichostatin A
VGP	vertical growth phase
w/o	without – ohne Behandlung
WM	Wistar Melanoma
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galactopyranosid
ZNS	Zentrales Nervensystem

Danksagung

Zuallererst möchte ich Carola Berking danken, dass sie mir die Möglichkeit gegeben hat bei ihr meine Arbeit durchzuführen und in ihrer Arbeitsgruppe arbeiten zu dürfen.

Natürlich möchte ich auch Robert Besch danken, dass er mich bei dem ersten Teil meiner Arbeit betreut hat und die Idee zu meinem Projekt hatte.

Ein großer Dank geht an Markus Heppt, der mir eine wertvolle Hilfe als mein Betreuer war. Ich danke ihm für die Unterstützung bei der Besprechung der Daten, der Experimente, sowie Abstracts, Poster, Vorträge und Diskussionen.

Ganz besonders möchte ich mich bei Claudia Kammerbauer bedanken für all die unbezahlbaren Tipps, Ratschläge, Hilfestellungen sowohl im Laboralltag, als auch in jeglichen Lebenslagen. Das Herz des Labors.

An Saskia Graf geht ein großer Dank für ihre Hilfsbereitschaft und das wunderbare Miteinander.

Ich möchte Sabine Fraschka für die Vorarbeiten an diesem Projekt danken. Und Annamarie Hamel für die Arbeiten an den resistenten Zellen.

Natürlich möchte ich allen danken, die zeitweise in unserem Labor mitgearbeitet haben. Stephanie Kellner, Fanny Matheis, Zsuzsanna Kurgyis.

Ein großer Dank geht an meinen Bruder, Michael Hornig, der mich in jeder Situation unterstützt hat und mir mein bester Freund war.

Meine größte Unterstützung in der ganzen Zeit waren meine Eltern! Danke, für die großartige Hilfe, den Beistand und die positiven Worte.