

**Identifizierung von Zielgenen des neuronalen  
Transkriptionsfaktors Brn3a im Melanom mittels  
Microarray-Analysen**



Dissertation

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

Stephanie Elisabeth Guder

2019

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie  
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Lars French

**Identifizierung von Zielgenen des neuronalen Transkriptionsfaktors  
Brn3a im Melanom mittels Microarray-Analysen**

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

vorgelegt von

Stephanie Elisabeth Guder, geb. Kellner  
aus München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Robert Besch

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Thomas Knösel  
Prof. Dr. Peter B. Becker  
Prof. Dr. Lars Lindner

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 21.03.2019

*Meinen Eltern  
und meinem Mann Philipp*

*Die vorliegende Arbeit wurde durch das Graduiertenkolleg 1202 "Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie" der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gefördert.*

# Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	5
2. Einleitung.....	7
2.1. Das maligne Melanom.....	8
2.1.1. Pathogenese des Melanoms .....	10
2.1.2. Parallelen zwischen Tumorentstehung und Embryogenese .....	13
2.2. Der Transkriptionsfaktor Brn3a (POU4F1) .....	14
2.2.1. Funktion von Brn3a .....	14
2.2.2. Bedeutung beim malignen Melanom.....	15
2.3. Microarrays zur Genexpressionsanalyse.....	18
3. Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit .....	21
4. Material und Methoden .....	22
4.1. Material .....	22
4.1.1. Antikörper .....	22
4.1.1.1. Primäre Antikörper .....	22
4.1.1.2. Sekundäre Antikörper .....	22
4.1.2. Apparative Ausstattung.....	22
4.1.3. Kommerziell erhältliche Komplettsysteme .....	23
4.1.4. Oligonukleotide .....	23
4.1.4.1. Primer .....	24
4.1.4.2. Small Interfering RNAs (siRNAs) .....	24
4.1.4.3. Oligonukleotide zur Herstellung von Genreporterplasmiden .....	25
4.1.4.4. Plasmide .....	25
4.1.5. Puffer und Lösungen .....	26
4.1.6. Transfektionsreagenzien .....	28

4.1.7.	Verbrauchsmaterialien .....	28
4.1.8.	Zellkulturmedien .....	29
4.2.	Methoden.....	30
4.2.1.	Zellkultur und zellbasierte Assays .....	30
4.2.1.1.	Melanomzellkultur .....	30
4.2.1.2.	Zellkultur primärer Hautzellen (Keratinozyten, Fibroblasten, Melanozyten) .....	31
4.2.1.3.	Hemmung der Genexpression mittels RNA-Interferenz .....	31
4.2.1.4.	Transiente Genexpression mittels Plasmid-Transfektion.....	32
4.2.1.5.	Stabile Brn3a-Expression in Melanozyten .....	32
4.2.2.	Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	33
4.2.2.1.	Plasmid-DNA.....	33
4.2.2.2.	Präparation von Ribonukleinsäuren (RNA) .....	34
4.2.2.3.	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	34
4.2.3.	Quantifizierung der Genexpression mittels qRT-PCR.....	35
4.2.3.1.	Reverse Transkription von mRNA.....	35
4.2.3.2.	Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR) .....	36
4.2.4.	Microarray .....	38
4.2.5.	Proteinbiochemische Verfahren.....	38
4.2.5.1.	Proteinisolation .....	38
4.2.5.2.	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	38
4.2.5.3.	Immunoblot nach Lämmli .....	39
4.2.6.	Cell Titer Blue®: Bestimmung der Zell-Vitalität .....	40
4.2.7.	Durchflusszytometrie (FACS).....	41
4.2.7.1.	Quantifizierung apoptotischer Zellen.....	41
4.2.7.2.	FACS zu Zellzyklusanalyse.....	42
4.2.8.	Reportergenanalysen .....	44
4.2.9.	Statistische Analysen.....	45

5.	Ergebnisse .....	46
5.1.	Microarray-Analysen zur Identifizierung von Zielgenen von Brn3a.....	46
5.1.1.	Versuchsaufbau und -durchführung .....	46
5.1.1.1.	Microarray: Brn3a-Hemmung in 1205Lu-Melanomzellen .....	47
5.1.1.2.	Microarray: Brn3a-Überexpression in humanen Melanozyten .....	48
5.1.2.	Definition regulierter Gene .....	48
5.1.3.	Selektionskriterien für Zielgene .....	49
5.1.3.1.	Literaturrecherche.....	49
5.1.3.2.	Vergleich mit anderen Microarray-Analysen .....	51
5.1.3.3.	Verifizierung von Zielgenen.....	52
5.2.	FAM129A und TIMELESS als transkriptionelle Zielgene von Brn3a .....	53
5.2.1.	Funktionelle Charakterisierung von FAM129A im Melanom .....	53
5.2.1.1.	FAM129A zeigt eine zu Brn3a gleichsinnige Regulation .....	53
5.2.1.2.	Regulation von FAM129A während der Melanomentstehung .....	55
5.2.1.3.	Die Hemmung von FAM129A führt zu verminderter Zellvitailität und Zellsterben in Melanomzellen.....	56
5.2.1.4.	Der bei Brn3a-Hemmung beobachtete Phänotyp ist nicht reversibel durch eine Überexpression von FAM129A.....	58
5.2.2.	Funktionelle Charakterisierung von TIMELESS im Melanom .....	60
5.2.2.1.	Beschriebene Funktion von TIMELESS .....	60
5.2.2.2.	TIMELESS zeigt eine zu Brn3a gleichsinnige Regulation.....	61
5.2.2.3.	Regulation von Timless während der Melanomentstehung .....	62
5.2.2.4.	Die Hemmung von TIMELESS induziert Apoptose und führt zu verminderter Zellvitalität und Zellsterben in Melanomzelllinien.....	63
5.2.2.5.	Keine Apoptose-Induktion nach TIMELESS-Hemmung in Fibroblasten .....	67
5.2.2.6.	Aktivierung von p21 und p53 sowie Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen nach TIMELESS-Hemmung .....	69



5.2.2.7.	Der bei Brn3a-Hemmung beobachtete Phänotyp ist nicht reversibel durch eine Überexpression von TIMELESS .....	70
5.2.2.8.	Zellzyklusanalyse nach TIMELESS-Hemmung .....	71
5.2.2.9.	Untersuchung der transkriptionellen Regulation von TIMELESS durch Brn3a mittels Reporteranalysen .....	72
6.	Diskussion .....	74
6.1.	Microarrays zur Identifikation von Zielgenen des Transkriptionsfaktors Brn3a .....	74
6.2.	siRNA-vermittelte Hemmung der Zielgene .....	76
6.3.	Unzureichende Reversibilität des Brn3a-Phänotyps durch FAM129A und TIMELESS .....	77
6.4.	FAM129A als Zielgen im Melanom .....	77
6.5.	TIMELESS als Zielgen im Melanom .....	79
6.5.1.	Regulation von TIMELESS im Melanom .....	80
6.5.2.	Funktion von TIMELESS .....	81
6.5.3.	Beeinflussung des Zellzyklus durch TIMELESS .....	83
6.5.4.	Regulation von TIMELESS durch Brn3a .....	84
6.6.	Ausblick .....	85
7.	Literaturverzeichnis .....	87
8.	Anhang .....	93
8.1.	Abbildungsverzeichnis .....	93
8.2.	Tabellenverzeichnis .....	94
9.	Abkürzungen .....	95
10.	Danksagung .....	97
11.	Lebenslauf .....	98
12.	Eidesstattliche Versicherung .....	99

# 1. Zusammenfassung

In der Vergangenheit wurde gezeigt, dass der von der Neuralleiste abstammende Transkriptionsfaktor Brn3a eine essentielle Rolle für die Proliferation und das Überleben von Melanomzellen spielt. Es wurde eine deutliche Expression von Brn3a in fast allen Melanomzelllinien festgestellt, während sie Melanozyten und anderen Hautzellen beinahe gänzlich fehlte. Eine Hemmung von Brn3a in Melanomzellen führte zu einem Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase sowie zur Induktion der Apoptose, welche sich auf eine Aktivierung des Tumorsuppressors p53 zurückführen ließ. Insgesamt gibt es nur wenig Information über Brn3a-regulierte Gene. Genomweite Analysen und Untersuchungen an Melanomzellen diesbezüglich bestanden bisher nicht.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, Zielgene von Brn3a im Melanom mittels genomweiter Microarray-Analysen zu identifizieren. Wir wählten für die Durchführung der Microarrays zwei komplementäre Herangehensweisen. Zum einen wurde Brn3a in Brn3a-exprimierenden Melanomzellen gehemmt und regulierte Gene identifiziert. Zum anderen wurde Brn3a in Brn3a-negativen Melanozyten überexprimiert und die regulierten Gene analysiert. Die in diesen komplementären Ansätzen gleichsinnig regulierten Gene wurden dann näher untersucht. Damit konnte die Anzahl potentieller Zielgene deutlich eingeschränkt und die Bedeutung anderer Einflussfaktoren reduziert werden. Nach Anlage geeigneter Schwellenwerte wurden 48 Gene identifiziert. Die Ergebnisse weiterer Kriterien (Literaturrecherche, Regulation in einem öffentlich zugänglichen Microarray-Datensatz mit verschiedenen Hautproben, Proben von benignen Nävi und Melanomen) bewirkten eine Selektion von 15 Genen. Davon wurden neun Gene mittels qRT-PCR-Analysen bestätigt. Es erfolgte anschließend eine funktionelle Untersuchung von WNT5A, FAM129A und TIMELESS im Melanom, indem sie in Melanomzellen ektop überexprimiert (WNT5A) oder gehemmt (FAM129A, TIMELESS) wurden.

Hier zeigte sich bei siRNA-vermittelter Hemmung von FAM129A und TIMELESS ein ähnlicher Phänotyp wie bei Brn3a-Hemmung, ein Absterben der Zellen durch Apoptose. Ähnlich wie bei Brn3a-Hemmung wurde nach TIMELESS-Hemmung in Melanomzellen eine Induktion der zellzyklusregulierenden Faktoren p21 und p53 sowie eine Aktivierung von  $\gamma$ H2aX als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche beobachtet. Im Gegensatz zur Brn3a-Hemmung konnten aber keine Auswirkungen auf den Zellzyklus festgestellt werden.

Schließlich wurden Rescue-Experimente durchgeführt, wobei FAM129A oder TIMELESS ektop exprimiert wurden während Brn3a gehemmt wurde. Dadurch wurden die bei Brn3a-Hemmung

reduzierten Proteinmengen wieder normalisiert. Allerdings verhinderte dies nicht die Apoptose. Dies zeigt, dass FAM129A oder TIMELESS nicht alleine verantwortlich für den Brn3a-Phänotyp sind.

Zusammenfassend konnten mithilfe der Microarray-Analysen einige vielversprechende Zielgene von Brn3a identifiziert werden. Insbesondere für TIMELESS wurde dabei eine spezifische Rolle für das Überleben von Melanomzellen entdeckt. Weitere Untersuchungen dieses Gens in Bezug auf seine Funktionen in der Melanomentstehung und -progression erscheinen unter dem Gesichtspunkt der Entwicklung neuer Therapiestrategien lohnenswert.

## 2. Einleitung

Krebserkrankungen stellen, vor allem in den Industrienationen, eine der häufigsten potentiell tödlichen Erkrankungen dar. In Deutschland sind sie nach kardiovaskulären Erkrankungen die zweithäufigste Todesursache [1].

Es handelt sich bei Krebserkrankungen um eine sehr heterogene Erkrankungsgruppe. Prinzipiell kann sich jede Körperzelle im Verlauf des Lebens zu einer Krebszelle entwickeln. Dieser Entwicklung, auch malignen Transformation genannt, liegen jedoch ähnliche zellphysiologische Veränderungen zugrunde. Sie wurden als „hallmarks of cancer“ von Hanahan und Weinberg zusammengefasst [2].

Sie beinhalten ein von äußeren Wachstumsfaktoren unabhängiges Zellwachstum der Tumorzellen, sowie eine Resistenz gegenüber inhibitorischen Signalen, welche das Zellwachstum negativ beeinflussen könnten. Des Weiteren zeigen Krebszellen eine Resistenz gegenüber dem programmierten Zelltod, der sogenannten Apoptose. Sie besitzen die Fähigkeit einer unlimitierten Proliferation und sorgen durch Stimulation der Angiogenese für eine ungehinderte Zufuhr an Nährstoffen. Der expansive Charakter maligner Zellen zeigt sich zunächst in der Invasion von lokalem Gewebe und im Verlauf der Erkrankung in der Bildung von Metastasen.

Im Jahr 2011 erfolgte eine Ergänzung der „hallmarks of cancer“, da der Fortschritt in der Forschung gezeigt hatte, dass Tumore nicht vom restlichen Körper abgegrenzte Prozesse darstellen, sondern das umgebende Milieu sowie das Immunsystem ebenfalls eine wesentliche Rolle spielen. Die Veränderung von Zellen während der Tumorgenese kann dabei auf genetischen und epigenetischen Veränderungen beruhen [3].

Auch in der Transformation von Melanozyten zu Melanomzellen spielen oben genannte zellphysiologische Prozesse eine entscheidende Rolle. Die Kenntnis von molekularen Veränderungen hat in den letzten Jahren zu neuartigen Therapiestrategien geführt. Das Eingreifen in durch Mutationen veränderte Signalwege (mitogenactivated protein kinase (MAPK)-Signalkaskade, Checkpoint-Kinasen) führte bei Melanompatienten zu einer deutlichen Verlängerung der Überlebenszeit. Jedoch sprechen nicht alle Patienten auf diese neuen Therapieformen an und Resistenzbildungen im Verlauf der Therapie bleiben ein ungelöstes Problem [4].

Deshalb stellt die Erforschung der biologischen Eigenschaften des Melanoms, um sie zur Entwicklung weiterer zielgerichteter Therapien zu nutzen, weiterhin eine wichtige Aufgabe der aktuellen Melanomforschung dar.

## 2.1. Das maligne Melanom

Beim malignen Melanom, dem schwarzen Hautkrebs, handelt es sich um einen soliden Hauttumor, welcher aus den pigmentbildenden Zellen (Melanozyten) entsteht. Hauptsächlich tritt das Melanom an der Haut oder den Schleimhäuten auf. In seltenen Fällen kann es jedoch auch das Auge (Retina und Uvea) oder die Hirnhäute betreffen.

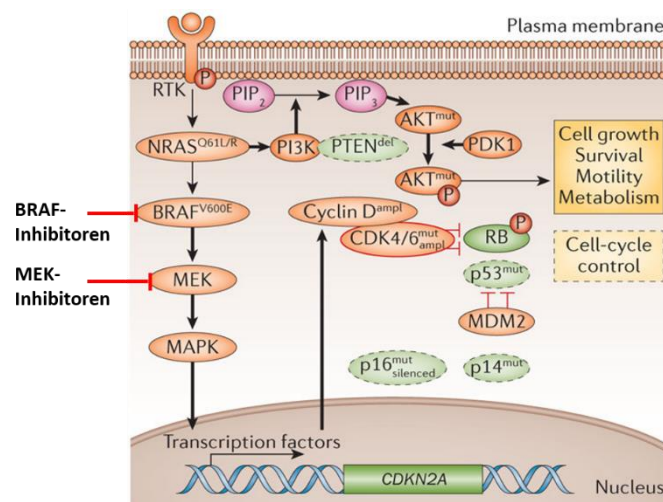
Während der Tumor noch vor einigen Jahrzehnten als selten galt, stellte er im Jahr 2014 bei Frauen und Männer jeweils die fünfthäufigste Tumorentität dar. Deutschlandweit erkrankten im Jahr 2014 ca. 21.200 Menschen, wobei das mittlere Erkrankungsalter bei Frauen bei 60 Jahren lag. Männer erkrankten durchschnittlich ca. sieben Jahre später [5]. Der Anstieg der altersstandardisierten Erkrankungsrate um ca. das dreifache verglichen mit Zahlen aus den 1980er Jahren, lässt sich am ehesten auf das veränderte Freizeitverhalten mit vermehrter UV-Exposition zurückführen [6]. Auch führte die Einführung der flächendeckenden Screeninguntersuchungen in Deutschland im Jahr 2008 zu einem deutlichen Anstieg der Inzidenz [5]. Insgesamt zählt das Melanom mit einer angenommenen jährlichen Erhöhung der Inzidenzrate von ca. 3-7% zu einer der am stärksten zunehmenden malignen Erkrankungen der weißen Bevölkerung [7].

Die Exposition zu UV-Licht stellt den wichtigsten exogenen Risikofaktor für die Melanomentstehung dar. Endogene Risikofaktoren sind Melanomerkkrankungen in der Familie, eine hohe Anzahl benigner Nävi (Leberflecken) sowie ein heller Hauttyp [8].

Das Melanom kann histopathologisch in vier unterschiedliche Subtypen unterteilt werden. Ein Anteil von ca. 5% kann keinem spezifischen Subtyp zugewiesen werden und entspricht einem Mischtyp oder einer seltenen Variante. Die verschiedenen Subtypen weisen ein unterschiedlich aggressives Wachstums- und Ausbreitungsmuster auf, was die Prognose der Erkrankung maßgeblich beeinflusst. Der vorherrschende Subtyp, das oberflächlich spreitenden Melanom (SSM) hat eine günstige Prognose, während andere, insbesondere die noduläre Form, mit einer deutlich höheren Mortalität verbunden sind [7].

Insgesamt stellt das Melanom den am häufigsten metastasierenden Hauttumor dar, welcher für mehr als 90% aller Sterbefälle bei Hauttumoren verantwortlich ist [6]. Vor allem die Neigung des Tumors zur frühen Metastasierung und seine hohe Resistenz gegen klassische Chemotherapeutika und Strahlenbehandlung sind für die schlechte Prognose bei später Diagnose verantwortlich. Bis 2011 waren Chemotherapien die einzige systemische Therapieform des Melanoms. Sie konnte, bei keiner nachgewiesenen Verlängerung der Gesamtüberlebenszeit, lediglich als palliative Maßnahme eingesetzt werden [9].

Inzwischen hat die Einführung zielgerichteter Therapien („targeted therapies“) und immuntherapeutischer Ansätze die Behandlung des Melanoms grundlegend verändert. Von einer beim metastasierten Melanom rein palliativen Zielsetzung in der Therapie fand ein Paradigmenwechsel zur potentiellen Heilung statt [10]. Der BRAF-Inhibitor Vemurafenib stellte die erste zielgerichtete Therapie dar, welche wesentlichen Erfolg zeigte [11]. Trotz des sehr vielversprechenden Ansatzes und die Verlängerung des progressionsfreien Überlebens, bleibt die Bildung von Resistenzen einer der Hauptprobleme bei ihrem Einsatz. Inzwischen bestehen weitere Therapieoptionen, mit welchen diesem Problem durch Monotherapien, aber vor allem in Kombinationstherapien, begegnet werden kann. Vielversprechende Ergebnisse haben sich hierbei für MEK-Inhibitoren ergeben. Verschiedene Studien haben deutliche Vorteile einer Kombinationstherapie mit einem BRAF/MEK-Inhibitor bezüglich der Überlebenszeit von Melanompatienten gezeigt [12-14]. Verschiedene für Melanomzellen wichtige Signalwege, an welchen zielgerichtete Therapien ansetzen können, sind in Abbildung 1 dargestellt. MEK-Inhibitoren greifen wie BRAF-Inhibitoren am MAPK-Signalweg an. Auf die genaueren genetischen Veränderungen während der Melanomentstehung wird weiter unten eingegangen (vgl. 2.1.1.).



**Abbildung 1: Signalwege beim Melanom und therapeutische Ansatzpunkte** (modifiziert nach Schadendorf et al., 2015 [15]). Typische genetische Veränderungen während der Melanomentstehung und ihre konsekutive Signalwegaktivierung (dargestellt durch dicke schwarze Pfeile).

Ein weiterer Durchbruch in der Melanomtherapie gelang auf dem Feld der Immuntherapien mit den sogenannten Checkpoint-Inhibitoren. Als Checkpoints werden Ko-Rezeptoren auf T-Zellen bezeichnet, deren Aktivierung eine verminderte T-Zellantwort zur Folge hat. Biologische Funktion dieser Rezeptoren ist es, eine überschießende Immunreaktion zu begrenzen. Die Inhibition dieser Rezeptoren hemmt deren begrenzende Funktion und führt so zu einer gesteigerten Immunantwort, die zu Immunabwehr eines Tumors führen kann. Zwei dieser Checkpoints sind CTLA4 und PD1, gegen welche Inhibitoren zur

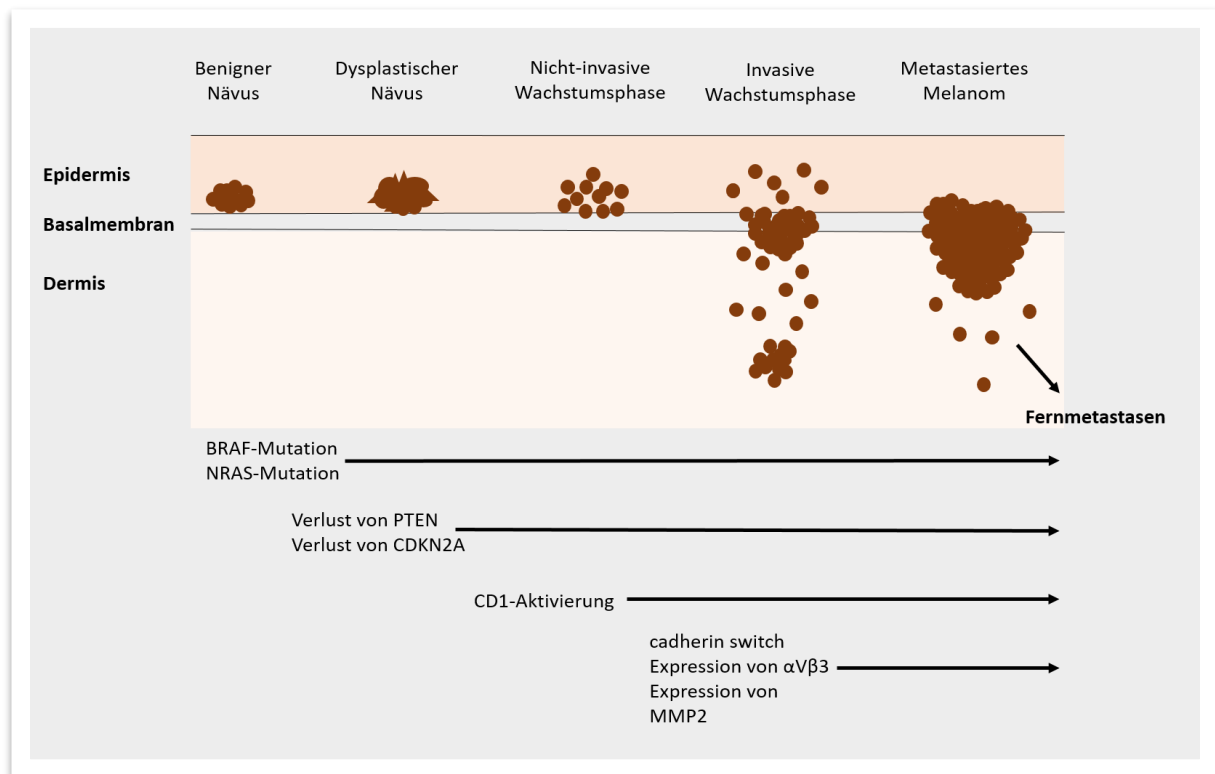
Therapie des Melanoms entwickelt wurden [10]. In verschiedenen Studien konnte eine Verlängerung des progressionsfreien Überlebens für die Inhibitoren Ipilimumab (PD1-Inhibitor) und Nivolumab (CTLA4-Inhibitor) gezeigt werden [16-19]. Nivolumab als Monotherapie oder eine Kombinationstherapie aus Nivolumab und Ipilimumab zeigten dabei bessere Ergebnisse als eine alleinige Therapie mit Ipilimumab [20, 21]. Checkpoint-Inhibitoren stellt dabei insbesondere auch eine Therapieoption für Patienten ohne nachgewiesene BRAF-Mutation dar [18].

Insgesamt zeigen diese Beispiele, wie wichtig die Erforschung der Pathomechanismen des Melanoms für die (Weiter-) Entwicklung spezifischer Therapieansätze ist. Bestanden noch vor einigen Jahren kaum Therapieoptionen, ist das Melanom heute ein „Mustertumor“ in Bezug auf zielgerichtete Therapien und Immuntherapien.

### 2.1.1. Pathogenese des Melanoms

Ein verbreitetes Modell der Melanomentstehung mit Berücksichtigung histopathologischer Merkmale ist das Clark-Modell, in welchem die verschiedenen Tumorstadien bis zur Metastasierung in fünf Stufen eingeteilt sind. Die maligne Transformation beginnt mit einer Veränderung der Wachstumseigenschaften der Melanozyten. Es kommt es zu einem vermehrten Wachstum (Hyperproliferation), was in einem benignen Nävus resultiert. Ein benigner Nävus stellt eine Ansammlung normaler Melanozyten an der Basalmembran dar. Im Folgenden treten die Zellen dann in einen Ruhezustand, die sogenannte Seneszenz ein, wodurch die vermehrte Proliferation gestoppt wird. Überwinden die Zellen ihren seneszenten Zustand entsteht ein dysplastischer Nävus, welcher als Vorstufe des Melanoms gilt. Anzeichen für einen dysplastischen Nävus können eine asymmetrische Begrenzung, unscharfe Ränder oder eine unterschiedliche Pigmentierung sein. In diesem Zustand können sich die Zellen auch über Jahre stabil befinden, es muss nicht zwangsläufig zu einer malignen Transformation kommen. Tritt diese jedoch ein, kennzeichnet den Übergang zur malignen Läsion die nicht-invasive Wachstumsphase (radial growth phase, RGP). Dabei breiten sich die Tumorzellen radial in der Epidermis aus. Die Basalmembran kann vereinzelt von Melanozyten durchbrochen werden. Es findet jedoch kein tieferes Eindringen in die Dermis statt, da die Zellen noch nicht in der Lage sind ankerunabhängig zu wachsen, d.h. sie benötigen den Kontakt zu Zellen der Epidermis. Die Ausbreitung in tiefere Schichten geschieht in der invasiven Wachstumsphase (vertical growth phase, VGP), in welcher die Melanomzellen in die Dermis und das subkutane Fettgewebe vordringen und dort durch unkontrollierte Proliferation Tumornester ausbilden. Vom lokalen Tumor (Primärtumor) können sich im Verlauf dann einzelne Tumorzellen lösen und über die Lymphe oder das Blut in andere Organe

gelangen und dort Metastasen bilden [22]. Den verschiedenen von Clark beschriebenen Stadien lassen sich molekulargenetische Ereignisse zuordnen, welche in Abbildung 2 veranschaulicht sind.



**Abbildung 2: Melanomentstehung** (angelehnt an Miller and Mihm, 2006 [23])

Zu Beginn, d.h. als Initiator der Hyperproliferation stehen meist Mutationen im BRAF-Gen, welche bei ca. 40-60% aller Melanompatienten auftritt, aber auch in benignen Nävi mit ähnlicher Häufigkeit beobachtet werden [24, 25]. Auch Mutationen von N-RAS werden als typische erste genetische Veränderung beschrieben [26, 27]. NRAS- und BRAF-Mutationen sind dabei meist exklusiv, d.h. sie treten sehr selten gleichzeitig in einer Melanomzelle auf [15]. Es handelt sich bei ihnen um aktivierende Mutationen (auch driver mutations genannt). Sie bewirken eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs (mitogen-activated protein kinase), welcher zunächst das Wachstum der Zellen fördert [25]. Fehlen weiterer Faktoren kommt es im Verlauf zum Eintreten der bereits oben beschriebenen Seneszenz der Zellen. Die Seneszenz wird im Falle einer BRAF<sup>V600E</sup>-Mutation (entspricht mit ca. 80% der häufigsten aller BRAF-Mutationen [28, 29]) durch das BRAF-Onkogen über die verstärkte Expression des Gens CDKN2A (cyclin dependent kinase 2A) selbst ausgelöst. Man spricht dabei von einer Onkogen-induzierten Seneszenz (OIS) [30]. CDKN2A kodiert für die zellzyklusregulierenden Proteine p16<sup>INK4A</sup> und p14<sup>ARF</sup>, welche über unterschiedliche Mechanismen als Tumorsuppressoren wirken [31].

Um diesen Ruhezustand zu verhindern und letztlich die Transformation zum dysplastischen Nävus zu vollziehen, ist nach dem sogenannten two-hit-Modell der Tumorentstehung eine zweite genetische



Veränderung notwendig [32]. Eine äußerst relevante genetische Veränderung betrifft dabei das CDKN2A-Gen [33]. Aber auch von CDKN2A unabhängige Mechanismen, wie ein Verlust des Tumorsuppressors PTEN sind beschrieben [34].

In der nicht-invasiven Wachstumsphase spielt die Aktivierung zellzyklusaktivierender Moleküle wie CD1 (Cyclin D1) eine wesentliche Rolle. Sie ermöglichen den Zellen, sich oberflächlich in der Epidermis auszubreiten. Ein ankerunabhängiges Überleben ist in dieser Phase jedoch nicht möglich, die Zellen verbleiben im Gewebe ihrer Entstehung. Zum Verlassen der Epidermis ist eine Veränderung der Wachstumseigenschaften mit einer Transition von epithelialelem zu mesenchymalem Wachstum notwendig. Diese ist unter anderem durch eine veränderte Expression von Zelladhäsionsmolekülen, vor allem Cadherinen, gekennzeichnet. Cadherine werden in unterschiedliche Subtypen eingeteilt, wobei ein jeweiliger Subtyp nur an den gleichen Subtypen binden kann. Der „cadherin switch“, d.h. die Expression eines anderen Subtyps, stellt somit einen wichtigen Schritt in der epithelialen mesenchymalen Transition (EMT) dar [35]. E-Cadherin wird dabei reprimiert und N-Cadherin verstärkt exprimiert, wodurch sich die Melanomzellen der Kontrolle der Keratinozyten, welche ausschließlich E-Cadherin exprimieren, entziehen. So können sie das ursprüngliche Gewebe, die Epidermis, verlassen und in tiefere Schichten vordringen [36].

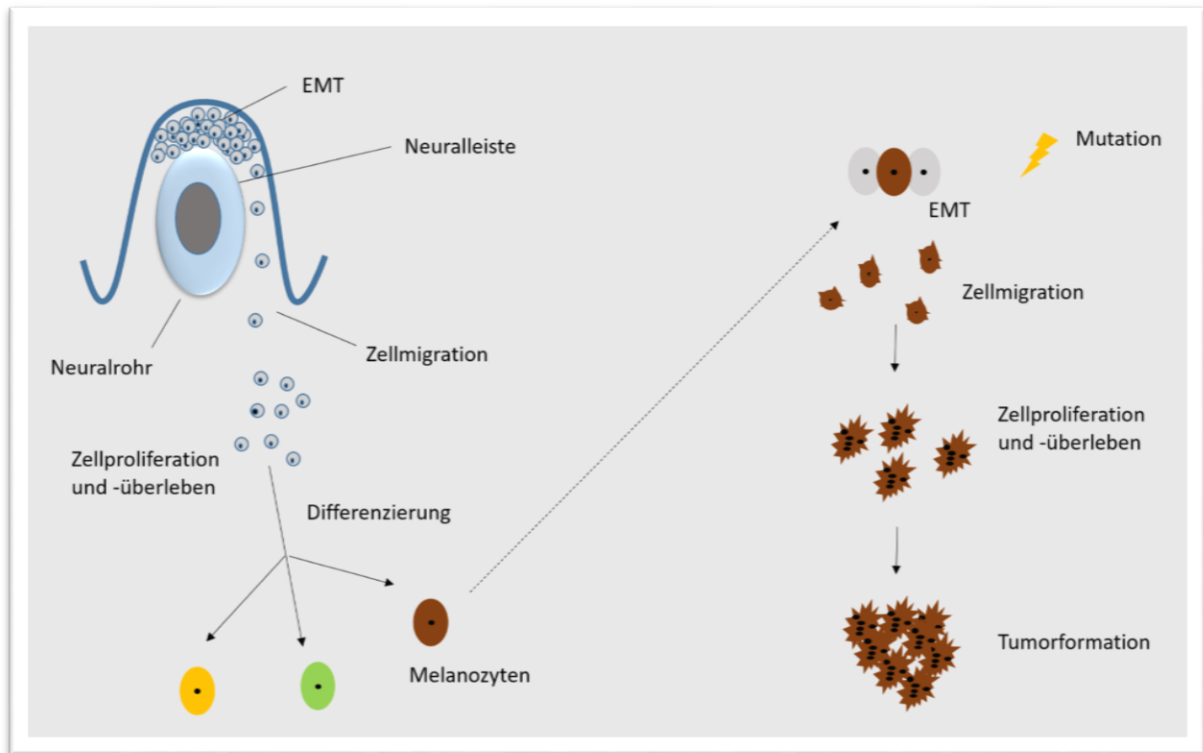
Zum Überwinden der Basalmembran ist zudem die Expression von Integrinen wie des  $\alpha\text{V}\beta\text{3}$ -Integrin notwendig. Dieses induziert die Expression der Metalloprotease MMP2, um Proteine der Basalmembran zu degradieren und sie so für Melanomzellen durchlässig zu machen [37].

Die beschriebenen Veränderungen folgen nicht immer, wie hier beschrieben, sukzessiv den einzelnen Stufen des Clark-Modells. Vielmehr können unterschiedliche Mutationen zu verschiedenen Zeiten in der Tumorentstehung auftreten und manche Stufen auch ganz übersprungen werden. Eine häufige primäre Reaktion der Zellen ist die Seneszenz, da einzelne Veränderungen noch einen untergeordneten Stimulus darstellen, der durch die Zelle nicht umgesetzt werden kann. Erst mehrerer Ereignisse können zu einer malignen Transformation führen.

Neben den beschriebenen spielen zahlreiche weitere Mechanismen eine Rolle bei der Entstehung des Melanoms. Viele dieser molekularen Prozesse finden auch während der Embryogenese statt [35, 38].

## 2.1.2. Parallelen zwischen Tumorentstehung und Embryogenese

Melanozyten entstammen der Neuralleiste, welche sich vom äußeren Keimblatt, dem Neuroektoderm, ableitet. Während der Embryogenese entwickeln sich aus diesen vormals pluripotenten Vorläuferzellen der Neuralleiste (Neural Crest Cells, NCC) zunehmend spezifischere Subtypen wie Melanozyten, endokrine und neuronale Zellen [39].



**Abbildung 3: Parallelen zwischen der Entwicklung der Neuralleiste und der Tumorgnese** (angelehnt an Maguire et al, 2015 [35])

Einen wichtigen Schritt in der Entwicklung von NCC stellt die epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) dar. Sie unterscheidet sich in einigen Punkten von der bereits beschriebenen bei der Entstehung des Melanoms, die Grundzüge sind dabei jedoch dieselben [40]. Die Transkriptionsfaktoren Snail/Slug spielen hierbei durch die Repression von E-Cadherin eine zentrale Rolle. Während der Migration im Embryo, welche auf festgelegte Weise erfolgt, teilen sich die NCC gemäß ihrer endgültigen Bestimmung in verschiedene Gruppen auf. Die sensorische Gruppe bildet dabei später afferente Neurone des sensorischen Nervensystems, die autonome Gruppe entwickelt sich zu sympathischen und enterischen Neuronen des vegetativen Nervensystems. Aus einer Gruppe entstehen zunächst Melanoblasten, welche sich später in der Haut zu reifen Melanozyten ausdifferenzieren [41].

Notwendige Fähigkeiten der Zellen während dieses Vorgangs wie Proliferation, Migration, Differenzierung und invasives Potential stellen auch wichtige Merkmale des malignen Melanoms dar. Abbildung 3 zeigt die Parallelen zwischen Tumorentstehung und Embryogenese.

## 2.2. Der Transkriptionsfaktor Brn3a (POU4F1)

Brn3a (POU4F1) gehört zu der Gruppe der Pit-Oct-Unc-Transkriptionsfaktoren. POU-Transkriptionsfaktoren haben unterschiedliche Funktionen und regulieren sowohl ubiquitär exprimierte sowie gewebsspezifische Gene. Durch zeitlich limitierte Expression, insbesondere während der Embryogenese, erfüllen sie einige sehr spezifische Aufgaben. Es konnte gezeigt werden, dass Pit-Oct-Unc-Transkriptionsfaktoren wichtige Funktionen in der Entwicklung neuronaler Zellen übernehmen. So wird Brn2 (POU3F2) beispielsweise für die Ausbildung endokrinen Gewebes und neurosekretorischer Neurone benötigt [42]. Auch in der Tumorentstehung, die der Embryogenese wie bereits beschrieben in vielen Punkten ähnelt, spielen POU-Transkriptionsfaktoren eine Rolle. In verschiedenen Arbeiten wurde ein die Tumorentstehung begünstigender Einfluss nachgewiesen [43-47].

Die Einteilung der POU-Transkriptionsfaktoren erfolgt in sechs unterschiedliche Klassen. Sie beruht dabei auf Sequenzähnlichkeiten der Transkriptionsfaktoren in der Region an ihrem N-terminalen Ende, der sogenannten POU-Box [48]. Brn3a (POU4F1) gehört, gemeinsam mit Brn3b (POU4F2) und Brn3c (POU4F3) der Klasse IV an. Ihr Charakteristikum stellt die hochkonservierte POU-IV-Box aus 40 Aminosäuren dar [49].

Der neuronale Transkriptionsfaktor Brn3a spielt während der Embryogenese eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von Nervenzellen. In adulten Geweben wird Brn3a dagegen selten exprimiert. In vorherigen Arbeiten des Labors wurde entdeckt, dass Brn3a im Melanom exprimiert wird [25].

### 2.2.1. Funktion von Brn3a

In verschiedenen Arbeiten wurde die Beteiligung von Brn3a bei der Entwicklung des peripheren Nervensystems gezeigt [50-53]. Nach der Embryonalzeit findet sich Brn3a hauptsächlich in sensorischen Ganglien (Ganglion trigeminale) und Teilen des zentralen Nervensystems (ZNS) [51, 54]. In Mäusen, die kein Brn3a exprimieren (Brn3a-knockout-Mäuse), wurde die Funktion von Brn3a untersucht. Die Mäuse zeigten nach der Geburt starke Einschränkungen in Motorik und Nahrungsaufnahme und verstarben innerhalb kurzer Zeit. Genauere Untersuchungen ergaben, dass der Verlust von Brn3a zum Absterben bestimmter sensorischer Ganglien während der embryonalen Entwicklung führt. Bedingt wird dies durch eine Störung in der Expression von für die

Embryonalentwicklung essentiellen Neurotrophinrezeptoren. Als Folge der gestörten Expression wird die Apoptose eingeleitet und die Zellen sterben ab.

Einfluss auf die Apoptose wird von Brn3a über eine direkte Regulation der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xl ausgeübt [55-57]. Des Weiteren interagiert Brn3a über eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit dem Tumorsuppressor p53 und reguliert darüber verschiedene Gene. Bcl-2 wird über diesen Mechanismus, neben der direkten Regulation, auch indirekt reguliert. Durch Bindung von Brn3a und p53 an benachbarte Bindestellen (kooperative Bindung) des Bcl-2-Promotors wird eine Aktivierung verhindert [58]. Auch das zellzyklusregulierende p21 (CDK-Inhibitor 1) und das proapoptotische Bax werden über kooperative Bindungen von Brn3a und p53 reguliert, wobei sie eine Aktivierung des p21-Promotors sowie eine Repression der Bax-Expression bewirkt [59].

Es wird angenommen, dass Brn3a einer Autoregulation unterliegt, wie Trieu und seine Kollegen in ihrer Arbeit 1999 gezeigt haben. Dabei identifizierten sie ein stromaufwärts liegendes Enhancer-Element, an das Brn3a mit hoher Affinität bindet. Versuche in heterozygoten Mäusen zeigten, dass ihre sensorischen Neurone durch Bindung von Brn3a an den Enhancer ähnlich hohe Brn3a-Level wie homozygote Mäuse aufwiesen [60].

Insgesamt ist das Wissen um die Funktion von Brn3a jedoch sehr begrenzt. So liefert die Suche nach dem Begriff Brn3a oder Pou4F1 bei Pubmed, einer englischsprachigen Meta-Datenbank, nur 450 Treffer. Zum Vergleich, bei der Suche nach dem Begriff BRAF erhält man 11450 Treffer. (Stand 14.04.2018)

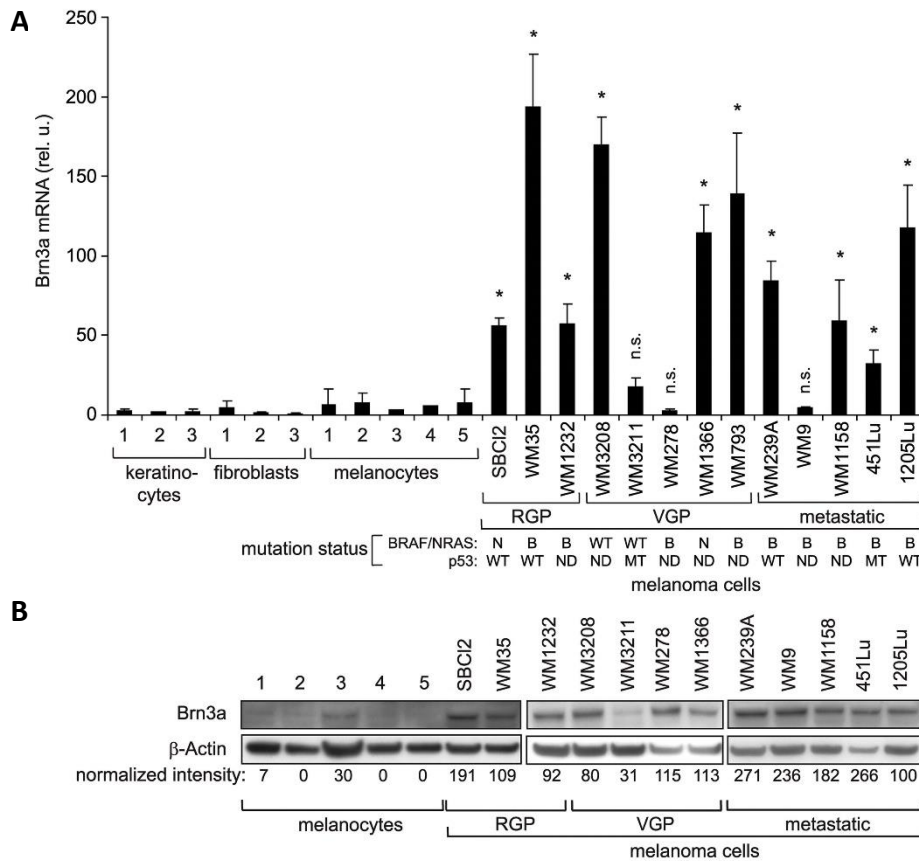
### 2.2.2. Bedeutung beim malignen Melanom

Brn3a ist wie andere POU-Transkriptionsfaktoren in der Tumorforschung kein unbekanntes Molekül. Die Expression von Brn3a wurde bereits in verschiedenen Tumoren, unter anderem im Zervix- [61], Ovarial- [62], Prostatakarzinom [63] sowie im Ewingsarkom [64], nachgewiesen.

In dieser Arbeit vorausgehenden Experimenten unseres Labors in der Dermatologie wurde die Relevanz des Transkriptionsfaktor Brn3a in der Entstehung sowie für das Überleben von Melanomzellen untersucht.

Erste Hinweise für eine melanomspezifische Funktion lieferte das Expressionsmuster von Brn3a. Auf mRNA- und Proteinebene wurde in mehr als 75% der Melanomzelllinien eine erhöhte Expression von Brn3a nachgewiesen, während in Melanozyten und anderen Hautzellen, wie Keratinozyten und Fibroblasten, Brn3a kaum nachweisbar war (Abbildung 4). Die Expression von Brn3a beschränkte sich somit auf maligne transformierte Zellen, war dabei jedoch nicht mit einem bestimmten Tumorstadium assoziiert. Auch Gewebeproben humaner Melanome waren in 55% der Fälle positiv für Brn3a.

Mithilfe von Luziferase-Reportern lässt sich die Aktivität von Transkriptionsfaktoren bestimmen (vgl. 4.2.8.). Im Falle von Brn3a wurde in Brn3a-positiven Melanomzellen eine hohe transkriptionelle Aktivität eines Luziferase-Reporters mit Brn3a-Promoter nachgewiesen. Brn3a wird also nicht nur exprimiert, sondern ist dabei auch funktionell als DNA-bindender Transkriptionsfaktor aktiv.



**Abbildung 4: Brn3a-Expression auf mRNA- (4A) und Proteinebene (4B) in Keratinozyten, Fibroblasten, Melanozyten und Melanomzellen in unterschiedlichen Progressionsstadien (Hohenauer et al., 2013 [65]).**

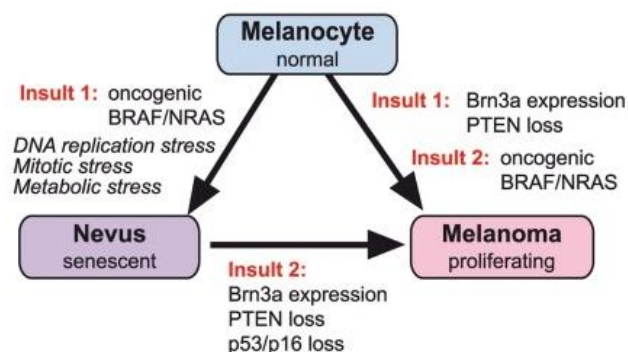
Zur Untersuchung der funktionellen Relevanz von Brn3a im Melanom, wurde die Expression durch Anwendung von siRNA gehemmt. Dabei wurde eine deutlich verminderte Zellvitalität um mehr als 50%, sowie eine veränderte Zellmorphologie in vitro beobachtet. In Zelllinien, die nur wenig Brn3a exprimieren, und in Melanozyten bestand dieser Effekt nicht. In vivo führte die Hemmung von Brn3a zu einer signifikanten Verlangsamung des Tumorwachstums.

Als Ursache der verminderten Zellvitalität wurde ein durch Brn3a-Hemmung verursachter Zellzyklusarrest mit konsekutiver Apoptose identifiziert. Die in der Literatur beschriebene Regulation der antiapoptischen Proteine Bcl2 und Bcl-xl durch Brn3a bestätigte sich im Melanom dabei jedoch nicht.

Ursächlich für den Zellzyklusarrest zeigte sich eine durch Brn3a-Hemmung induzierte Aktivierung und Akkumulation des Tumorsuppressors und Transkriptionsfaktors p53, welche eine Assoziation mit erhöhtem p21 aufwies. P21 ist für seine zellzyklusinhibierende Wirkung und als Zielgen von p53 im Melanom bekannt [66]. Der Zusammenhang zeigte sich durch eine Aufhebung des Zellzyklusarrests bei gleichzeitiger Hemmung von Brn3a und p53. Eine direkte Interaktion zwischen p53 und Brn3a, wie in der Literatur beschrieben [58, 67], bestätigte sich in Melanomzellen nicht. Als Mechanismus wird vielmehr eine Aktivierung von p53 durch Brn3a-induzierte DNA-Schädigung angenommen. Gestützt wird diese Annahme zum einen durch den Nachweis der Phosphorylierung von p53 an Ser15, Kennzeichen des sogenannten DNA damage signaling, und zum anderen durch nachgewiesene DNA-Schäden nach Brn3a-Inhibition.

Bei lentiviraler Überexpression von Brn3a in primären oder immortalisierten Melanozyten zeigte Brn3a onkogene Eigenschaften in Form eines vermehrten ankerunabhängigen Wachstums in Weichagar. Ankerunabhängiges Wachstum stellt einen wichtigen Schritt in der Tumorgenese dar (vgl. 2.1.2.). Ähnliche Beobachtungen wurden in Fibroblasten gemacht (welche Brn3a jedoch primär exprimieren), welche für zellübergreifende onkogene Eigenschaften von Brn3a sprechen.

Diese Eigenschaften alleine reichen aber für eine vollständige maligne Transformation der Zellen nicht aus. Versuche in vivo zeigten, dass Brn3a-exprimierende Melanozyten keine Tumoren bildeten. Bestanden jedoch bereits für ihr tumorigenes Potential bekannte Veränderungen in den Zellen (HRAS-transformierte Fibroblasten), zeigte sich nach Expression von Brn3a vermehrtes Tumorstadium. Insgesamt sprechen die Ergebnisse deutlich für onkogene Eigenschaften von Brn3a, welche in Kooperation mit bereits bekannten genetischen Veränderungen (RAS/RAF signaling) die maligne Transformation vorantreiben könnten.



**Abbildung 5: Brn3a und seine potentiellen Rollen in der Tumorgenese unter Berücksichtigung bereits bekannter onkogener Mechanismen** (nach Hohenauer et al., 2013 [65])

Mutationen in RAF oder RAS-Gen ohne weitere zelluläre Veränderungen führen, wie bereits oben für die BRAF<sup>V600E</sup>-Mutation beschrieben, zu einer Onkogen-induzierten Seneszenz (OIS), die eine weitere

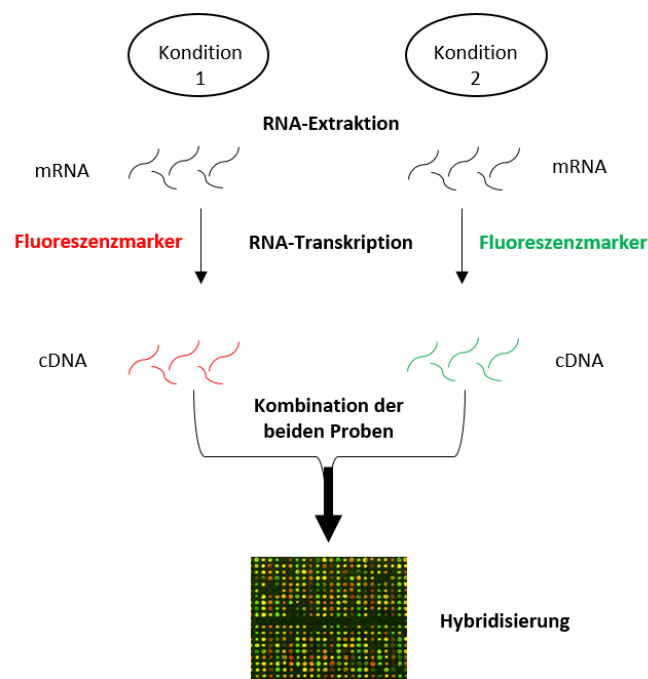
Transformation verhindert [30]. Brn3a konnte in Gewebeproben maligner Melanome nachgewiesen werden (etwa 50%), jedoch kaum in benignen Nävi (etwa 3%) [65]. Dies spricht dafür, dass es sich bei Brn3a um einen frühen Marker für Malignität handelt und er für die Überwindung der OIS relevant sein könnte. Bestätigt wurde diese Hypothese durch weitere Experimente. Die bei der Expression von BRAF<sup>V600E</sup> nachgewiesene DNA-Schädigung zeigte sich bei gleichzeitiger Brn3a-Expression deutlich vermindert, ebenso nachgewiesene Seneszenz-Marker wie beta-Galactosidase. Dazu passend zeigte sich eine Erhöhung der Proliferationsrate bei Co-Expression von BRAF<sup>V600E</sup> und Brn3a, welche mithilfe des Proliferationsmarkers Ki67 bestimmt werden konnte. Wurden die Zellen im Zeitverlauf beobachtet kam es bei alleiniger BRAF<sup>V600E</sup> Expression zu einem Proliferationsstopp für mindestens zwölf Tage. Bei zusätzlicher Expression von Brn3a zeigte sich dieser Effekt teilweise reversibel und die Zellen begannen wieder zu proliferieren. Die Hemmung von Brn3a bewirkt wie bereits oben beschrieben DNA-Doppelstrangbrüche, welche über die Aktivierung von p53 in Zellzyklusarrest und Apoptose resultieren. DNA-Doppelstrangbrüche wurden bereits in früheren Publikationen mit OIS in Verbindung gebracht [68, 69]. So könnte es sich bei beobachteter DNA-Schädigung nach Brn3a-Inhibition möglicherweise um Onkogen-induzierte DNA-Schädigung handeln, welche nicht mehr durch Brn3a unterdrückt wird. Zusammenfassend kommt Brn3a eine wichtige Rolle in der Entstehung und Progression des malignen Melanoms zu. Abbildung 5 veranschaulicht die für Brn3a beschriebenen Mechanismen als Onkogen [65].

### 2.3. Microarrays zur Genexpressionsanalyse

Seit jüngerer Zeit gibt es potente Methoden, um Gene zu identifizieren, deren Transkription z.B. durch Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Eine Technik, die zur Analyse von Brn3a herangezogen wurde ist die Microarray-Technik. Der Name Microarray leitet sich von den zwei Begriffen Microchip und Array ab. Letzteres bezeichnet in der Molekularbiologie die zweidimensionale Anordnung von Biomolekülen auf einer festen Oberfläche. Die Grundlage des Microarrays ist die spezifische Bindung (Hybridisierung) komplementärer Nukleinsäuresequenzen. Dabei werden bekannte Nukleinsäuresequenzen als Sonden auf einer Oberfläche immobilisiert. Komplementäre Nukleinsäuresequenzen (z.B. in Form von cDNA) binden an die jeweilige Sonde und können mithilfe von Fluoreszenzsignalen detektiert und quantifiziert werden. Aufgrund der hohen Dichte der Sonden im Array, erlaubt dieses Verfahren die gleichzeitige Analyse einer großen Anzahl an Proben (sogenannte Highthroughput-Technik). Auf einer etwa fingernagelgroßen Platte (aus Glas oder Silikon) können von einem Roboter mehrere tausend Sonden aufgetragen und immobilisiert werden.

Bei den Sonden wird meistens DNA eingesetzt, es sind aber auch Technologien mit RNA oder Proteinen verfügbar. Handelt es sich um einen DNA-Microarray liegt entweder ein Oligonukleotid- oder cDNA-Microarray vor. Bei ersterem werden Oligonukleotide als Sonden verwendet und je nach Art des Arrays unterschiedlich aufgetragen. Beim Affymetrix-Array werden Oligonukleotide an definierten Stellen der Microarray-Platte schrittweise aus Nukleotiden synthetisiert, d.h. es findet eine direkte „in situ Synthese“ statt. Die Sonden können aber auch, wie bei anderen Oligonukleotid- oder DNA-Chips, zuerst „ex situ“ synthetisiert und dann mittels Kontaktdruck- oder Tintenspritzdruck-Technik aufgebracht werden [70].

Mit DNA-Microarrays kann DNA oder RNA detektiert werden. Mit letzterer können Genexpressionsanalysen (gene expression profiling), einer der Hauptanwendungen dieser Technologie, durchgeführt werden. Die Bestimmung der mRNA (bzw. cDNA) ermöglicht dabei Rückschlüsse auf die transkriptionelle Aktivität eines Gens. Die Quantifizierung erfolgt über die Stärke des gemessenen Fluoreszenzsignals. Je stärker das Signal, desto größer ist die Menge an mRNA-Molekülen. Dieses Verfahren wurde auch in der vorliegenden Arbeit eingesetzt und soll daher im Folgenden näher beschrieben werden.



**Abbildung 6: Ablauf eines cDNA-Microarrays im two-channel Verfahren**

Die aus Proben isolierte RNA wird zunächst durch eine reverse Transkriptase in cDNA umgewandelt. Dabei wird die entstehende cDNA mit Fluoreszenzmarkern markiert, um später die Detektion zu ermöglichen. Die cDNA wird anschließend auf die mit Sonden beschichtete Oberfläche aufgebracht



und bindet dort komplementär an die passenden Sonden. Die Position und die Menge der hybridisierten cDNA-Moleküle werden durch Messen der Fluoreszenz bestimmt. Zuvor werden unspezifische gebundene Nukleinsäuren durch Waschvorgänge entfernt.

Beim two-channel-Verfahren werden zwei verschiedene Proben simultan auf einem Chip hybridisiert. Indem sie unterschiedlich markiert werden (z.B. rot und grün) können sie miteinander verglichen werden (z.B. gesundes und krankes Gewebe). Die Genexpression mit hoch- oder herabregulierten Genen wird mithilfe der relativen Intensität der Fluoreszenz in Verhältnis-basierten Analysen bestimmt. Dabei wird das Verhältnis eines verwendeten Fluoreszenzmarkers relativ zum zweiten gesetzt und daraus das Expressionslevel des Gens in der jeweiligen Probe ermittelt [71, 72].

Daneben existiert noch das one-channel-Verfahren. Hier findet keine gleichzeitige Hybridisierung statt, sondern es wird nur eine Probe/Kondition pro Chip analysiert. Somit stellt die Analyse der Fluoreszenzintensitäten ein Maß für die Hybridisierung einer Probe an die Sonden dar. Bei diesem Verfahren besteht somit kein direkter Vergleich zwischen zwei Proben auf einem Chip, es können jedoch die einzelnen Hybridisierungen auf unterschiedlichen Chips verglichen werden [73]. Aufgrund der Versuchsanordnung gelingt es mit dem two-channel-Verfahren leichter, technische Fehler in der Analyse zu minimieren (z.B. durch ungleich aufgetragene Mengen an Sonden), da beide Proben an der gleichen Sonde auf der Platte hybridisieren. Das one-channel-Verfahren hingegen bietet eine höhere Flexibilität und erlaubt auch den Vergleich von mehr als zwei Proben [74].

Abbildung 6 zeigt schematisch den Ablauf eines DNA-Microrarrays im two-channel-Verfahren.

### 3. Fragestellung und Zielsetzung dieser Arbeit

Für die Entwicklung neuer Therapieansätze sind Kenntnisse der molekularen Grundlagen einer Erkrankung von großer Wichtigkeit. Nur durch die Grundlagenforschung können, für die Entstehung und Progression des Melanoms essentielle, molekulare Mechanismen entschlüsselt und in Folge als Angriffspunkte neuer Therapien verwendet werden.

In Vorarbeiten des Labors wurde Brn3a als für die Melanomentstehung wichtiges neues Molekül identifiziert und seine Rolle in der Pathogenese näher beschrieben. Zu Brn3a ist bisher, wie bereits unter 2.2. beschrieben, erst wenig bekannt. Die Bedeutung von Brn3a im Melanom war zuvor noch nicht untersucht worden. In Bezug auf seine Zielgene als Transkriptionsfaktor fanden sich in der Literatur ebenfalls nur wenige Informationen.

Der Fokus dieser Arbeit sollte daher auf diesen bisher unbekanntem Zielgenen liegen. Durch seine Funktion als Transkriptionsfaktor lag die Schlussfolgerung nahe, dass sich die bereits gezeigten Wirkmechanismen meist nicht durch die direkte Wirkung von Brn3a erklären, sondern vielmehr über seine Zielgene vermittelt werden. Die transkriptionelle Aktivität von Brn3a im Melanom war zuvor bestätigt worden [65].

Die Identifizierung der Zielgene sollte genomweit über Genexpressionsanalysen mittels Microarray erfolgen. Die vielversprechendsten Kandidaten wurden im Anschluss auf eine mögliche Rolle in der Pathogenese des Melanoms hin untersucht. Das Ziel war es, Brn3a-regulierte Gene im Melanom zu identifizieren und sie auf ihre Funktion in diesem Tumor zu untersuchen und so neue Angriffspunkte für eine zielgerichtete Therapie zu erarbeiten.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Antikörper

##### 4.1.1.1. Primäre Antikörper

Tabelle 1: Primäre Antikörper

Anti-Brn3a	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Anti-Caspase-3	New England Biolabs (Frankfurt, D)
Anti-FAM129A (Anti-Niban)	Signalway Antibody (College Park, USA)
Anti-H2AX	Santa Cruz Biotechnology (Heidelberg, D)
Anti-p21	New England Biolabs (Frankfurt, D)
Anti-p53	New England Biolabs (Frankfurt, D)
Anti-TIMELESS	Abcam (Cambridge, UK)

##### 4.1.1.2. Sekundäre Antikörper

Tabelle 2: Sekundäre Antikörper

Anti-Maus IgG HRP-linked	New England Biolabs (Frankfurt, D)
Anti-Rabbit IgG HRP-linked	New England Biolabs (Frankfurt, D)

### 4.1.2. Apparative Ausstattung

Tabelle 3: Geräte

CO <sub>2</sub> -Inkubator Heracell	Heraeus (Hanau, D)
Durchflusszytometer FACScan	Perkin-Elmer (Waltham, USA)
Elektrophoresekammern und Zubehör	Biorad (München, D)
Entwickler für Röntgenfilme X-Omat	Kodak (Stuttgart, D)
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Zeiss (München, D)
Fluorimeter CytoFluor 2350	Millipore (Schwalbach, D)
Kameras Axiovision Mrc und Mrc 5	Zeiss (München, D)

GloMax Microplate Luminometer	Turner Biosystems (Sunnyvale, USA)
PCR-Gerät Robocycler™	Stratagene (Heidelberg, D)
Quantitatives PCR-Gerät Lightcycler™2.0	Roche (Mannheim, D)
Photometer SmartSpec 3000	Biorad (München, D)
Sterilwerkbank Herasafe	Heraeus (Hanau, D)
Tischzentrifuge (5415 C)	Eppendorf (Hamburg, D)
Tischzentrifuge, gekühlt (5810 R)	Eppendorf (Hamburg, D)
Zentrifuge, mitteltourig, gekühlt (RC5B)	Sorvall (Bad Homburg, D)
Zentrifugenrotoren (F16/250, SS34)	Sorvall (Bad Homburg, D)

### 4.1.3. Kommerziell erhältliche Komplettsysteme

Tabelle 4: Komplettsysteme

BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce (Schwerte, D)
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega (Mannheim, D)
DNeasy™ Blood and Tissue Kit	Qiagen (Hilden, D)
Lightcycler® TaqMan® Master	Roche (Mannheim, D)
QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent (Santa Clara, USA)
QIAprep™ Spin Mini Kit	Qiagen (Hilden, D)
RNeasy™ Mini Kit	Qiagen (Hilden, D)
Reverse Transcriptase	Roche (Mannheim, D)
ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix	Invitrogen (Karlsruhe, D)

### 4.1.4. Oligonukleotide

Primer für die sondenbasierte qRT-PCR wurden mithilfe des frei zugänglichen “Assay Design Center” von Roche ([https://lifescience.roche.com/en\\_de/brands/universal-probe-library.html](https://lifescience.roche.com/en_de/brands/universal-probe-library.html)) gestaltet. Eine ausführliche Beschreibung des Verfahrens findet sich im Methodenteil unter 4.2.3. Die den Primern entsprechenden Oligonukleotid-Sonden werden dabei automatisch von der Software ausgewählt. Small Interfering RNAs (siRNAs) wurden wie unter 4.2.1.3 angegeben hergestellt. Alle Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG (Ebersberg, D) und die passenden Oligonukleotid-Sonden von Roche bezogen.

#### 4.1.4.1. Primer

Tabelle 5: Primer qRT-PCR

Name	Vorwärts	Rückwärts	Sonde #
ADAM10	ATATTACGGAACACGAGAAGCTG	TCAATCGCTTTAACATGACTGG	61
Brn3a	ACTTCCACGGTGCCTCTG	GATGTGGTCCAGCAGATCG	77
C13orf27	TTGCAGGTGTTTTCTTGGA	ACAAATGAGACCCCGAACAA	9
ETS1	CCATCATCAAGACGGAAAAAG	TCTCTATGCTTTCAAAGAGTCCTG	50
FAM129A	ATGCTGTGGAGAGCTTATGAGAA	GGCTGGAAGAATTCGACATTTA	17
FOSL1	GGGCATGTTCCGAGACTTC	CATCTTCCAGTTTGTGAGTCTCC	26
GRK5	GGTGGGCACTGTTGGCTA	CTCAGGCCGTACCTCTGGT	50
HPRT	TGACCTGAATTTATTTGCATACC	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	73
MGST2	TTTCTCTGGCTGAGGAAGG	CTGCTGCCTGTGAGGAAGT	88
NETO2	CCGCTACCTCAGCCCTTCC	GGCAATCCCTTCCACTACC	1
NTN4	CTATCGTGACCTGCGGAGAC	TCCTACTGGATGGCAGGAAC	50
P21	CGAAGTCAGTTCCTTGTTGGA	CATGGGTTCTGACGGACAT	82
TIMELESS	AAGCCATGAAAACGAACAG	AATTCGCCAGAAGGTTTCCT	34
WNT5A	ATTGTAAGTGCAGGTGTACCTTAAAAC	CCCCCTTATAAATGCAACTGTTC	48

#### 4.1.4.2. Small Interfering RNAs (siRNAs)

Tabelle 6: Sequenzen der verwendeten siRNAs

Name	Gen	Sequenz
Brn3a 1	POU4F1	GCAAGAGCCAUCCUUUCAA
Brn3a 2	POU4F1	CCACGUACCACACGAUGAA
FAM129A 1	FAM129A	GAAAGUGUGUCCAGCUUAA
FAM129A 2	FAM129A	GAGAUACGUUGUAGUAAA
FAM 129 A 3	FAM129A	AGAGATACGTTGTAGTTAA
TIMELESS 1	TIMELESS	GGGCAGAGGAAGAAGAAGA
TIMELESS 2	TIMELESS	GGCCAUUGUUUCUGGUAUU
TIMELESS 3	TIMELESS	GUAGCUUAGUCCUUUCAA

#### 4.1.4.3. Oligonukleotide zur Herstellung von Genreporterplasmiden

Tabelle 7: Oligonukleotide zur Herstellung von Genreporterplasmiden

Brn3.01 sense	GATCTCTTCTGCTGAATTATAGTAGCCCCGCGGCTTCTGCTGAATTATAGTAGCCCA
Brn3.01 antisense	GATCTGGGCTACTATAATTCAGCAGAAGCCGCGGGGGCTACTATAATTCAGCAGAAGA

#### 4.1.4.4. Plasmide

Tabelle 8: verwendete Plasmide

Name	Vektor-Grundgerüst	Bezugsquelle	Beschreibung
pcDNA4to-control	pcDNA4/TO (Invitrogen, D)		Als Kontrollvektor bei Plasmid-Transfektionen verwendet
pLenti-control	pLenti6 (Invitrogen, D)		Als Kontrollvektor bei lentiviralen Transfektionen verwendet
Brn3a-WT	pcDNA4/TO (Invitrogen, D)	Prof. Eric Turner University of California at San Diego, USA	Expressionsvektor. Insert: vollständige Brn3a-cDNA unter Kontrolle eines CMV-Promotors.
pGI2-K-luc	pGI2-basic (Promega)		Kodiert für das Firefly-Luziferase Gen unter Kontrolle eines Prolaktin-Minimalpromotors
pGI2-Brn3.01-luc	pGI2-basic (Promega)		Kodiert für das Firefly-Luziferase Gen unter Kontrolle eines Prolaktin-Minimalpromotors mit zwei kanonisch inserierten Brn3a DNA-Bindestellen der Art Brn3.01 (Genomatix) gefunden im Promotor des Gens TIMELESS
pLenti-Brn3a	pLenti6 (Invitrogen, D)		Lentiviraler Vektor zur Expression von Brn3a
FAM129A-WT	pcDNA3.1	Haitao Ji, University of Texas (M.D. Anderson Cancer Center), USA	Expressionsvektor. Insert: vollständige FAM129A-cDNA unter Kontrolle eines CMV-Promotors
TIMELESS	CMVSPORT6	PlasmID Repository, Harvard Medical School	Expressionsvektor. Insert: vollständige TIMELESS-cDNA unter Kontrolle eines CMV-Promotors

WNT5A	CMVSPORT6	PlasmID Repository, Harvard Medical School	Expressionsvektor. Insert: voll- ständige TIMELESS-cDNA unter Kontrolle eines CMV-Promotors
-------	-----------	--	---

#### 4.1.5. Puffer und Lösungen

##### **Cold Spring Harbor (CSH)-Puffer zur Proteinpräparation (für 1ml)**

5x CSH-Stock	200 µl
- Tris pH7.4 (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)	250 mM
- NaCl (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)	1,25 M
- EDTA (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)	5 mM
- H <sub>2</sub> O bidest.	ad 20 ml.
10% Triton X100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	10 µl
7x Proteaseinhibitoren	150 µl
- 1 Tbl Complete Mini (Roche, Mannheim, D) auf 1,5 ml H <sub>2</sub> O	
10x Phosphataseinhibitoren	100 µl
- 1 Tbl PhosSTOP Phosphatase Inhibitor (Roche, Mannheim, D) auf 1 ml H <sub>2</sub> O	
H <sub>2</sub> O bidest. ad 1 ml	540 µl

##### **Reagenzien für Immunoblot nach Lämmli**

###### Laufpuffer (1.000 ml)

20x MES SDS Running Buffer (Invitrogen, Karlsruhe, D)	50 ml
H <sub>2</sub> O bidest.	950 ml
Antioxidans (Invitrogen, Karlsruhe, D)	0,5 ml

###### 1x Transferpuffer (500 ml)

20x Transferpuffer (Invitrogen, Karlsruhe, D)	25 ml
Methanol, absolut (Merck, Darmstadt, D)	50 ml
H <sub>2</sub> O bidest.	425 ml
Antioxidans (Invitrogen, Karlsruhe, D)	0,5 ml

#### 1x Blockierlösung (Roche, Mannheim, D)

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

#### 1x Waschpuffer (500 ml)

PBS	500 ml
Tween 20 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	0,5 µl

#### **Reagenzien für Bakterienzucht**

LuriaBroth (LB) -Medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	12,5 g/500 ml H <sub>2</sub> O, autoklaviert
Select-Agar (Invitrogen, Karlsruhe, D)	7,5 g/500 ml LB-Medium, autoklaviert
Ampicillin 100 mg/ml (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	1 µl/ml Medium oder Agar

#### **Reagenzien für FACS**

Reagenzien für Apoptose-FACS:

#### Annexin V -Färbung (Menge für 50 µl)

Annexin V Fluos (Roche, Mannheim, D)	1 µl
Färbepuffer	49 µl
- HEPES/NaOH pH 7,4 (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)	10 mM
- NaCl (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	140 mM
- CaCl <sub>2</sub> Sigma (Sigma-Aldrich, St.Louis, USA)	5 mM

#### Propidiumiodid-Färbelösung

Propidiumiodid (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	5 mg/ml in PBS
RNAse A (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	10 mg/ml in PBS
Waschpuffer	1% BSA in PBS, steril filtriert
Ethanol pro analysi (Merck, Darmstadt, D)	75% (in H <sub>2</sub> O bidest.)



### Reagenzien für Reportergenanalyse

5x Passive Lysis Buffer (Promega, Mannheim, D)

ATP Substrat (Biothema, Handen, S)

Luziferase Substrat (Biothema, Handen, S)

Coelentarazine (Promega, Mannheim, D) 1 µg zu lösen in 1 ml Methanol

### Alkoholische Lösungen (Merck, Darmstadt, D)

Chloroform

Ethanol (absolut, pro analysi)

Isopropanol

Glycerin (etwa 87%, pro analysi)

Methanol (gradient grade)

### RNase freies Wasser

0,1% (v/v) Diethylpyrocarbonat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in H<sub>2</sub>O bidest., autoklaviert

Puffer und Lösungen aus kommerziellen Komplettsystemen werden nicht detailliert aufgeführt.

## 4.1.6. Transfektionsreagenzien

**siRNA-Transfektion:** Lipofectamin™ RNAiMAX (Invitrogen, Karlsruhe, D)

**Plasmid-Transfektion:** FuGENE®6 (Roche, Mannheim, D).

## 4.1.7. Verbrauchsmaterialien

Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien

Einmalpipetten 5, 10, 25 ml	Greiner (Frickenhausen, D)
Einmalreaktionsgefäße (1,5 ml, 2,2 ml)	Eppendorf (Hamburg, D)
Einmalreaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Falcon (Heidelberg, D)
Einmalspritzen	GLW (Würzburg, D)
FACS-PE Röhrchen	Falcon (Heidelberg, D)

Kryoröhrchen	Falcon (Heidelberg, D)
Küvetten, 1 ml	Sarstedt (Nürnberg, D)
Objektträger	Schubert und Weiss (München, D)
Pasteurpipetten	Brand (Wertheim, D)
PCR Mikroreaktionsgefäße (0,5 ml)	Peqlab (Erlangen, D)
Petrischalen (für Bakteriologie)	Greiner (Frickenhausen, D)
Pipettenspitzen	Biozym (Hess Oldendorf, D)
Röntgenfilm (Hyperfilm ECL)	Amersham (Braunschweig, D)
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher&Schuell (Dassel, D)
Zellkulturflaschen (Fläche 75 cm <sup>2</sup> )	Nunc (Wiesbaden, D)
Zellkulturlochplatten (6-, 12-, 24- und 96-Loch)	Nunc (Wiesbaden, D)
Zellschaber	Costar (Bodenheim, D)

#### 4.1.8. Zellkulturmedien

##### Medium für Tumorzellen (TU 2%)

MCDB153 (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)	80%	400 ml
Leibovitz L-15 Gibco® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)	20%	100 ml
FKS (fötale Kälberserum, Biochrom, Berlin, D)	2%	11 ml
Rinderinsulin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)	5 µg/ml	0,5 ml
Calciumchlorid CaCl <sub>2</sub>	1,68 mM	0,42 ml

##### Medium für primäre Fibroblasten

DMEM 4,5 g/L Glukose (Biochrom, Berlin, D)  
10% FKS (Biochrom, Berlin, D)

##### Medium für primäre Keratinozyten

SFM (serumfreies Medium, Biochrom, Berlin, D)	500 ml
rEGF (rekombinanter epithelialer Wachstumsfaktor, Biochrom, Berlin, D)	15 µl
BPE (Kälberhypophysenextrakt, Biochrom, Berlin, D)	937,5 µl

### **Medium für primäre Melanozyten**

Medium 254CD (Invitrogen, Karlsruhe, D)	500 ml
CaCl <sub>2</sub> (Invitrogen, Karlsruhe, D)	500 µl
HMGS-2 (Invitrogen, Karlsruhe, D)	5 ml

### **Weitere Zellkultur-Lösungen**

HBSS (Hank's balanced salt solution, Invitrogen, Karlsruhe, D)  
Trypsin/EDTA (Invitrogen, Karlsruhe, D)  
0,2% EDTA in PBS (Apotheke Klinikum Großhadern, München, D)  
Penicillin/Streptomycin (Invitrogen, Karlsruhe, D)

## 4.2. Methoden

### 4.2.1. Zellkultur und zellbasierte Assays

#### 4.2.1.1. Melanomzellkultur

Die humanen Melanomzelllinien stellte uns freundlicherweise Prof. Dr. Meenhard Herlyn vom Wistar-Institut in Philadelphia (USA) zur Verfügung. Sie wurden im Melanomzellmedium TU 2 % (siehe 4.1.8.) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt in T75-Zellkulturflaschen kultiviert. Bei einer Konfluenz von ca. 80-90% wurden die Zellen mit 2 ml Trypsin zur weiteren Passagierung abgelöst. Nach Zugabe von Trypsin wurde die Reaktion nach ca. 2 min durch Zugabe von 3 ml TU 2 % abgestoppt. Das Lysat wurde anschließend in 15 ml Reagenzgefäße überführt und die Zellen bei 1.000 Umdrehungen pro Minute (rpm) über 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die sedimentieren Zellen wieder in TU 2% gelöst. Je nach Kulturdichte wurden die Zellen danach verdünnt und in Kulturflaschen ausgesät.

Für Transfektionsversuche wurden die Melanomzellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und zu 60-70% Konfluenz in Multilochplatten (6- oder 12-Loch, Nunc) in TU 2% ausgesät. Bis zur Verwendung wurden die Zellen dann bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt inkubiert.

#### 4.2.1.2. Zellkultur primärer Hautzellen (Keratinocyten, Fibroblasten, Melanozyten)

Primäre humane Fibroblasten wurden in Vollmedium (DMEM/10% FKS), humane Keratinocyten in serumfreiem Medium (SFM) mit Zusatz von rekombinantem epidermalen Wachstumsfaktor und Kälber-Hypophysenextrakt kultiviert. Primäre humane Melanozyten wurden in 254CF Medium unter Zusatz von HMGS-2 (Human Melanocyte Growth Supplement) kultiviert. Alle Zellen wurden in 75 ml Zellkulturflaschen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Bei Passagierung der einzelnen Zellarten wurde, bis auf die Verwendung des jeweiligen zellspezifischen Mediums, ebenso wie bei Melanomzellen vorgegangen.

#### 4.2.1.3. Hemmung der Genexpression mittels RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz stellt einen zelleigenen Mechanismus zum Schutz vor Virusinfektionen dar. Dass sich dieser Mechanismus auch nutzen lässt, um die Expression bestimmter Gene zu inhibieren wurde erstmals 1998 von Fire und Mello beschrieben [75]. Die RNA-Interferenz verläuft in zwei Schritten: Zuerst wird die doppelsträngige, zytoplasmatische RNA durch das Enzym Dicer in 21-23 Nukleotide (nt) lange RNA-Duplexe, die sogenannten „small interfering dsRNA“ (siRNA) zerteilt. Diese werden anschließend in den RNAi-induced Silencing Complex (RISC), einen Multiproteinkomplex, integriert und dienen dabei als Vorlage für die Bindung homologer RNAs, die im Folgenden gespalten und abgebaut werden.

Durch das Einschleusen künstlich hergestellter kurzer RNAs, die einer Dicer-gespaltenen RNA strukturell ähneln (sogenannte siRNAs), wird RNA-Interferenz ebenfalls getriggert. Durch die Auswahl geeigneter siRNAs kann so spezifisch eine körpereigene mRNA zerstört werden und ein bestimmtes Gen gezielt ausgeschaltet werden [76].

Die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs wurden mithilfe bereits publizierter Algorithmen erstellt [77, 78]. Um die Wahrscheinlichkeit unspezifischer Effekte, sogenannter off-target effects, möglichst gering zu halten, wurden meist zwei bis drei unterschiedliche siRNAs verwendet, die an unterschiedliche Stellen der Ziel-mRNA binden.

Die Transfektion der siRNAs wurde dabei wie folgt durchgeführt: Zellen wurden zu 60-70% Konfluenz einen Tag vor der Transfektion in 6-Loch-Kulturplatten ausgesät. 1,25 µl der siRNA (20 µM) wurden in 125 µl serumfreiem Medium (Opti-MEM®, Invitrogen) in einem 2 ml Reaktionsgefäß verdünnt. In einem weiteren 2 ml Reaktionsgefäß wurden im gleichen Volumen Opti-MEM® 1,25 µl Lipofectamin RNAiMax (Invitrogen) verdünnt. Beide Lösungen inkubierten 5 min bei Raumtemperatur und wurden

im Anschluss langsam gemischt. Zur Komplexierung der siRNA folgte eine weitere Inkubation für 15-20 min bei Raumtemperatur. Währenddessen wurde das Medium der zu transfizierenden Zellen abgenommen und durch 1,25 ml frisches Kulturmedium ersetzt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die in 250 µl serumfreien Medium komplexierten siRNAs in die einzelnen Löcher der Kulturplatte tröpfchenweise zugegeben. Die Endkonzentration jeder siRNA betrug somit 20 nM in einem Volumen von 1,5 ml. Die Effizienz der verwendeten siRNAs wurde durch qRT-PCR überprüft.

#### 4.2.1.4. Transiente Genexpression mittels Plasmid-Transfektion

Zur transienten ektopischen (Über-)Expression von Proteinen wurden die entsprechenden Plasmidvektoren verwendet (siehe 4.1.4.4). Die verwendeten Plasmide mit ihrem entsprechenden Grundgerüst, Insert und Promoter sind unter 4.1.4.4. aufgeführt.

Die Transfektion von Vektoren wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt: 3 µl FuGENE®6 Transfektionsreagenz (Roche) wurden in 50 µl Opti-MEM® verdünnt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde 1 µg des jeweiligen Plasmids zugegeben und das Transfektionsgemisch zur Komplexierung 30 min bei RT inkubiert. Zellen wurden zu 60-70% Konfluenz am Tag vor dem Versuch in 6-Loch-Kulturplatten ausgesetzt. Das Kulturmedium wurde durch 950 µl frisches Medium ersetzt und der Transfektionsansatz tröpfchenweise zugegeben. Nach 24 h wurde das Medium gewechselt und die Zellen bis zur weiteren Analyse bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### 4.2.1.5. Stabile Brn3a-Expression in Melanozyten

In primären Zellen, vor allem Melanozyten, gelingt die Proteinexpression nach transientser Plasmidtransfektion nur unzureichend. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit auf die lentivirale Transduktion von Brn3a zurückgegriffen. Hierbei wird das Expressionskonstrukt stabil in das Genom integriert und damit eine dauerhafte Expression gewährleistet. Zur Herstellung der Lentiviren wurden vier Millionen 293FT-Zellen in DMEM/10% FKS in 10 cm-Zellkulturschalen ausgesetzt. Am folgenden Tag wurden 5 µg FuGENE®6-komplexierter Vektor zusammen mit dem ViraPower™ Lentiviral Packaging-Mix (Invitrogen) nach den Angaben des Herstellers Ko-transfiziert. Der Transfektionsansatz war wie folgt:

- pLenti-Brn3a oder pLenti-control 5 µg
- ViraPower™ Lentiviral Packaging Mix 5 µg
- FuGENE®6 35 µl
- Opti-MEM® 500 µl

Zunächst wurden 35 µl FuGENE®6 in 500 µl serumfreiem Medium verdünnt, es folgte eine 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Anschließend wurden Vektor und Packaging-Mix zugegeben und das Transfektionsgemisch zur Komplexierung 30 min bei RT inkubiert. Zwischenzeitlich wurde das Kulturmedium der 293FT-Zellen durch 6 ml frisches Kulturmedium ersetzt. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurde der Transfektionsansatz zugegeben. Ein erneuter Mediumwechsel erfolgte nach 17 h. Nach weiteren 48 h wurden die Virenüberstände geerntet, durch 0,2 µm Sterilfilter filtriert und bei -80° C eingefroren.

Melanozyten wurden am Tag vor der Infektion zu 60-70% in 6-Lochplatten ausgesät. Es erfolgte dann die Infektion mit 1 ml Virenüberstand mit einer Wiederholung der Infektion nach 24 h.

Die infizierten Zellen wurden im Anschluss für weitere 24 h bei 37° C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bevor sie für Experimente verwendet wurden.

## 4.2.2. Arbeiten mit Nukleinsäuren

### 4.2.2.1. Plasmid-DNA

#### 4.2.2.1.1. Transformation von Bakterien

Zur Vervielfältigung der Plasmid-DNA erfolgte zunächst die Transformation des Vektors in Bakterien. Hierzu wurden 200 µl chemisch kompetente One Shot Stbl3-Bakterien (Invitrogen) auf Eis angetaut, mit 10 ng Plasmid-DNA vermengt und 10 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde das Gefäß für 90 Sekunden im Wasserbad auf 42°C erhitzt und danach unmittelbar für 2 min auf Eis abgekühlt. Es erfolgte die Zugabe von 800 µl LB-Medium und die Bakteriensuspension wurde eine Stunde bei 37°C im Schüttler (300 rpm) inkubiert. Auf Selektionsagarplatten (Antibiotikum je nach verwendetem Plasmid) wurden 50-100 µl der Suspension ausplattiert über Nacht im Brutschrank inkubiert. Je Platte wurden am nächsten Tag dann fünf Kolonien entnommen und in 5 ml mit Antibiotikum versetztem LB-Medium gelöst. Nach Wachstum der Bakterien in der Lösung wurden Glycerolstocks (800 µl Bakterien-suspension + 200 µl Glycerol) angelegt und bei -80°C gelagert.

#### 4.2.2.1.2. Präparation von Plasmid-DNA

Die Gewinnung von Plasmid-DNA erfolgte aus den zuvor angelegten Glycerolstocks. Hierzu wurde 5 ml LB-Medium in Reagenzgefäße gefüllt und mit Bakterien aus dem jeweiligen Glycerolstock versetzt. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht. Am nächsten Morgen wurden jeweils 250-500 µl der dadurch erhaltenen Bakterienkulturen in 250 ml mit Antibiotikum versetztes LB-Medium gegeben und erneut über 16 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Bakterien wurden anschließend durch Zentrifugation

pelletiert. Die Pellets wurden bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert oder es erfolgte die sofortige Isolation der DNA mit dem QIAprep™ Spin Mini Kit von Qiagen. Die Pellets wurden in Lysepuffer aufgenommen und laut Herstellerangaben über die Säulen aufgereinigt.

#### 4.2.2.2. Präparation von Ribonukleinsäuren (RNA)

Zur Gewinnung von Ribonukleinsäuren (RNA) wurden in 6-Loch-Kulturplatten kultivierte Zellen zunächst zweimal mit HBSS gewaschen. Durch die anschließende Zugabe von QIAzol® (Quiagen), welches Phenol sowie den RNase-Inhibitor Guanidinisothiocyanat enthält, wurden die Zellen unter gleichzeitiger Stabilisierung der RNA lysiert. Das Lysat wurde danach für 5 min bei RT inkubiert, im Folgenden mit einem Zellschaber von der Kulturplatte abgelöst und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform, welches durch 15 sekundenlanges Schütteln mit den Lysaten vermischt wurde. Es schloss sich eine erneute 5-minütige Inkubation bei Raumtemperatur bis zur Auftrennung des Gemisches in unterschiedliche Phasen an. Zur kompletten Trennung der Phasen wurden die Proben 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die oberste wässrige Phase wurde im Anschluss mit einer Pipette abgenommen und in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Dort erfolgte dann die Zugabe von 700 µl 70%igem Ethanol. Das weitere Vorgehen zur vollständigen Isolation der RNA entsprach den Herstellerangaben des verwendeten kommerziellen Komplettsystems RNeasy Mini Kit (Qiagen). Isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

#### 4.2.2.3. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Für die Konzentrationsbestimmung der präparierten DNA und RNA wurde das Smartspec 3000 Photometer verwendet. Für die photometrische Messung wurden die Proben 1:20 in H<sub>2</sub>O/DEPC verdünnt und in Quarzküvetten überführt. Über die Messung der Extinktion der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde die Konzentration der Lösung berechnet. Dabei galten folgende Grundsätze: eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht bei doppelsträngiger DNA einer Konzentration von 50 ng/µl, bei RNA einer Konzentration von 40 ng/µl. Für die Berechnung ergab sich demnach folgendes: Konzentration DNA (ng/µl) = OD bei 260 nm \* Verdünnungsfaktor 20 \* 50 ng/µl  
Konzentration RNA (ng/µl) = OD bei 260 nm \* Verdünnungsfaktor 20 \* 40 ng/µl. Um eine mögliche Verunreinigung der Probe mit Proteinen oder Lösungsmitteln zu erkennen, erfolgte zudem die Bestimmung der Extinktion bei 280 nm (hier besteht aufgrund aromatischer Aminosäurereste das Absorptionsmaximum von Proteinen). Das Verhältnis der OD<sub>260</sub> zur OD<sub>280</sub> kann genutzt werden, um

den Grad der Verunreinigung einer Probe durch Alkohol und Reste zu bestimmen. Ein Verhältnis von 1,8 gibt eine hinreichend reine DNA-Isolierung, ein Verhältnis von 2,0 eine reine RNA-Isolierung an. Ist die Nukleinsäure-Lösung kontaminiert, so ist der Wert kleiner. Eine Ratio von 1,6-2,0 wurde für alle Proben als ausreichende Qualität der Probe angesehen.

### 4.2.3. Quantifizierung der Genexpression mittels qRT-PCR

#### 4.2.3.1. Reverse Transkription von mRNA

Zur Quantifizierung der Genexpression wurde das Verfahren der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR) angewendet. Aufgrund der Verwendung spezifischer DNA-Polymerasen, welche nicht in der Lage sind RNA zu amplifizieren, muss die isolierte RNA zunächst in cDNA umgeschrieben werden. Dazu kommt eine Reverse Transkriptase (RT), eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, zum Einsatz. Die Bindung des Oligo dT (p(DT)<sub>15</sub>-Primers (Eurofins MWG) an den für mRNA typischen poly-A Schwanz des 3'-Endes ermöglicht es der Reversen Transkriptase eine Kopie der mRNA zu erstellen. Dabei wurde folgendermaßen vorgegangen:

1 µg präparierte RNA wurde mit 500 ng Oligo dT-Primer in einem Gesamtvolumen von 9,5 µl 10 min lang bei 65° C inkubiert, um eine vollständige Denaturierung der RNA zu erreichen.

Anschließend wurden First Strand Buffer, Dithiothreitol (DTT), Natrium-Desoxyribonukleosidtriphosphate (Na-dNTPs), RNAsin (Rekombinanter RNAsin RNase-Inhibitor) und das Enzym Reverse Transkriptase zu einem Gesamtreaktionsvolumen von 20 µl hinzugefügt und der Reaktionsansatz eine Stunde bei 42° C inkubiert. Der 20 µl-Ansatz wurde dann mit H<sub>2</sub>O/DEPC auf 60 µl Gesamtvolumen aufgefüllt und je 3 µl in die qRT-PCR eingesetzt oder bei -80° C aufbewahrt.

Alle verwendeten Reagenzien wurden von Roche (Mannheim, D) bezogen.

#### **RNA Denaturierung:**

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

#### **Erststrangsynthese:**

5x First Strand Buffer	4,0 µl
0,1 M DTT	2,0 µl
10 mM Na-dNTPs	2,0 µl



RNAsin	0,5 µl
Reverse Transkriptase	1,0 µl
Gesamt	10,5 µl
Gesamtvolumen:	20,0 µl

#### 4.2.3.2. Quantitative Echtzeit-PCR (qRT-PCR)

Das Prinzip der quantitativen Echtzeit-PCR entspricht dem der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Durch die Herbeiführung einer Lichtreaktion (durch Verwendung fluoreszierender, in die DNA interkalierender Farbstoffe oder fluoreszenzmarkierter Sonden) wird jedoch neben der Vervielfältigung der Nukleinsäuren auch eine Quantifizierung der entstehenden PCR-Produkte ermöglicht. Die Fluoreszenzreaktion wird dabei nach jedem einzelnen PCR-Zyklus erfasst. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu und erlaubt somit die Quantifizierung der Amplifikation der Ausgangs-DNA in Echtzeit. Zur Bestimmung der Menge des PCR-Produktes wird die exponentielle Phase in der PCR-Reaktion herangezogen. In dieser Phase ist die Amplifikation optimal und wird durch keine Störfaktoren limitiert. Zu Beginn der Reaktion liegt nur wenig Template-DNA vor, so dass die Wahrscheinlichkeit für ein Zusammentreffen von Template, Primern und DNA-Polymerase geringer als in der exponentiellen Phase ist. Zum Ende der Reaktion kommt es durch das entstehende Reaktionsprodukt und Nebenprodukte sowie durch den Verbrauch von DNA-Polymerase und dNTPS zu einer Hemmung der Reaktion.

Den Anfang der exponentiellen Phase der Reaktion kennzeichnet der sogenannte Threshold Cycle ("Schwellenwert-Zyklus"), auch CT-Wert oder auch „Crossing Point“ (CP) genannt. In dem mit diesen Begriffen bezeichneten Amplifikationszyklus übersteigt das Fluoreszenzsignal erstmals die Hintergrund-Fluoreszenz. Bei jeder Reaktion werden zusätzlich zu den zu untersuchenden Proben auch Proben mit einer bekannten Konzentration in einer Verdünnungsreihe amplifiziert, woraus im Anschluss dann eine Standardkurve für die Reaktion generiert werden kann. Dadurch kann mithilfe des CT-Werts der Probe die relative Menge an amplifizierter cDNA zum Standard bestimmt werden.

Als Referenz wird zusätzlich zum Zielgen außerdem ein sogenanntes Referenzgen gemessen. Wichtiges Kennzeichen dieses auch als „Housekeeping“-Gen bezeichneten Gens ist eine ubiquitäre und keine größeren Schwankungen unterliegende Expression in der Zelle. Zur Normierung wird es mit dem Zielgen verrechnet um Unterschiede in der eingesetzten cDNA-Menge oder cDNA-Qualität auszugleichen. Es handelt sich dabei um eine relative Quantifizierung, da nur ein relativer Vergleich verschiedener PCR-Ansätze, nicht jedoch die Bestimmung absoluter Mengen ermöglicht wird. In

vorliegender Arbeit wurde als Referenzgen die Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) verwendet, ein Enzym des Purinstoffwechsels.

Um die oben beschriebene Lichtreaktion zu erzeugen, wurden kurze LNA (locked nucleic acids)-haltige Hybridisierungssonden der Firma Roche verwendet. Dabei handelt es sich um Nucleinsäuren, deren Zuckeranteil chemisch modifiziert wurde. LNA-Sonden weisen eine höhere Bindungsaffinität als die natürlich vorkommenden Varianten auf. Zudem bewirkt die chemische Modifikation, dass die nur neun Nucleotide langen LNA-Sonden bei ungefähr gleicher Temperatur wie die längeren Primer (20-25nt) an die DNA hybridisieren können. Die Sonden sind am 5'-Ende mit Fluorescein und am 3'-Ende mit einem sogenannten Quencher gekoppelt, welcher die Lichtemission nach Anregung des 5'-Fluorophors zunächst unterdrückt. Die in der qRT-PCR verwendete DNA-Polymerase verfügt über eine 5'-3'-Exonuklease-Aktivität. Während der Amplifikation der Ausgangs-DNA wird die Sonde durch diese abgebaut und Fluorophor und Quencher damit räumlich voneinander getrennt. Der Quencher kann die Lichtemission nicht mehr unterdrücken und das Fluoreszenzsignal kann detektiert werden. In dieser Arbeit wurden für die qRT-PCR geeignete Hybridisierungssonden und Primer-Paare mithilfe der frei zugänglichen Online-Software „Assay Design Center“ der Firma Roche ([www.universalprobelibrary.com](http://www.universalprobelibrary.com)) ausgewählt (siehe 4.1.4.1). Wenn möglich wurde dabei unter den aufgeführten Möglichkeiten ein intronübergreifender Ansatz (Intron-spanning-Assay) ausgewählt. Dieser minimiert das Risiko einer Kontamination durch genomische DNA indem Primer an mRNA-Abschnitte binden, welche aus zwei aufeinanderfolgende Exons des Gens stammen.

Unter Verwendung des Lightcycler® TaqMan® Master-Kits von Roche wurde für alle Reaktionen folgender Ansatz verwendet:

H <sub>2</sub> O	4,5 µl
Sonde	0,1 µl
PCR Primer (je 10 µM)	0,2 µl
Reaction Master Mix (mit Enzym)	2,0 µl
cDNA (100 ng)	3,0 µl
Gesamt	10 µl

Die Reaktion erfolgte dann unter unten aufgeführten Bedingungen im Lightcycler™2.0 von Roche.

Initiale Denaturierung	1 Zyklus	94°C/10 min		
Amplifikation/Quantifizierung	45 Zyklen	94°C/10 sek,	60°C/30 sek,	72°C/1 sek
Abkühlung auf 40° C		0,1°C/sek		

Die relative Quantifizierung erfolgte unter Verwendung der LightCycler® Software. Diese errechnete die relative Menge an Ausgangsmaterial in Bezug zum verwendeten Standard. Anschließend erfolgte die Normierung auf die Expression des „Housekeeping“-Gens HPRT.

#### 4.2.4. Microarray

Die in dieser Arbeit verwendeten Microarray-Analysen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Johannes Beckers am Institut für Experimentelle Genetik (IEG) des Helmholtz Zentrums Neuherberg durchgeführt. Es wurden Bead-Chips der Firmen Affymetrix (Santa Clara, USA) und Illumina (Arnsberg, D) verwendet. Die für die Microarrays verwendete RNA von Melanomzellen und Melanozyten wurde mithilfe des RNeasy™ Mini Kit (Qiagen) isoliert und nach photometrischer Bestimmung der Konzentration an das IEG übergeben.

#### 4.2.5. Proteinbiochemische Verfahren

##### 4.2.5.1. Proteinisolation

Zur Isolation des Gesamtzellproteins wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit PBS/0,2% EDTA bei 37° C vom Boden der Zellkulturschale abgelöst. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Vollmedium (DMEM/10% FKS) gestoppt und die Zellen 5 min bei 2600 rpm und 4°C zentrifugiert. Es folgte noch zwei weitere Waschvorgänge mit 1 ml PBS und die anschließende Zugabe von 50 µl 1x CSH-Puffer zur Zelllyse (siehe 4.1.5.). Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (20 min, 13200 rpm, 4°C), um den Zelldebris vom Rest des Ansatzes abzutrennen. Der entstehende Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und entweder sofort verwendet oder bis zur weiteren Verwendung bei – 80°C gelagert.

##### 4.2.5.2. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration erfolgte unter Verwendung des Pierce BCA Protein Reagent Kits (Thermo Fisher Scientific). Das Reagenz enthält zweiwertige Kupferionen, welche von Protein im alkalischen Milieu zu einwertigen Kupferionen reduziert werden. Diese bilden mit der ebenfalls im Kit enthaltenen Bicinchoninsäure (BCA) einen violetten Farbstoff, ein Chelat-Komplex aus zwei BCA-Molekülen und einem Molekül einwertigen Kupfers. Die Absorption des Farbstoffes kann dann bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch bestimmt werden. Die im Kit enthaltenen Reagenzien A und B wurden im Verhältnis 1:50 gemischt. Anschließend wurde 1 ml dieser Lösung in Halbmikroküvetten pipettiert und je 10 µl Proteinlysatz zugegeben. Es folgte eine kurze Vermischung der Proben (Vortex) und nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss konnte die Konzentration bei einer Wellenlänge von 562 nm photometrisch bestimmt werden. Zur

Berechnung der Proteinkonzentration wurde eine Eichgerade aus in 1x CSH-Lysepuffer verdünntem bovinen Serumalbumin (BSA, New England Biolabs, 10 mg/ml) in Verdünnungsschritten von 80, 40, 20, 10, 5 und 2,5 mg/ml herangezogen. 10 µl CSH-Lysepuffer dienten als Referenz für den Nullwert.

#### 4.2.5.3. Immunoblot nach Lämmli

Zum Nachweis der Expression spezifischer Proteine und ihrer Quantifizierung wurde als Verfahren der Immunoblot nach Lämmli angewendet [79]. Die wie unter 4.2.5.1 beschriebenen isolierten Proteine wurden dabei in einem 4-12% Acrylamid-Gel der Firma Invitrogen (NuPAGE® Novex 4-12% Bis Tris Gel, 1,0 mm, 10 Taschen) nach Größe und Ladung aufgetrennt. Zur Vorbereitung der Proben wurde das XCell SureLock™ Mini-Cell System von Invitrogen verwendet. Die Aufbereitung lief dabei folgendermaßen ab: 10 µg Gesamtprotein wurden mit deionisiertem Wasser, 6 µl NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) und 2,4 µl NuPAGE® Reducing Agent (10X) zu einem Gesamtvolumen von 24 µl vermischt und 10 min bei 70°C denaturiert. Währenddessen wurden die vorgefertigten Gele mit H<sub>2</sub>O bidest. und anschließend mit Laufpuffer abgespült und in die Geltaschen zweimalig Laufpuffer infiltriert. Danach wurden 20 µl der so präparierten Proben in jeweils eine Tasche des Gels geladen. Zusätzlich wurden 15 µl des SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard als Größenstandard mit aufgetragen. Die Laufzeit des Gels entsprach ca. 40 min, wobei eine konstante Spannung von 150 Volt (V) angelegt wurde. In die innere Kammer wurden vor dem Lauf 200 ml 1x MES SDS Running Buffer (Invitrogen) gefüllt und mit 500 µl NuPAGE® Antioxidant versetzt. Die äußere Kammer wurde mit 800 ml 1x MES SDS Running Buffer aufgefüllt.

Die nach Größe und Ladung aufgetrennten Proteine wurden im Anschluss mittels Elektroblot auf Invitrolon® PVDF-Membranen der Firma Invitrogen transferiert. Hierfür wurde das XCell II Modul der Firma Invitrogen verwendet. Die Blotting-Pads (Invitrogen) sowie das Filterpapier (Invitrogen) wurden zunächst in 1x Transfer-Puffer (1x NuPAGE® Transferpuffer (20x), 0,1% NuPAGE® Antioxidant, 10% Methanol für den Transfer von einem Gel bzw. 20% Methanol für den Transfer von zwei Gelen) eingeweicht. Anschließend wurden die Bestandteile folgendermaßen angeordnet: Kathode - Zwei Pads – Filterpapier – Gel – Membran – Filterpapier – Pad – Gel – Membran – Filterpapier – zwei Pads – Anode. Die innere Kammer wurde mit 1x Transferpuffer, die äußere Kammer zur Kühlung mit Wasser befüllt. Der Elektroblot lief über 70 min mit konstanter Spannung von 30 V.

Zur Detektion spezifischer Proteine kamen primäre Antikörper zum Einsatz (siehe 4.1.1.1). Zunächst wurden die Membranen eine Stunde lang in Blockierlösung (Roche) eingelegt um unspezifische Bindungen des primären Antikörpers zu minimieren. Die verwendeten primären Antikörper wurden je nach Herstellerangaben in Blockierlösung (Roche) oder 5% BSA in PBS/0,1% Tween 20 verdünnt und

über Nacht bei 4° C unter leichtem Schütteln hybridisiert. Am nächsten Tag folgten drei Waschgänge je 10 min mit PBS/0,1% Tween 20 und die anschließende Zugabe des Sekundärantikörpers (siehe 4.1.1.2). Die Koppelung des Sekundärantikörpers an die Horse Raddish Peroxidase (HRP) erlaubte die spätere Detektion. Der in Blockierlösung verdünnte Sekundärantikörper inkubierte unter leichtem Schütteln für eine Stunde bei Raumtemperatur auf der Membran. Im Anschluss folgten drei weitere Waschgänge. Für die Lichtreaktion wurden Membranen mit 2 ml Enhanced Chemoluminescence (ECL) Plus Western Blotting Detection Reagent (Amersham) für 5 min im Dunkeln inkubiert. Die Detektion erfolgte mittels ECL Hyperfilm-Filmen der Firma GE Healthcare. Entwickelt wurden die belichteten Filme mit einem X-omat 1000-Gerät (Kodak).

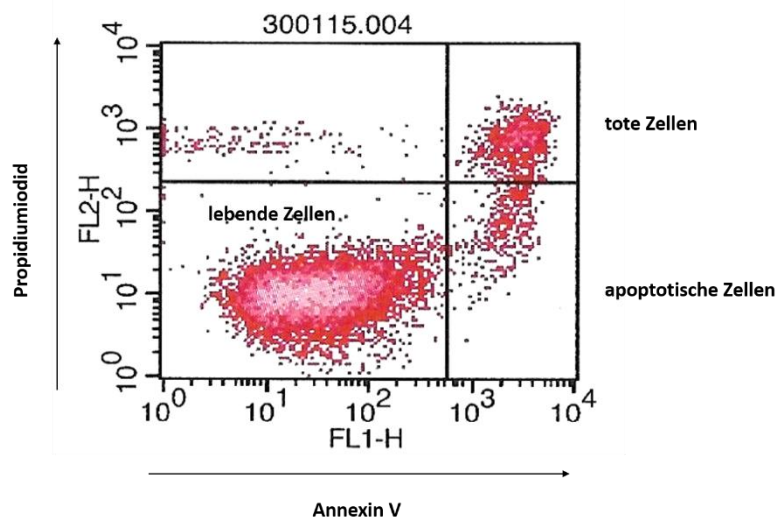
#### 4.2.6. Cell Titer Blue®: Bestimmung der Zell-Vitalität

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde der CellTiter-Blue® Cell Viability Assay von Promega verwendet. Es handelt sich dabei um einen fluoreszenzbasierten Assay, welcher die relative Quantifizierung vitaler Zellen über die Zugabe einer resazurinhaltenen Pufferlösung erlaubt. Bei Resazurin handelt es sich um einen Farbstoff, der als Redox- und pH-Indikator eingesetzt wird. Die dunkelblaue oxidierte Form des Farbstoffes wird von vitalen Zellen mit intaktem Metabolismus zu einer rötlichen Verbindung (Resafurin) reduziert. Die dadurch bedingte Veränderung des Absorptionsmaximums von 600 nm nach 560 nm kann photometrisch bestimmt werden und gibt somit Aufschluss über den Anteil vitaler, stoffwechselaktiver Zellen. Für die Durchführung des Assays wurde das Kulturmedium von Zellen in einer 6-Loch-Kulturplatte durch 750 µl frisches Medium ersetzt. Gleichzeitig wurden 150 µl CellTiterBlue®-Reagenz hinzugefügt und durch kurzes Schütteln gleichmäßig verteilt. Der Reaktionsansatz wurde anschließend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 60 min wurden 100 µl der Probe in eine 96-Loch-Zellkulturplatte überführt. Als Referenzwert diente ein Ansatz aus 750 µl sterilem Kulturmedium und 150 µl CellTiterBlue®-Reagenz. Die anschließende Messung wurde an einem CytoFluor 2350 Fluorimeter der Firma Millipore bei einem Absorptionsmaximum von 560 nm und einem Emissionsmaximum von 590 nm durchgeführt.

## 4.2.7. Durchflusszytometrie (FACS)

### 4.2.7.1. Quantifizierung apoptotischer Zellen

Bei der Durchflusszytometrie können Zellen mithilfe unterschiedlicher Marker quantifiziert werden. Zur Bestimmung apoptotischer Zellen wurden zwei verschiedene Farbstoffe, Annexin V und Propidiumiodid, verwendet, um zwischen toten und sich in der Apoptose befindenden Zellen zu unterscheiden. Während der Apoptose wechselt das Phospholipid Phosphatidylserin, ein Baustein der eukaryotischen Doppelmembran, von der zytoplasmatischen auf die extrazelluläre Seite. Das Protein Annexin V bindet an extrazelluläres Phosphatidylserin. Durch den Einsatz von Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-gekoppelten Annexin V können so apoptotische Zellen fluoreszenzmarkiert werden und nach einer Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm durchflusszytometrisch gemessen werden. Da es beim natürlichen Zelltod (der Nekrose) zur Zerstörung der Membranintegrität kommt und Annexin V somit auch an intrazelluläres Phosphatidylserin binden kann, kommt ein zweiter Farbstoff zum Einsatz. Propidiumiodid interkaliert unspezifisch in doppelsträngige DNA im Zellinnern. Dies gelingt jedoch nur bei abgestorbenen Zellen, da Propidiumiodid bei lebenden Zellen die intakte Zellmembran nicht



**Abbildung 7: Quantifizierung apoptotischer Zellen mittels FACS-Analyse.** Apoptotische Zellen (Annexin-V-positiv, PI-negativ) finden sich im rechten unteren, tote Zellen (Annexin-V- und PI-positiv) im rechten oberen Quadranten. Intakte Zellen lassen sich weder mit Annexin-V- noch mit PI anfärben und sind im linken unteren Quadranten dargestellt.

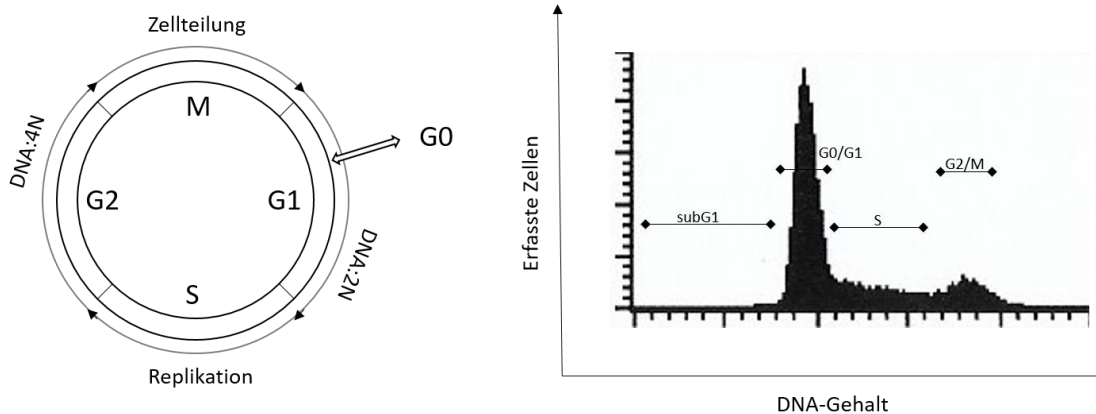
überwinden kann. Lassen sich Zellen sowohl mit Annexin V als auch mit Propidiumiodid anfärben kann nicht mehr unterschieden werden, ob der Zelltod durch Apoptose oder Nekrose bedingt war.

In 6-Loch-Platten kultivierte adhärente Zellen wurden mit PBS gewaschen, durch Zugabe von Trypsin von der Kulturschale abgelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach zwei Waschgängen mit PBS (Zentrifugation bei 2.600 rpm und 4 °C für 3 min) wurden die sedimentierten Zellen in 50 µl

Annexin-Färbelösung aufgenommen und im Anschluss für 15 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. 1 µl FITC-markiertes Annexin V wurde pro 50 µl Annexin-Färbelösung zugegeben. Nach Inkubation wurden weitere 50 µl Färbepuffer, mit 10 µl PI versetzt, zugegeben. Die Messung erfolgte in einem FACScan-Durchflusszytometer der Firma Perkin-Elmer.

#### 4.2.7.2. FACS zu Zellzyklusanalyse

Die Tatsache, dass der Farbstoff Propidiumiodid unspezifisch in doppelsträngiger DNA interkaliert, kann zur Analyse des Zellzyklus genutzt werden. Propidiumiodid lagert sich im Abstand von ca. fünf Basenpaaren an die DNA an, wodurch sich das Absorptionsmaximum von Propidiumiodid von 488 nm nach 535 bzw. das Emissionsmaximum von 590 nm nach 617 nm verschiebt. Zudem steigert sich die Intensität des emittierten Lichts um das 20- bis 30-fache. Über diesen Mechanismus können Rückschlüsse auf den intrazellulären DNA-Gehalt und damit die vorliegende Zellzyklusphase gezogen werden. Abbildung 8 verdeutlicht den Zusammenhang zwischen den einzelnen Phasen des Zellzyklus und dem aus der FACS-Analyse resultierendem Diagramm. Zum besseren Verständnis werden hier nochmals kurz die einzelnen Phasen des Zellzyklus näher erläutert.



**Abbildung 8: Schematische Abbildung der Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodidfärbung und Durchflusszytometrie.** Links sind die einzelnen Phasen des Zellzyklus dargestellt, rechts das Histogramm einer Zellzyklus-FACS-Analyse. In Abhängigkeit des DNA-Gehalts der Zellen (einfacher bzw. doppelter Chromosomensatz) lassen sich Rückschlüsse auf die Anzahl der sich in den einzelnen Phasen befindlichen Zellen ziehen.

Nach der Teilung tritt die eukaryotische Zelle in den ersten Teil der Interphase, genannt Gap1 (G1)-Phase ein und weist einen einfachen Chromosomensatz ( $2N$ ) auf. Im Folgenden bereitet sich die Zelle auf die DNA-Replikation vor, die Zentriolen teilen sich. Aus der G1-Phase können die Zellen auch in einen Ruhezustand, die sogenannte G0-Phase, eintreten. Bei entsprechenden Stimuli treten sie von

dort aus wieder in den Zellzyklus ein. In der G<sub>0</sub>-Phase befinden sich überwiegend vollständig differenzierte Zelltypen, bei welchen antiproliferative Signale überwiegen und somit die Zellteilung verhindern. In der Synthese (S)-Phase findet die DNA-Replikation statt. In der darauf folgenden Gap<sub>2</sub> (G<sub>2</sub>)-Phase wird die Mitose und die damit verbundenen Teilung der Zelle vorbereitet. Der Übergang von der einen Phase des Zellzyklus in die nächste wird von sogenannten Checkpoints geregelt, beispielsweise wird in der G<sub>1</sub>-Phase die DNA auf eventuell vorhandene Schäden überprüft. Liegen keine Schäden vor, kann die Zelle in die S-Phase eintreten, ansonsten werden Reparaturmechanismen eingeleitet. Im Falle irreparable Schäden, wird die Zelle durch Apoptose aus dem Zellverbund entfernt. Bei der Versuchsdurchführung ist zu beachten, dass Propidiumiodid auch in RNA interkaliert. Deshalb muss diese zuvor mithilfe von RNAsen entfernt werden. Auch kann Propidiumiodid die intakte Zellmembran nicht durchdringen, so dass die Zellen zuvor mit Ethanol behandelt wurden, um die Zellmembran zu permeabilisieren und die DNA zu fixieren.

Für die Zellzyklus-Analysen wurden adhärenente Zellen zweimal mit HBSS gewaschen und durch Zugabe von 500 µl Trypsin/0,2% EDTA von der Oberfläche der Zellkulturschale abgelöst. Anschließend wurden sie in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 2.000 rpm und 4° C für 5 min zur Sedimentation zentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen. Bis auf ein Restvolumen von 100 µl wurde das PBS dann von den sedimentierten Zellen abgenommen und 1,4 ml eiskaltes Ethanol 75% (Endkonzentration 70%) unter langsamem Schütteln (Vortex) hinzugefügt. PI (Sigma) wurde in einer Konzentration von 5 mg/ml in PBS gelöst eingesetzt. Für den Verdau der RNA wurde RNase A (Sigma) zu 10 mg/ml in PBS gelöst.

Es folgte eine Inkubation bei 4° C über Nacht bei 4° C. Am nächsten Tag wurden die fixierten Zellen zweimal mit 500 µl Waschpuffer (0,5% BSA/PBS) gewaschen und im Anschluss in 300 µl Färbelösung pro Ansatz aufgenommen.

**Propidiumiodid-Färbelösung (für 3 Ansätze):**

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

Alle Ansätze wurden vor der Überführung in FACS-Röhrchen zum Verdau der RNA für 15 min bei 37° C inkubiert. Die Messung erfolgte in einem FACScan-Durchflusszytometer der Firma Perkin-Elmer.



#### 4.2.8. Reporteranalysen

Zur Reporteranalyse diente der Luciferase-Assay. Dabei wird ein Firefly-Luciferasevektor verwendet, welcher als Promotor die spezifische Bindesequenz eines Transkriptionsfaktors, in diesem Falle Brn3a, enthält. Bindet der Transkriptionsfaktor an die zu untersuchende Sequenz kommt es zur Aktivierung des Promotors und dadurch zur Produktion des Enzyms Firefly-Luciferase. Die Stärke der Promotoraktivierung korreliert dabei mit der Menge an produziertem Enzym, so dass sie ein Maß für die Bindungsaffinität des Transkriptionsfaktors an die Bindesequenz darstellt. Die produzierte Firefly-Luciferase lässt sich durch die Zugabe des Substrates Luciferin luminometrisch detektieren. Grundlage hierfür bildet die Lichtemission (Biolumineszenz), die bei der Reaktion des Luciferins mit Sauerstoff entsteht. Als Kontrolle dient ein Renilla-Luciferasevektor (Promega), welcher unter dem Einfluss eines konstitutiv aktiven Promotors ebenso Lichtemission generiert. Diese kann unabhängig von der des Firefly-Luciferasevektors gemessen werden und dient der Normalisierung äußerer Einflussfaktoren wie Zellzahl und Transfektionsbedingungen.

Für die Untersuchung der direkten Regulation des TIMELESS-Gens durch Brn3a wurde der bereits in Vorarbeiten verwendete pGI2-Brn3a-luc-Vektor mit Prolaktin-Minimalpromotor modifiziert. Dabei wurde die, in dem Vektor enthaltene durch Gruber et al beschriebene, Brn3a-Bindestelle mittels Restriktionsverdau des Enzyms BglIII (NEB, Frankfurt am Main, D) entfernt und durch die DNA-Oligonukleotide mit der potentiellen Bindestelle Brn3.01 des TIMELESS-Promotors ersetzt (siehe 5.2.2.9.). Die Ligation erfolgte mithilfe des Rapid DNA Ligation Kit (Roche). Als Kontrollvektor (pGI2-K-luc) diente der gleiche Vektor, jedoch ohne enthaltene Promotorsequenz oder Brn3a-Bindestelle.

Zur Transfektion wurden Zellen in 6-Loch-Kulturplatten ausgesät und mit 800 ng des Luciferase-Reportervektors und 200 ng des Renilla-Luciferasevektors wie unter 4.2.1.4. beschrieben transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 250 µl 1x Lysepuffer (Promega) und einer Inkubation von 10 min bei 4°C lysiert. Das Lysat wurde in 1,5 ml Reagenzgefäße transferiert und 25 µl des Lysates in eine 96-Loch-Platte überführt. Im Anschluss wurden 25 µl einer 1:1 Mischung aus ATP Substrat (Biothema) und Luciferin für den Firefly-Luciferasevektor oder 25 µl Coelenterazin für den Renilla-Luciferasevektor hinzugeben. Die Messung der Biolumineszenz wurde direkt nach Zugabe in einem GloMax® Microplate Luminometer der Firma Turner Biosystems durchgeführt. Zur Bestimmung der TIMELESS-Reporter-Aktivität nach Brn3a-Inhibition wurde die siRNA-Transfektion wie unter 4.1.4.2. beschrieben 24 h vor der Plasmidtransfektion durchgeführt.

#### 4.2.9. Statistische Analysen

Für alle statistischen Untersuchungen in dieser Arbeit und die grafische Darstellung wurde die Software GraphPad PRISM 5 (Graphpad Software, Inc) verwendet. Die statistischen Analysen erfolgten unter Verwendung des Zweistichproben-t-Test (unpaired t-test). Es wird dabei angenommen, dass beide Stichproben aus Grundgesamtheiten mit gleicher Varianz entstammen:  $t = (\text{Mittelwert von Stichprobe 1} - \text{Mittelwert von Stichprobe 2}) / \text{Standardfehler der Differenzen beider Mittelwerte}$ . Als statistisch signifikant gelten p-Werte  $< 0,05$ . Es erfolgte eine Beschriftung der Abbildungen je nach Signifikanzniveau mit \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) und \*\*\* ( $p < 0,001$ ), sowie n.s. (nicht signifikant).

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Microarray-Analysen zur Identifizierung von Zielgenen von Brn3a

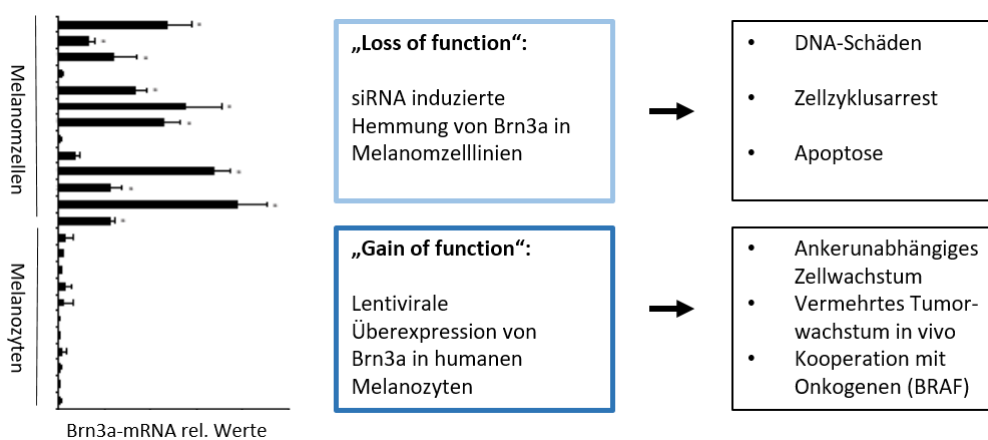
Die Relevanz von Brn3a im malignen Melanom wurde in Vorarbeiten gezeigt. Neben seiner Expression wurde auch seine Aktivität als Transkriptionsfaktor nachgewiesen (vgl. 2.2.2). Daher lag die Vermutung nahe, dass Brn3a seine Funktion über die Regulation anderer Gene ausübt. Dies sollte der vorliegenden Arbeit erforscht werden, indem Brn3a-regulierte Gene identifiziert und deren Rolle in der Tumorentstehung überprüft wurden.

Microarray-Analysen sind aufgrund ihrer bereits beschriebenen Eigenschaften besonders dafür geeignet. Mit dem Verfahren wird ein hoher Durchsatz erreicht, was die gleichzeitige Überprüfung einer großen Anzahl Gene erlaubt (vgl. 2.3.). Hinsichtlich dieser Tatsachen diente das Verfahren als Grundlage für diese Arbeit. Auf den Versuchsaufbau sowie die Durchführung soll im Folgenden näher eingegangen werden.

#### 5.1.1. Versuchsaufbau und -durchführung

Zur Identifizierung von Zielgenen von Brn3a wurden zwei komplementäre Versuchsansätze konzipiert. Im einen Versuchsansatz wurde die Expression von Brn3a in 1205Lu-Melanomzellen, welche endogen Brn3a exprimieren, gehemmt. Im zweiten Versuchsansatz wurde Brn3a in humanen Melanozyten (NHEM), welche endogen kein oder kaum Brn3a exprimieren, überexprimiert.

Es erfolgte so eine Identifikation jener Gene, welche in diesen gegensätzlichen Versuchsansätzen eine gleichsinnige Regulation aufwiesen. Ziel war es, die Wahrscheinlichkeit für eine Regulation durch Brn3a



**Abbildung 9: Auswirkungen der Hemmung von Brn3a in Melanomzelllinien sowie der Überexpression von Brn3a in primären Melanozyten.**

zu erhöhen und Fehlerquellen zu minimieren. Die Verwendung von Melanozyten in einer der beiden Analysen hatte dabei zusätzlich den Vorteil, dass anders als in Melanomzellen nicht bereits viele verschiedene Genveränderungen vorlagen (vgl. 2.1.1.), welche die Expression von Brn3a zusätzlich beeinflussen würden. Die von Dr. Hohenauer durchgeführten Experimente hatten charakteristische Veränderungen der Zellen nach Brn3a-Hemmung bzw. -Überexpression gezeigt. Bei einer Hemmung von Brn3a in Melanomzellen konnten DNA-Doppelstrangbrüche, ein Arrest des Zellzyklus sowie die Einleitung der Apoptose beobachtet werden. Es kam zu einer Verminderung der Zellfunktion („loss of function“). Bei einer Überexpression zeigte sich hingegen ankerunabhängiges Wachstum in Weichagar, ein vermehrtes Tumorwachstum in vivo sowie die Überwindung der durch BRAF induzierten Seneszenz („gain of function“) [65]. Abbildung 9 fasst die Veränderungen nach Hemmung und Überexpression nochmals zusammen.

#### 5.1.1.1. Microarray: Brn3a-Hemmung in 1205Lu-Melanomzellen

Für diesen Microarray wurde die cDNA aus vier verschiedenen Transfektionsansätzen herangezogen. Es wurden zwei verschiedene gegen Brn3a gerichtete siRNAs (Brn3a-siRNA 1, Brn3a-siRNA 2) verwendet, um unspezifische Effekte zu vermeiden. Des Weiteren wurde in einem Ansatz Brn3a-siRNA 1 mit einer gegen p53 gerichteten siRNA kombiniert. Die Vorarbeiten von Dr. Hohenauer hatten die Aktivierung von p53 nach Hemmung von Brn3a gezeigt. Eine Aktivierung von p53 führt zum Zellzyklusstopp und zur Apoptose. Durch diese p53-induzierten Prozesse werden viele Gene über p53 reguliert, die keine direkten Zielgene von Brn3a darstellen. Durch den gleichzeitigen Einsatz einer p53-hemmenden siRNA konnten diese indirekten Effekte minimiert werden. Schließlich war noch ein Ansatz mit einer Kontroll-siRNA notwendig, um transfektionsbedingte Veränderungen der Genregulation berücksichtigen zu können.

Zusammenfassend ergaben sich somit folgende Ansätze: 1. Brn3a-siRNA 1 und Kontroll-siRNA, 2. Brn3a-siRNA 2 und Kontroll-siRNA, 3. Brn3a-siRNA 1 und p53-siRNA und 4. Kontroll-siRNA in doppelter Konzentration. Durch die Ko-Transfektion in Ansatz 3 mit zwei verschiedene siRNAs je 20 nM, bestand bei diesem Ansatz eine Gesamtkonzentration von 40 nM. Um den Unterschied auszugleichen, wurde in allen anderen Ansätzen Kontroll-siRNA zugegeben. Die Durchführung des Microarrays mit je zwei unabhängig hergestellten Ansätzen erfolgte durch das Institut für Experimentelle Genetik (IEG) am Helmholtzzentrum München. Dort wurden auch Qualitätsanalysen, Voramplifikation und reverse Transkription der Proben durchgeführt. Die Ergebnisse des Microarrayexperiments wurden im Anschluss an uns übermittelt.

#### 5.1.1.2. Microarray: Brn3a-Überexpression in humanen Melanozyten

Für den Versuchsansatz der Brn3a-Überexpression, wurde durch lentivirale Transduktion von Brn3a eine stabile Expression in humanen Melanozyten (NHEM) erreicht. Genutzt wurde dafür der Plasmidvektor pLenti, welcher die komplette murine Brn3a-cDNA enthält. Die Gensequenz des murinen sowie des humanen Brn3a weist eine Übereinstimmung von 97% auf und unterscheidet sich somit kaum [80]. Als Kontrolle diente der leere Plasmidvektor pLenti6. Die Virusinfektion der primären Melanozyten wurde dabei freundlicherweise von PD Dr. Sebastian Haferkamp in Würzburg durchgeführt. Nach Bestätigung der Brn3a-Expression durch qRT-PCR-Analysen wurden die Proben anschließend ebenfalls an das Institut für Experimentelle Genetik (IEG) übergeben und, wie oben beschrieben, analysiert.

#### 5.1.2. Definition regulierter Gene

Die Zusammenfassung der Ergebnisse der Microarrays wurde uns in Form einer Liste als Microsoft-Excel-Datensheets übermittelt. Diese wurde von uns anhand der sogenannten linearen Ratio (ratio lin.) sortiert. Diese beschreibt dabei die Veränderung der Expressionsstärke eines Gens im Vergleich zum Referenzwert, d.h. der jeweiligen Kontrollgruppe (Kontroll-siRNA oder Kontrollplasmid). Ein Wert zwischen 0 und 1 spricht somit für eine verminderte Genexpression, während ein Verhältnis größer als 1 als eine vermehrte Genexpression zu werten ist.

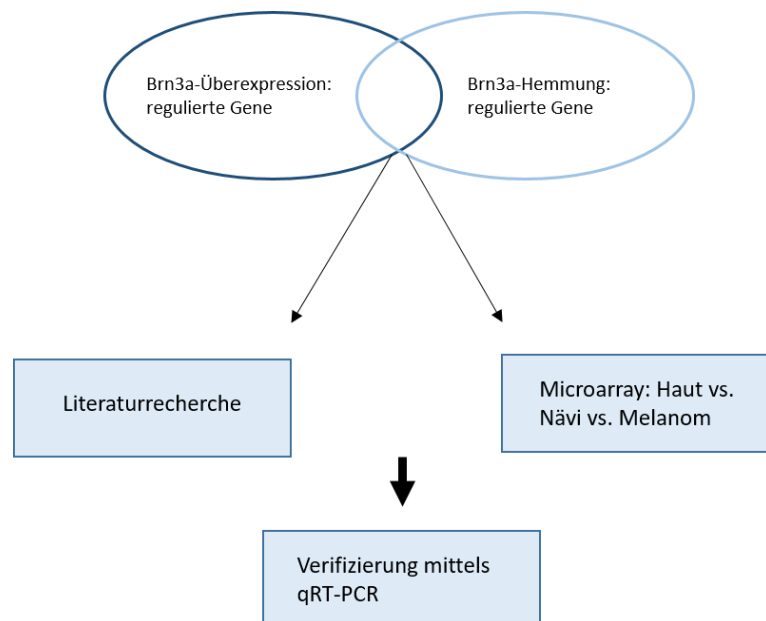
Selektiert wurden von uns alle Gene, welche im Vergleich zum Ansatz mit Kontroll-siRNA bzw. Kontroll-Plasmid eine Hochregulation um mindestens 1,6-fach zeigten bzw. mindestens um 0,66-fach herabreguliert waren. Durch die Wahl dieser Schwellenwerte sollte zum einen eine aussagekräftige Selektion gelingen, zum anderen sollten jedoch auch nicht zu viele eindeutig regulierte Gene ausgeschlossen werden. Im Ansatz der Brn3a-Hemmung zeigten sich unter Berücksichtigung der Schwellenwerte 0,66-facher und 1,6-facher Regulation mit der gegen Brn3a gerichteten siRNA 1 2079 ( $1178 \leq 0,66\text{-fach}$ ,  $901 \geq 1,6\text{-fach}$ ) Gene und mit siRNA 2 1548 ( $936 \leq 0,66\text{-fach}$ ,  $612 \geq 1,6\text{-fach}$ ) Gene reguliert. Wurde für beide siRNAs mit der entsprechende Schwellenwert angewendet, fanden sich noch 694 ( $429 \leq 0,66\text{-fach}$ ,  $265 \geq 1,6\text{-fach}$ ) regulierte Gene. Im Ansatz der Brn3a-Überexpression zeigten sich insgesamt 3153 Gene reguliert, davon  $1629 \leq 0,66\text{-fach}$  und  $1524 \geq 1,6\text{-fach}$ .

Prinzipiell kann ein Transkriptionsfaktor die Expression eines Zielgens aktivieren und als „Aktivator“ funktionieren, oder aber die Expression supprimieren, also als „Repressor“ fungieren. Wenn Brn3a als Aktivator fungiert dann ist das Zielgen im Hemmansatz herab- und im Überexpressions-Ansatz hochreguliert. Als Repressor führt die Hemmung von Brn3a zu einer Hochregulation des Zielgens im Hemmansatz und zu einer Herabregulation des Zielgens im Überexpressionsansatz.

Im nächsten Schritt wurden die beiden Microarrays zusammengefasst und alle Gene selektiert, welche eine gleichsinnige Regulation entsprechend der definierten Schwellenwerte aufwiesen, d.h. bei welchen Brn3a in beiden Versuchsansätzen entweder als Aktivator oder Repressor wirkte. Nach diesem Schritt verblieben 65 Gene. Zusätzlich wurden in einem letzten Selektionsschritt alle Gene aussortiert, deren Regulation durch die Hemmung von p53 beeinflusst wurde. Kam es im Ansatz mit der Ko-Transfektion von p53-siRNA zu einer Aufhebung der Regulation, wurde das Gen nicht weiter berücksichtigt. Hierdurch wurden 16 weitere Gene aussortiert. Die Anwendung der Microarray-Daten als Selektionskriterium fasste die Auswahl der Zielgene sehr eng, es verblieben schließlich 48 Gene. Sie sind in Tabelle 10 gelistet.

### 5.1.3. Selektionskriterien für Zielgene

Um die Liste der im Microarray identifizierten Gene weiter einzugrenzen, wurden von uns zwei weitere Selektionskriterien angelegt (Abbildung 10). In die weitere Auswahl flossen bereits in der Literatur beschriebene molekulare Mechanismen von Brn3a sowie die Regulation des Gens in einem öffentlich zugänglichen Microarray mit ein.



**Abbildung 10: Weitere Selektionskriterien zur Auswahl relevanter Zielgene von Brn3a im Melanom**

#### 5.1.3.1. Literaturrecherche

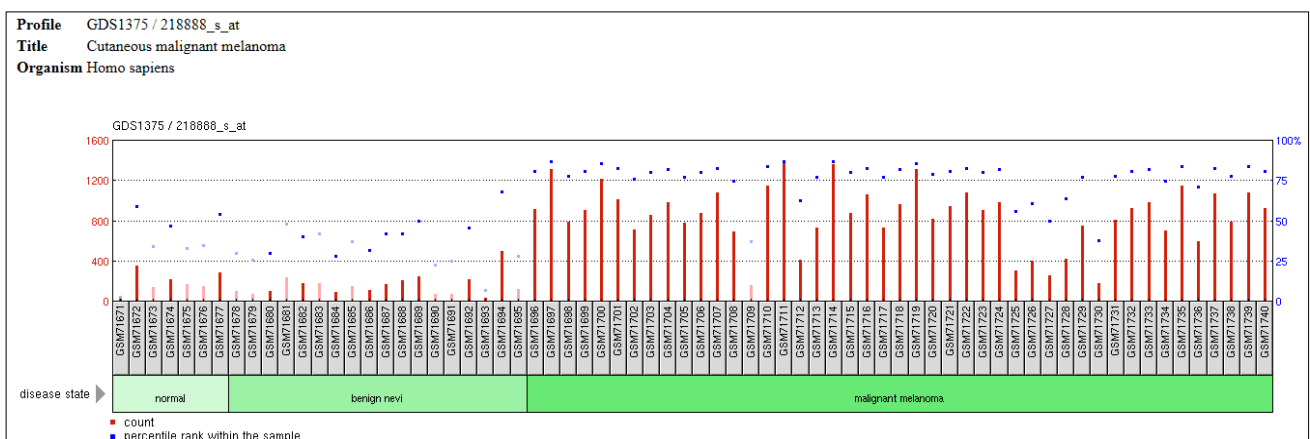
Zur Literaturrecherche wurde die Meta-Datenbank Pubmed verwendet. Die vorselektierten Gene aus unseren Microarray-Daten wurden auf bereits beschriebene molekulare Mechanismen und Assoziation des Gens mit verschiedenen malignen Tumoren hin untersucht.

Genname	Ratio Brn3a-siRNA1/control	Ratio Brn3a-siRNA2/control	Ratio Brn3a-plenti/control
NETO2	0,07	0,49	4,55
FAM129A	0,21	0,15	4,35
ODC1	0,37	0,33	3,20
BAZ1A	0,54	0,52	3,12
ANGPTL4	0,46	0,47	2,83
FKBP5	0,63	0,64	2,46
TIMELESS	0,33	0,39	2,35
RPS6KA3	0,40	0,61	2,33
C13orf27	0,34	0,39	2,21
IL8	0,25	0,21	2,20
ETS1	0,34	0,44	1,89
FOSL1	0,20	0,53	1,89
C3orf59	0,51	0,48	1,84
FAM102B	0,60	0,50	1,81
FAM57A	0,23	0,66	1,72
SMC6	0,43	0,59	1,69
RBBP7	0,59	0,52	1,68
CHST2	0,66	0,63	1,62
FJX1	0,27	0,34	1,62
PHACTR4	0,41	0,37	1,60
FAM20A	1,81	1,70	0,19
A2M	2,41	2,70	0,24
WNT5A	1,63	2,62	0,28
GRK5	1,67	1,70	0,29
C1RL	2,52	2,01	0,38
ALDH3B1	2,14	1,76	0,39
NTN4	1,98	1,73	0,41
GALNT2	2,15	2,39	0,48
ITFG1	1,95	1,71	0,49
TSPAN4	3,00	3,48	0,50
MGST2	2,60	1,62	0,51
TSPAN9	2,31	1,79	0,51
WIPI1	1,72	1,96	0,52
MSRB3	2,41	2,35	0,52
B4GALT1	2,09	1,86	0,53
ST6GALNAC5	1,88	1,63	0,53
CTSO	2,37	1,76	0,53
LETMD1	1,63	1,63	0,56
FSTL3	1,68	1,70	0,56
CASP4	1,94	2,71	0,58
ADAM10	4,19	4,17	0,59
DISP1	2,00	1,75	0,61
OPN3	2,49	1,64	0,61
SIDT2	2,58	2,01	0,62
CLYBL	1,93	1,76	0,62
ARL6IP5	2,29	1,92	0,64
TTYH3	2,30	1,76	0,65
CYP27A1	1,71	1,76	0,66

**Tabelle 10: Zielgene von Brn3a nach Anlage der Schwellenwerte.** In hellblau sind Zielgene dargestellt, welche im Microarray eine gleichsinnige Regulation mit Brn3a zeigten (Brn3a = Aktivator), in dunkelblau jene, welche sich gegensätzliche reguliert zeigten (Brn3a = Repressor). Insgesamt erfüllten 48 Gene die primären Selektionskriterien (Herabregulation  $\leq 0,66$ , Hochregulation  $\geq 1,6$ ).

### 5.1.3.2. Vergleich mit anderen Microarray-Analysen

Die öffentliche Datenbank GEO (Gene Expression Omnibus) des National Center for Biotechnology Information (NCBI) ist eine Datenbank, in welcher Datensätze aus Genexpressionsanalysen veröffentlicht werden [81]. Darunter befindet sich auch ein Datensatz, welcher Proben normaler Haut mit denen benigner Nävi und maligner Melanome vergleicht und somit einen Rückschluss auf die Regulation verschiedener Gene in den einzelnen Proben gewährt. Unsere Vorarbeiten zeigten für Brn3a eine Expression beim Melanom, nicht jedoch in normaler Hautzellen und nur geringfügig in Nävi. Unter der Annahme, dass Brn3a-Zielgene ähnlich exprimiert sind, untersuchten wir vorselektierten Gene auf eine mögliche Regulation. Es wurde dabei die Bezeichnung des Gens in die Datenbank eingegeben und der Datensatz (Accession ID: GDS1375) auf das Gen hin durchsucht. Der von uns genutzte Datensatz wurde 2005 publiziert, es wurden dabei 45 Proben primärer Melanome, 18 gutartiger Hautnävi und sieben normalen Hautgewebes mithilfe eines Affymetrix Hu133A Microarrays analysiert [82]. Die Gene Neto2, FJX1, PHACTR4, WNT5A, GRK5 und C1RL zeigten sich entsprechend ihrer Regulation durch Brn3a in diesem Microarray passend reguliert. Für eine Funktion von Brn3a als Aktivator erwarteten wir eine Hochregulation des Zielgens im Melanom gegenüber benigner Nävi und normaler Haut. Bei Zielgenen mit Brn3a als Repressor der Transkription, sollte sich auch eine umgekehrte Regulation, d.h. eine Herabregulation im Melanom zeigen. Abbildung 11 veranschaulicht exemplarisch das Ergebnis eines Suchvorganges für das Gen Neto2 (Brn3a fungiert als Aktivator).



**Abbildung 11: Exemplarische Darstellung eines Suchergebnisses in der Datenbank GEO.** Der Suchvorgang zeigt hierbei das Ergebnis der Suche nach Neto2, ein im Melanom hochreguliertes Gen.



### 5.1.3.3. Verifizierung von Zielgenen

Zur endgültigen Selektion der vorselektierten Gene, war eine Bestätigung der Ergebnisse des Microarrays mittels qRT-PCR notwendig. Hierfür wurden neue Transfektionsexperimente durchgeführt. Es wurden die beiden Versuchsansätze, die Brn3a-Hemmung mittels zwei siRNAs sowie die lentivirale Überexpression von Brn3a, mit verschiedenen Zellpassagen wiederholt und die Expressionslevel der vorselektierten Gene untersucht. Es wurden die Gene verifiziert, welche von uns aufgrund der durchgeführten Literaturrecherche sowie dem Vergleich mit der GEO-Datenbank in die nähere Auswahl gezogen wurden. Gene, für welche sich die Microarray-Ergebnisse nicht mittels qRT-PCR verifizieren ließen, wurden im Verlauf nicht weiter berücksichtigt. Insgesamt wurden von uns 15 Gene mittels qRT-PCR überprüft und für neun Gene wurden die Microarray-Daten bestätigt. Tabelle 11 veranschaulicht das Ergebnis der Verifizierung. Gene, welche sich nicht verifizieren ließen, sind in rot, verifizierbare Gene in grün dargestellt.

Nach Anwendung aller Selektionskriterien entschieden wir uns die Gene TIMELESS, FAM129A und WNT5A in Bezug auf Phänotyp, Regulation durch Brn3a und molekulare Mechanismen genauer zu untersuchen.

Genname	Verifizierung Hemmung	Verifizierung Überexpression
C13orf27	Grün	Grün
ETS1	Grün	Grün
FAM129A	Grün	Grün
FOSL1	Rot	Grün
NETO2	Grün	Rot
ODC1	Grün	Grün
PHACTR4	Grün	Grün
RPS6KA3	Rot	Grün
SMC6	Rot	Grün
TIMELESS	Grün	Grün
ADAM10	Grün	Grün
GRK5	Rot	Grün
MGST2	Rot	Grün
NTN4	Grün	Grün
WNT5A	Grün	Grün

**Tabelle 11: Mittels qRT-PCR verifizierte Gene.** In grün sind mittels qRT-PCR verifizierbare, in rot nicht verifizierbare Gene dargestellt.

## 5.2. FAM129A und TIMELESS als transkriptionelle Zielgene von Brn3a

Die oben beschriebenen Selektionskriterien führten zur Auswahl genannter Gene. Sie hatten sich in den Bestätigungsexperimenten alle eindeutig reguliert gezeigt. Bei WNT5A fungiert Brn3a als Repressor, bei den drei anderen Genen als Aktivator. Die Literaturrecherche lieferte bezüglich der Genfunktion zu den Vorarbeiten passende Ergebnisse (FAM129A, TIMELESS, WNT5A) oder es zeigte sich eine entsprechende Regulation des Gens im von uns genutzten Microarray-Datensatz verschiedener Haut- bzw. Melanomproben (WNT5A). Um eine Aussage über die Relevanz der einzelnen Kandidaten in der Melanomentstehung und den von ihnen induzierten Phänotypen treffen zu können, wurden die Gene zunächst in der Melanomzelllinie 1205Lu ektop exprimiert (WNT5A) bzw. gehemmt (FAM129A, TIMELESS). Bei WNT5 zeigte sich kein spezifischer Phänotyp nach Überexpression. Das Gen wurde deshalb im Folgenden nicht weiter berücksichtigt. Im Falle von FAM129A und TIMELESS führte die Hemmung zur Induktion von Apoptose und reduzierter Zellvitalität und somit zu einem ähnlichen Phänotyp wie bei Brn3a-Hemmung. Im weiteren Teil dieser Arbeit wird deshalb insbesondere auf diese beiden Gene eingegangen.

### 5.2.1. Funktionelle Charakterisierung von FAM129A im Melanom

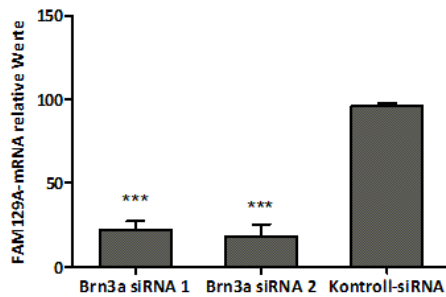
#### 5.2.1.1. FAM129A zeigt eine zu Brn3a gleichsinnige Regulation

FAM129A, auch unter dem Synonym Niban bekannt, zeigt in beiden Versuchsansätzen eine in Bezug auf Brn3a gleichsinnige Regulation. Eine Brn3a-Hemmung führte zu einer Herabregulation auf das 0,21-fache (Brn3a-siRNA 1) bzw. 0,15-fache (Brn3a-siRNA 2), eine Brn3a-Überexpression zu einer 4,35-fachen Hochregulation.

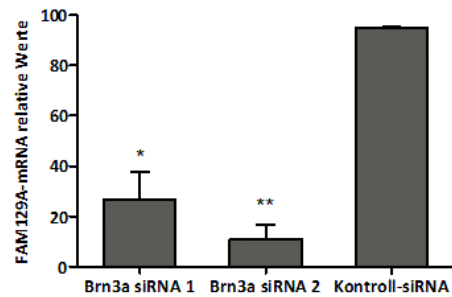
Diese Ergebnisse ließen sich mittels qRT-PCR bestätigen. Dabei gelang die Verifizierung nicht nur in der für den Microarray verwendeten Melanomzelllinie 1205Lu, sondern auch in der ebenfalls Brn3a-exprimierenden Zelllinie WM1232 (Abbildung 12). Neben den Expressionsdaten waren die Ergebnisse der Literaturrecherche entscheidend für die Auswahl von FAM129A. Seine Expression wurde für andere Tumore, wie Schilddrüsenkarzinome [83], Plattenepithelkarzinome im Kopf- und Halsbereich [84] und Nierenkarzinome [85], beschrieben. Auf molekularer Ebene wurde zudem gezeigt, dass die Bestrahlung mit UV-Licht eine Phosphorylierung von FAM129A bewirkt. Dies führt wiederum über verschiedene molekulare Mechanismen zu einer Destabilisierung des Tumorsuppressors p53 und zur Reduktion der mit p53-assoziierten Apoptose. So zeigten murine Fibroblasten, welche kein FAM129A

exprimierten nach UV-Bestrahlung höhere Apoptoseraten als die Kontrollzellen mit exprimierten FAM129A [86]. Dieser potentiell onkogene Mechanismus war für uns insofern von Interesse, da eine Hemmung von Brn3a über DNA-Doppelstrangbrüche nachgewiesenermaßen eine Aktivierung von p53 bewirkt (vgl. 2.2.2.). So ist vorstellbar, dass Brn3a für die Anwesenheit von FAM129A verantwortlich ist, damit UV-abhängige Apoptose verhindert werden kann.

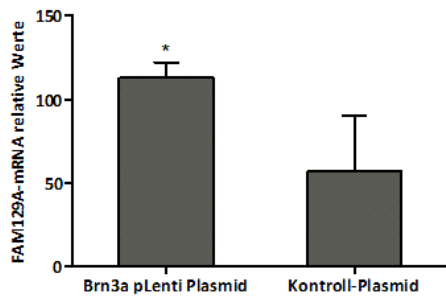
**A**



**B**



**C**

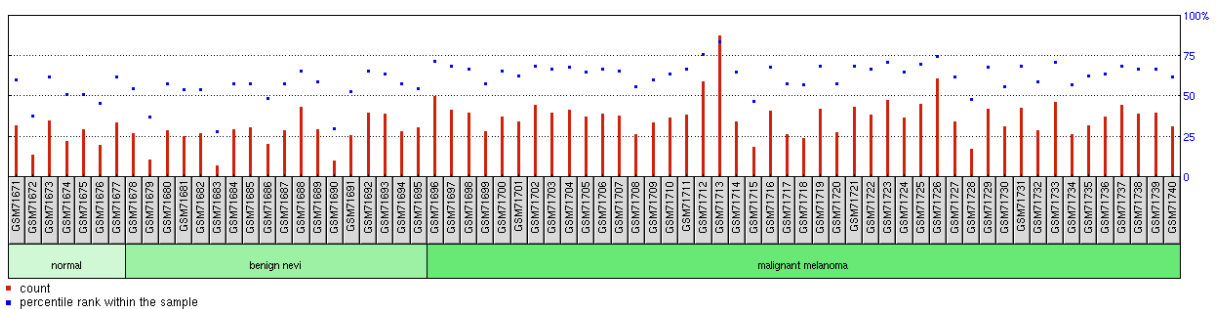


**Abbildung 12: Verifizierung der Microarray-Ergebnisse für FAM129A via qRT-PCR.** Verifizierung der Herabregulation von FAM129A bei Brn3a-Hemmung in den Melanomzelllinien 1205Lu (12A) sowie WM1232 (12B). Die Verifizierung der Hochregulation von TIMELESS nach Brn3a-Überexpression wurde in primären Melanozyten durchgeführt (12C). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei (12A/C) bzw. zwei (12B) unabhängigen Experimenten.

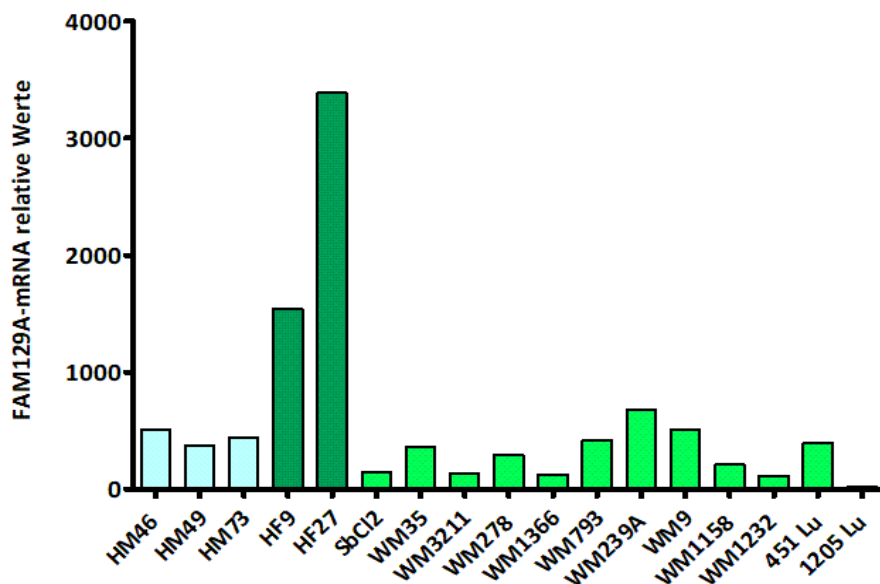
### 5.2.1.2. Regulation von FAM129A während der Melanomentstehung

Aufgrund der beschriebenen Expression von FAM129A in anderen Tumoren, prüften wir seine Expression in verschiedenen Melanomzelllinien und primären Hautzellen (Melanozyten, Fibroblasten). Hierfür wurde zum einen der unter 5.1.3.2. beschriebene GEO-Datensatz und zum anderen eigene qRT-PCR-Analysen verschiedener Zelllinien herangezogen. Leider konnte jedoch im Gegensatz zu Brn3a keine vermehrte Expression in Melanomzellen im Vergleich mit Melanozyten oder anderen Hautzellen festgestellt werden (Abbildung 13B). Auch der GEO-Datensatz zeigte keine deutliche Hochregulation von FAM129A in Melanomproben (Abbildung 13A).

**A**



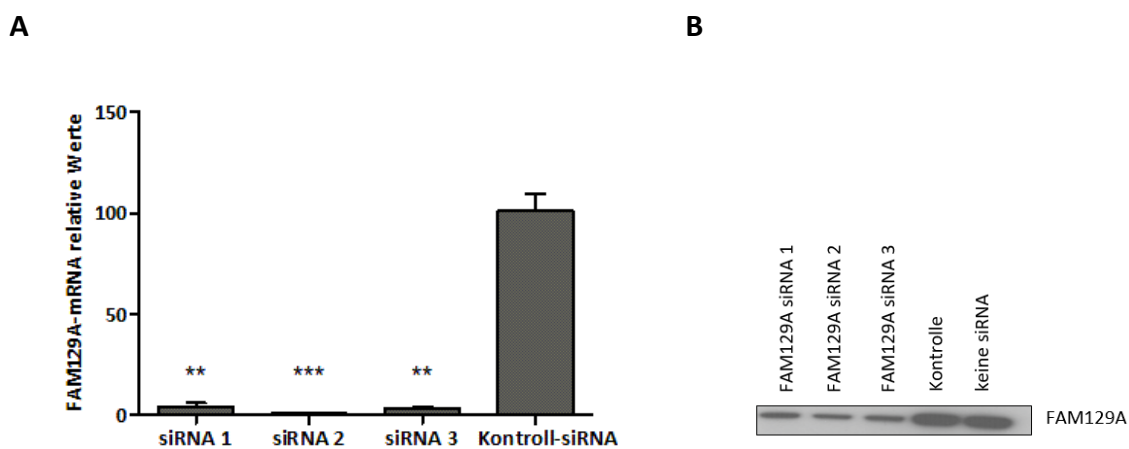
**B**



**Abbildung 13: FAM129A weist keine spezifische Regulation im Verlauf der Tumorentstehung auf.** Dies bestätigte sich sowohl bei der Durchsicherung der GEO-Datenbank (13A), als auch bei der Auswertung der qRT-PCR-Analysen zur FAM129A-Expression in verschiedenen Melanozyten- (hellblau), Fibroblasten- (dunkelgrün) und Melanomzelllinien (hellgrün) (13B).

### 5.2.1.3. Die Hemmung von FAM129A führt zu verminderter Zellvitalität und Zellsterben in Melanomzellen

Um die Relevanz des Zielgens FAM129A auf den durch Brn3a-Hemmung induzierten Phänotypen beurteilen zu können, wurde die Methode der RNA-Interferenz angewendet. Es wurden dabei zwei gegen FAM129A gerichtete siRNAs verwendet. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde eine dritte siRNA hinzugenommen, um mögliche unspezifische Effekte weiter zu minimieren. Die siRNAs wurden in Melanomzelllinien transfiziert. Vierundzwanzig Stunden nach Transfektion wurde die Effizienz der Hemmung mittels qRT-PCR sowie proteinbiochemisch bestätigt (Abbildung 14).

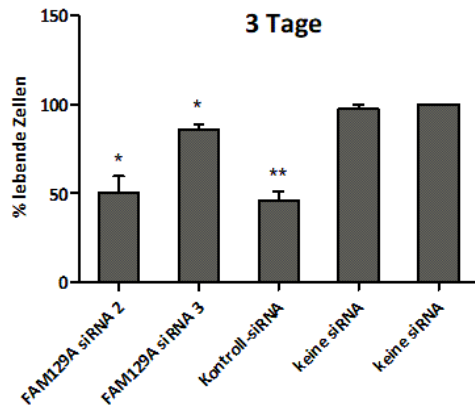


**Abbildung 14: Hemmung von FAM129A durch spezifische siRNAs.** Nach Hemmung mit drei verschiedenen siRNAs gegen FAM12A zeigte sich gegenüber dem mit Kontroll-siRNA behandeltem Ansatz eine signifikante Reduktion der FAM129A-Expression sowohl auf mRNA- (14A), als auch auf Proteinebene (14B). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

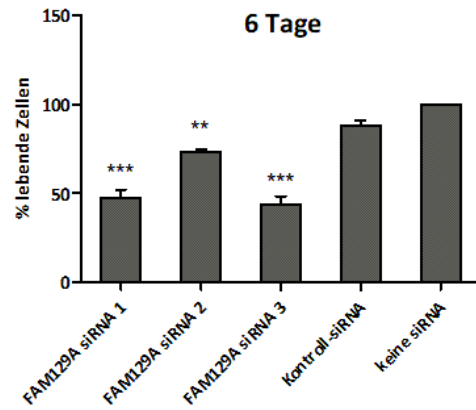
Nach Bestätigung der suffizienten Hemmung von FAM129A wurden die siRNAs erneut in 1205Lu Zellen transfiziert und dann bis sechs Tage nach Transfektion unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet und dokumentiert (Abbildung 15C). An Tag drei und Tag sechs nach Transfektion wurde zudem die Zellvitalität mittels des fluoreszenzbasierten Cell-titer-blue-Assays quantifiziert (Abbildung 15A/B). Achtundvierzig Stunden nach FAM129A-Hemmung, insbesondere in den Ansätzen mit siRNA 1 und siRNA 3, zeigten sich erste Veränderungen in der Zellmorphologie, es kam zu einer zunehmenden Abrundung der Zellen. Im Zeitverlauf lösten sich in den mit FAM129A-siRNA behandelten Ansätzen die Zellen von der Oberfläche der Zellkulturschalen ab. Sechs Tage nach Transfektion bestand bei den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen eine Konfluenz von ca. 90%, während die Ansätze mit FAM129A-Hemmung überwiegend abgelöste Zellen aufwiesen. Die Quantifizierung der Zellvitalität ergab eine Reduktion der lebenden Zellen auf 50% (siRNA 1, siRNA 3) bzw. 80% (siRNA 2). SiRNA 1 wurde zusätzlich auch in die ebenfalls Brn3a-

exprimierenden Zelllinie WM1232 transfiziert, hier wurden die gleichen Veränderungen wie in der Zelllinie 1205Lu beobachtet (Abbildung 15D).

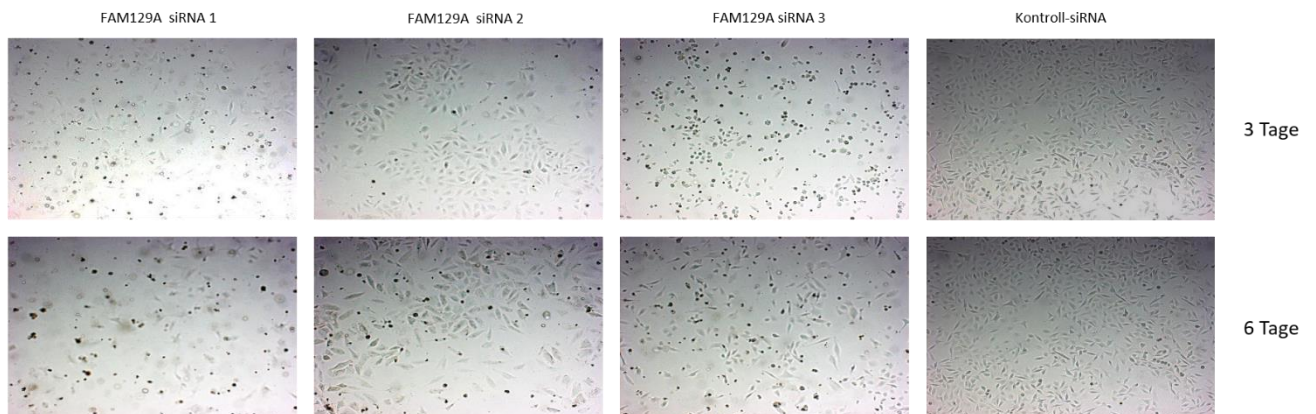
**A**



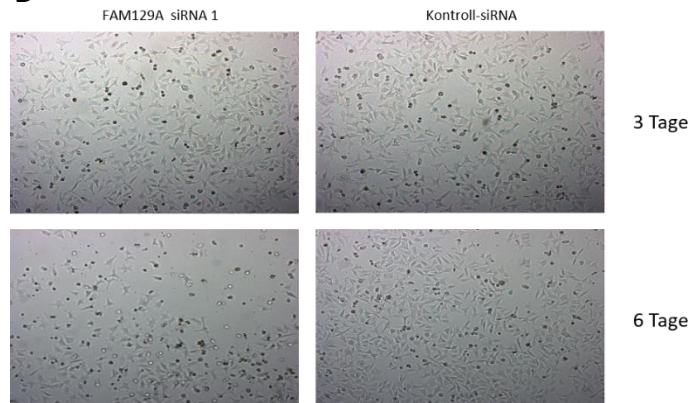
**B**



**C**



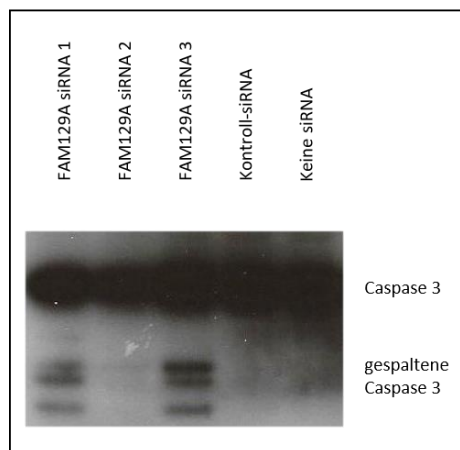
**D**



**Abbildung 15: Effekte der Hemmung von FAM129A nach 3 und 6 Tagen.** Die Messung der Zellvitalität nach Hemmung von FAM129A in 1205Lu zeigt eine signifikante Reduktion der lebenden Zellen für alle drei siRNAs nach 3 (15A) und 6 Tagen (15B). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. Phasenlichtmikroskopische Darstellung von Effekten der Hemmung in 1205Lu (15C) und in WM1232 (15D).

Zur weiteren Einordnung der verminderten Zellvitalität und des Zellsterbens, folgte eine Untersuchung der Ansätze auf typische Veränderungen während der Apoptose.

Caspasen spielen hierbei eine Schlüsselrolle. Sie werden in Initiator- und Effektorcaspasen eingeteilt werden. Die Apoptose wird über zwei typische Signalwege initiiert: Einer führt über die Initiatorcaspase 9, welche die Effektorcaspase 3 spaltet und damit aktiviert [87]. Die Spaltung der Caspase 3 lässt sich mittels eines Immunblots detektieren, da die einzelnen Molekülfragmente unterschiedliche Größe aufweisen. Die Aktivierung der Caspase 3 bewirkt zudem für die für die



**Abbildung 16: Spaltung von Caspase 3 nach Hemmung von FAM129A in 1205Lu Melanomzellen.** Insbesondere bei siRNA 1 und siRNA 3 konnte 72h nach Transfektion eine gespaltene Caspase 3 detektiert werden.

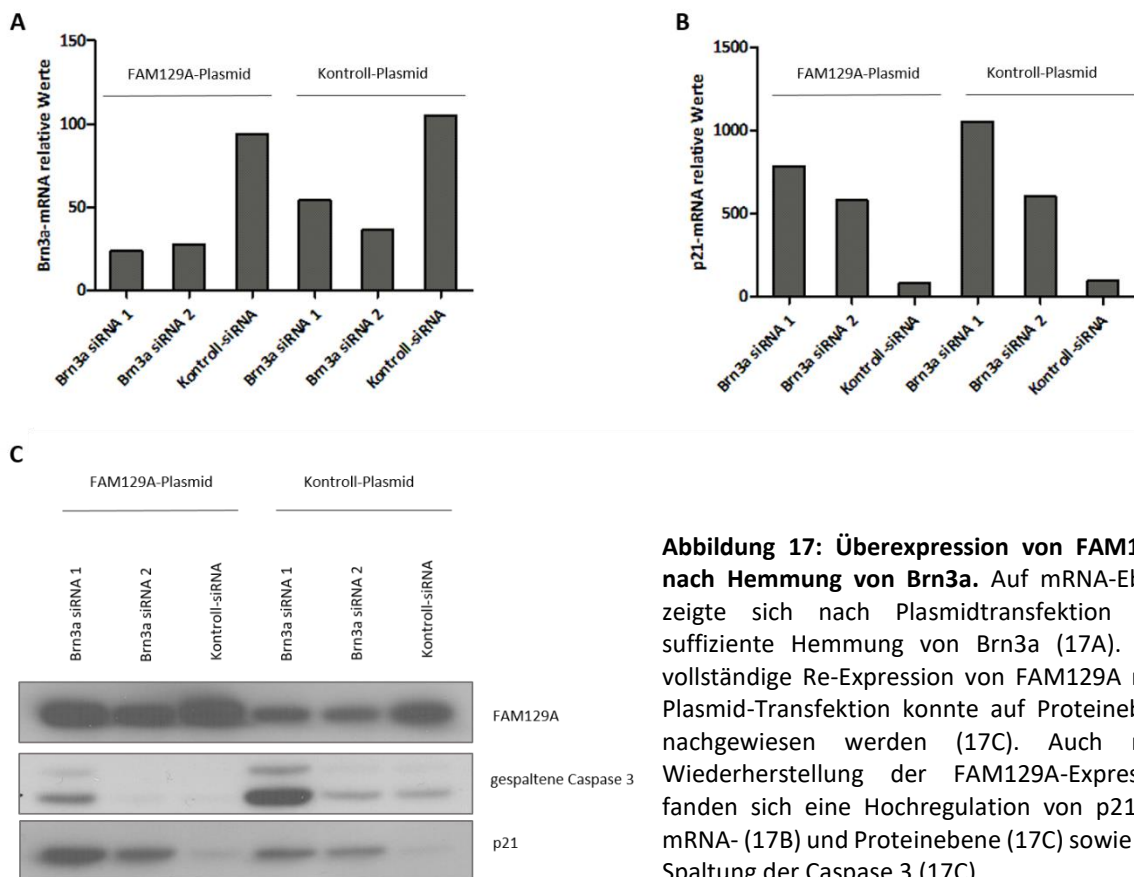
Apoptose typischen Veränderungen, darunter ein Abrunden und Schrumpfen der Zellen durch die proteolytische Zersetzung des Zytoskeletts und die Fragmentierung von DNA. Nach RNA-Interferenz gegen FAM129A konnten wir auf Proteinebene 72 h nach Transfektion insbesondere bei gegen FAM129A gerichteten siRNA 1 und 3, korrespondierend zu unseren Beobachtungen und zum Zellvitalitäts-Assay, eine gespaltene und damit aktivierte Caspase 3 detektieren (Abbildung 16).

#### 5.2.1.4. Der bei Brn3a-Hemmung beobachtete Phänotyp ist nicht reversibel durch eine Überexpression von FAM129A

Sowohl bei der Hemmung von Brn3a als auch von FAM129 kam es zur Apoptose. Als Brn3a-reguliertes Gen könnte der FAM129A-Verlust bei Brn3a für den Zelltod verantwortlich sein. Um dies zu prüfen führten wir ein sogenanntes Rescue-Experiment in Melanomzellen durch, in welchem FAM129A transient ektop exprimiert wurde. Durch eine gleichzeitige Hemmung von Brn3a konnten Aussagen zur Reversibilität des durch Brn3a-Hemmung induzierten Phänotyps durch FAM129A getroffen werden.

Zunächst wurde auf mRNA- und Proteinebene überprüft, ob bei dem gewählten Versuchsaufbau eine Hemmung von Brn3a bzw. Überexpression von FAM129A gegeben ist. Dabei zeigte sich auf mRNA sowohl in dem Versuchsansatz mit FAM129A-Plasmid als auch im Ansatz mit Kontroll-Plasmid eine ausreichende Herabregulation von Brn3a bei beiden siRNAs (Abbildung 17A). Die damit verbundene verminderte Expression von FAM129A konnte durch die Transfektion eines FAM129A-Plasmids vollkommen wiederhergestellt werden (Abbildung 17C).

Nach Sicherstellung der technischen Durchführbarkeit wurden die unterschiedlichen Ansätze über einen Zeitraum von mehreren Tagen beobachtet. Der bei Brn3a-Hemmung beschriebene Phänotyp entwickelte sich dabei nach ca. 48 h. Nach insgesamt fünf Tagen Beobachtung ließ sich allerdings kein Unterschied zwischen den Ansätzen mit Brn3a-Hemmung und überexprimiertem FAM129A versus Kontrollvektor feststellen. In allen Brn3a-gehemmten Ansätzen kam es verglichen mit den Ansätzen mit Kontroll-siRNA zu einer verminderten Zellproliferation sowie zu einem Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturschalen, d.h. zum Absterben von Zellen.



**Abbildung 17: Überexpression von FAM129A nach Hemmung von Brn3a.** Auf mRNA-Ebene zeigte sich nach Plasmidtransfektion eine suffiziente Hemmung von Brn3a (17A). Eine vollständige Re-Expression von FAM129A nach Plasmid-Transfektion konnte auf Proteinebene nachgewiesen werden (17C). Auch nach Wiederherstellung der FAM129A-Expression fanden sich eine Hochregulation von p21 auf mRNA- (17B) und Proteinebene (17C) sowie eine Spaltung der Caspase 3 (17C).

Nachdem sich lichtmikroskopisch kein Unterschied gezeigt hatte, untersuchten wir, ob ein Überexpression von FAM129A auf molekularer Ebene zu Veränderungen in den Zellen führt. In bereits erwähnten, dieser Arbeit vorausgehenden Experimenten, wurde gezeigt, dass eine Hemmung von



Brn3a, über den Tumorsuppressor p53, eine Induktion des zellzyklusinhibierenden Faktors p21 bewirkt. Mittels qRT-PCR und Western Blot überprüften wir folglich, ob die Überexpression von FAM129A zu einer verminderten Induktion von p21 führt und somit Einfluss auf einen wichtigen, den Phänotyp von Brn3a bestimmenden, molekularen Mechanismus hat. In Übereinstimmung mit den mikroskopischen Beobachtungen zeigte sich 72 h nach Transfektion leider kein Unterschied in der Expression von p21 auf mRNA- oder Proteinebene. Auch fand sich kein Unterschied bei der Induktion der Apoptose anhand des Nachweises aktivierter Caspase 3 (vgl. 5.2.1.3.). Eine stärkere Aktivierung der Caspase 3 durch Brn3a-siRNA 1 war dabei, wie hier auch in Abbildungen 17C ersichtlich, bereits aus den Vorarbeiten mit den beiden Brn3a siRNAs bekannt.

## 5.2.2. Funktionelle Charakterisierung von TIMELESS im Melanom

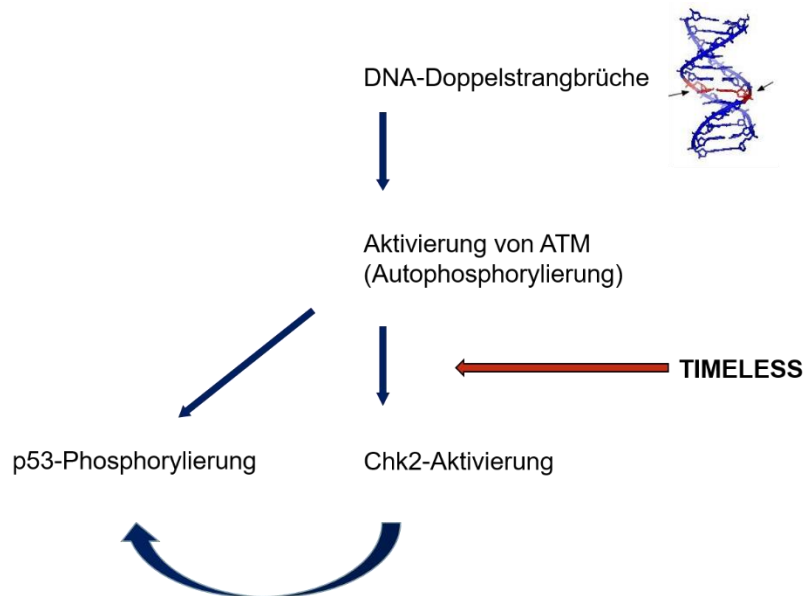
### 5.2.2.1. Beschriebene Funktion von TIMELESS

Als zweites Gen wurde TIMELESS in Hinblick auf seine mögliche Rolle in der Pathogenese des Melanoms sowie seine Regulation durch Brn3a näher untersucht.

TIMELESS spielt eine Rolle bei der Erzeugung und dem Erhalt des zirkadianen Rhythmus. Dieser wird durch einen komplexen Feedback-Mechanismus kontrolliert, welcher die Expression sogenannter „clock proteins“ steuert. Es konnte in Fliegen (*Drosophila melanogaster*) gezeigt werden, dass TIMELESS mit diesen Clock-Proteinen interagiert und für die Erzeugung des zirkadianen Rhythmus verantwortlich ist. Daneben wurde durch transkriptionelle Analysen ebenfalls in *Drosophila melanogaster* ein paraloges Gen gefunden, welches keine Rolle in der Erzeugung einer Tag/Nacht-Rhythmik spielt, sondern wichtige Funktionen für den Erhalt der Chromosomenstabilität, der Wachstumskontrolle und der Entwicklung aufweist. Als paralog werden zwei Gene einer Spezies bezeichnet, wenn ein gemeinsames Vorläufergen vorliegt, aus welchem sie durch Genduplikation hervorgegangen sind. In Säugetieren existieren für die in *Drosophila melanogaster* beschriebenen Funktionen keine paraloge Gene, sondern ein einziges, welches alle Funktionen in sich vereint [88].

Eine Expression von TIMELESS wurde bereits für verschiedene humane Tumorarten beschrieben, darunter Lungen-, Mamma-, Zervix-, nasopharyngeale und hepatozelluläre Karzinome [89-93]. Die onkogene Funktion von TIMELESS scheint sich dabei insbesondere auf das sogenannte „damage signaling“ zu beziehen. Kommt es zu Schäden an der DNA, werden in der Zelle verschiedene Signalwege aktiviert, welche den Zellzyklus anhalten und eine Reparatur des Schadens bewirken können. Kann der Schaden nicht mehr repariert werden, wird die Apoptose eingeleitet. Es bestehen dabei zwei Hauptsignalwege, zum einen der ATM/Chr2-Pathway und zum anderen der ATR/Chr1-Pathway. Die

beiden Signalwege überlappen sich, DNA-Doppelstrangbrüche führen jedoch zumeist zu einer Aktivierung des ATM/Chk2-Signalwegs [94]. Es wurde gezeigt, dass im Falle von DNA-Schäden in Form von DNA-Doppelstrangbrüchen TIMELESS über eine Inhibition der Phosphorylierung von Checkpointkinase Chk2 eine Aktivierung dieser verhindert. Im Folgenden kommt es zu einer verminderten Aktivierung von p53 und konsekutiv zu einer Verhinderung von Zellzyklusarrests und Apoptose [95]. Abbildung 18 veranschaulicht diesen Mechanismus.



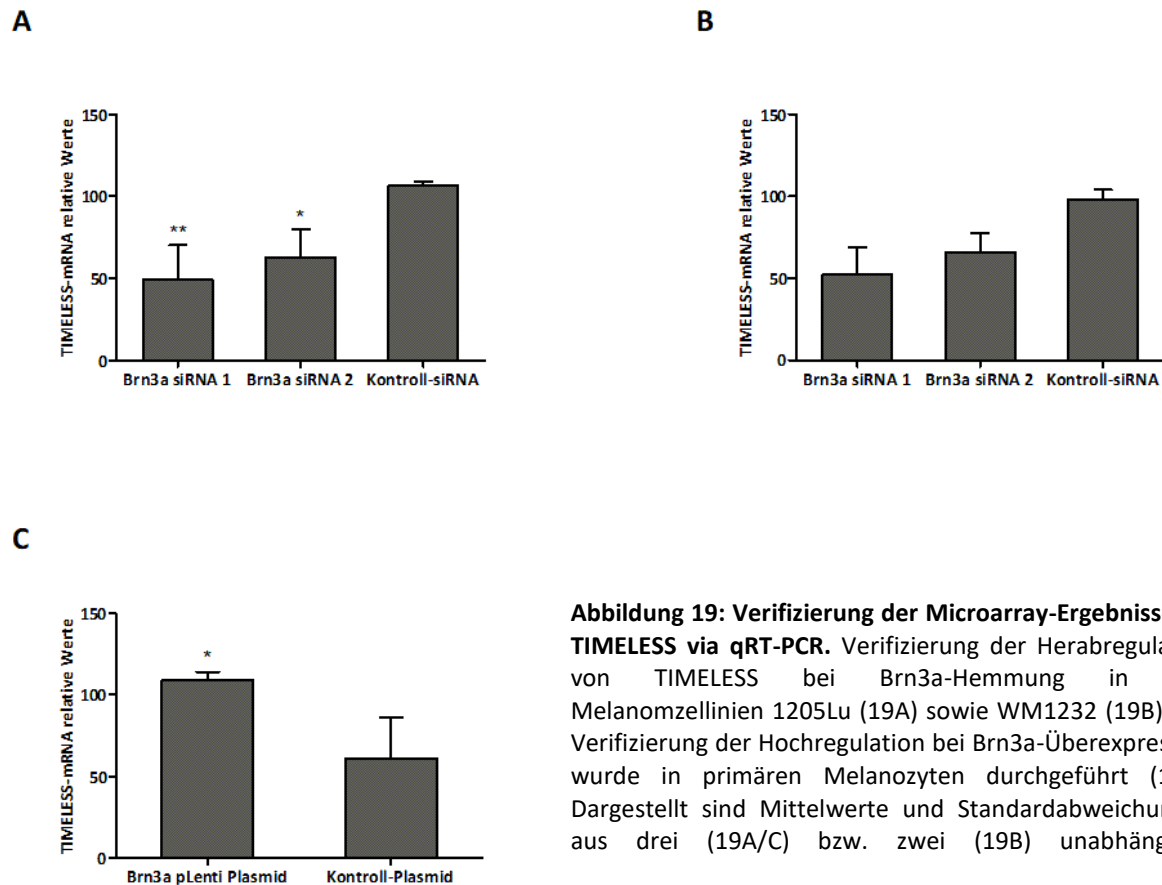
**Abbildung 18: Die Funktion von TIMELESS im damage signaling pathway** (nach Yang et al, 2010 [95]).

Wie unter 2.2.2. beschrieben bewirkt eine Hemmung von Brn3a in Melanomzellen DNA-Doppelstrangbrüche sowie über den ATM/Chk2-Signalweg die Aktivierung von p53 und eine Induktion der Apoptose [65]. Wir stellten demzufolge die Hypothese auf, dass durch eine Brn3a-induzierte Überexpression von TIMELESS das damage signaling außer Kraft gesetzt und somit ein proliferativer Vorteil erlangt wird.

#### 5.2.2.2. TIMELESS zeigt eine zu Brn3a gleichsinnige Regulation

Wie bereits unter 5.2.1.1. für FAM129A beschrieben, bestand unsere Vorgehensweise zunächst darin, die Regulationsdaten von TIMELESS im Microarray mittels qRT-PCR zu bestätigen. TIMELESS zeigt dabei ebenso wie FAM129A eine zur Brn3a-Regulation gleichsinnige Regulation. Wird Brn3a gehemmt, kommt es zu einer Herabregulation von TIMELESS um das 0,33-fache (Brn3a-siRNA 1) bzw. das 0,39-fache (Brn3a-siRNA 2). Wird Brn3a überexprimiert, findet sich eine Hochregulation von TIMELESS um

das 2,35-fache. Auf mRNA-Ebene konnte die Regulation mittels qRT-PCR bestätigt werden (Abbildung 19). Die Verifizierung der Hemmung gelang dabei nicht nur in der im Microarray verwendeten Zelllinie 1205Lu, sondern auch in der Zelllinie WM1232.

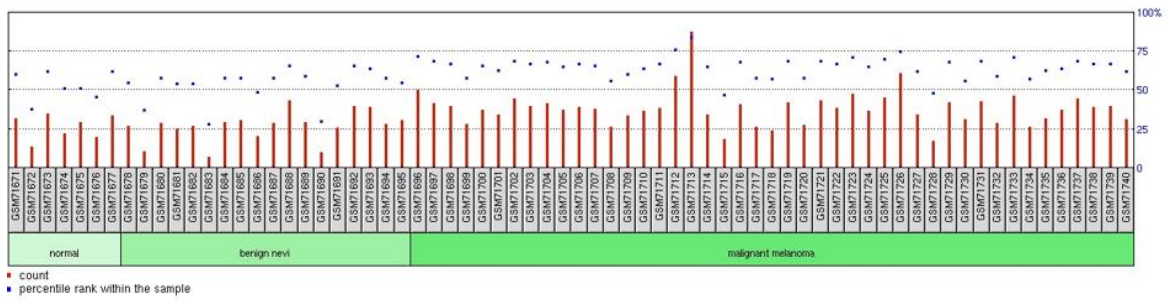


**Abbildung 19: Verifizierung der Microarray-Ergebnisse für TIMELESS via qRT-PCR.** Verifizierung der Herabregulation von TIMELESS bei Brn3a-Hemmung in den Melanomzelllinien 1205Lu (19A) sowie WM1232 (19B). Die Verifizierung der Hochregulation bei Brn3a-Überexpression wurde in primären Melanozyten durchgeführt (19C). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei (19A/C) bzw. zwei (19B) unabhängigen

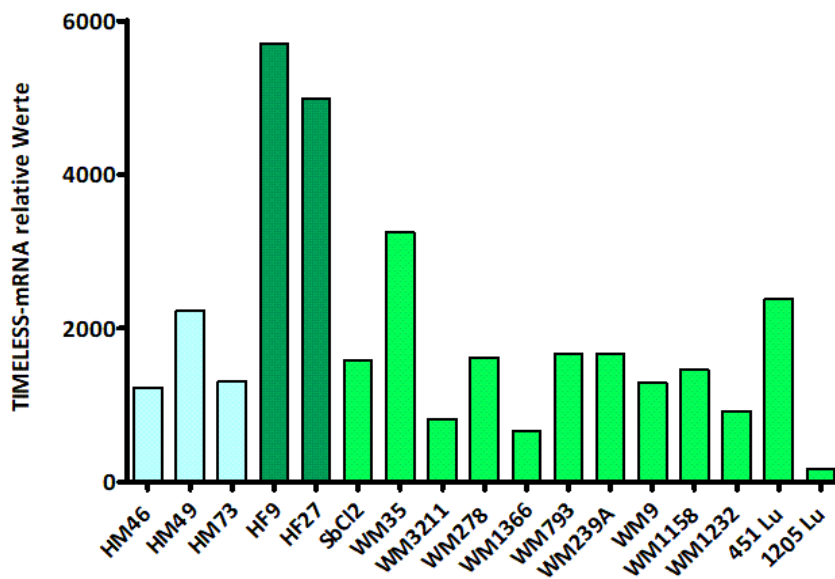
### 5.2.2.3. Regulation von Timless während der Melanomentstehung

Neben der Verifizierung der Microarray-Daten wurde auch die Expression von TIMELESS zwischen Proben normaler Haut, benigner Nävi und Melanomproben anhand des Microarray-Datensatzes in der Datenbank GEO (wie unter 5.1.3.2. beschrieben) verglichen. Es fand sich kein Hinweis darauf, dass TIMELESS im Verlauf der Tumorentstehung hochreguliert wird. Ferner wurde die Expression von TIMELESS in eigenen qRT-PCR-Analysen verschiedener Hautzelllinien und Melanomzelllinien gemessen. Dabei zeigte sich allerdings kein signifikanter Unterschied. Insgesamt zeigten die Expressionsdaten keine Übereinstimmung der Brn3a- und TIMELESS-Expression in verschiedenen Zellen und Geweben. Dies ist in Abbildung 20 veranschaulicht.

**A**



**B**

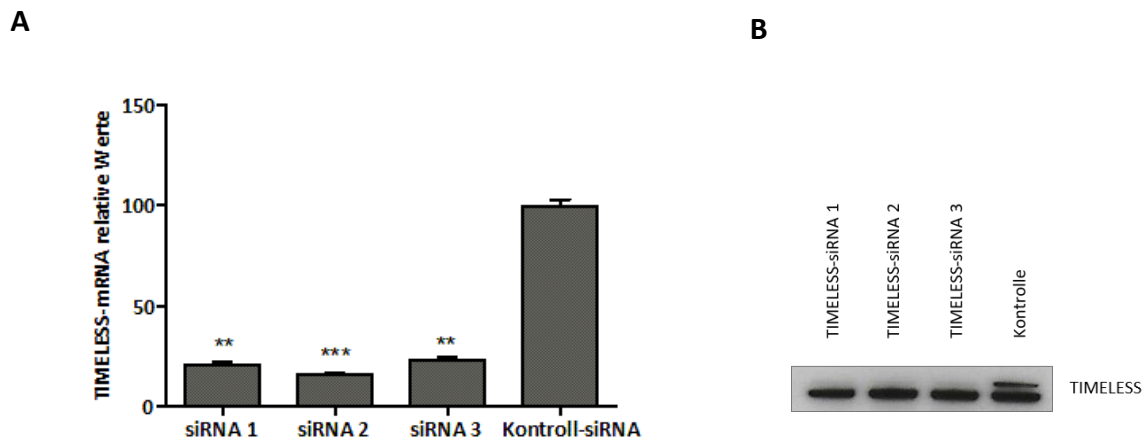


**Abbildung 20: TIMELESS weist keine spezifische Regulation im Verlauf der Tumorentstehung auf.** Dies bestätigte sich analog zu FAM129A sowohl bei der Durchsuchung der GEO-Datenbank (20A), als auch bei der Auswertung der qRT-PCR-Analysen zu Expression von TIMELESS in verschiedenen Melanozyten- (hellblau), Fibroblasten- (dunkelgrün) und Melanomzelllinien (hellgrün) (20B).

5.2.2.4. Die Hemmung von TIMELESS induziert Apoptose und führt zu verminderter Zellvitalität und Zellsterben in Melanomzelllinien

Analog zum Vorgehen bei FAM129A entwickelten wir auch für TIMELESS drei spezifische siRNAs wie unter 4.2.1.3. beschrieben. Ziel war es ebenfalls die Funktion von TIMELESS im Melanom zu charakterisieren um eine Aussage über die Relevanz des Zielgens in der Tumorentstehung treffen zu können. Zunächst wurden von uns nur siRNA 1 und 2 in den Versuchen verwendet, siRNA 3 nahmen wir zu einem späteren Zeitpunkt hinzu, um die Möglichkeit unspezifischer Effekte weiter zu verringern. Es handelte sich dabei um eine bereits publizierte Sequenz [95, 96]. Die siRNAs wurden in 1205Lu-

Zellen transfiziert und mit einer Kontroll-siRNA verglichen. Zunächst wurde eine auf mRNA- und Proteinebene suffiziente Hemmung durch die siRNAs sichergestellt (Abbildung 21).

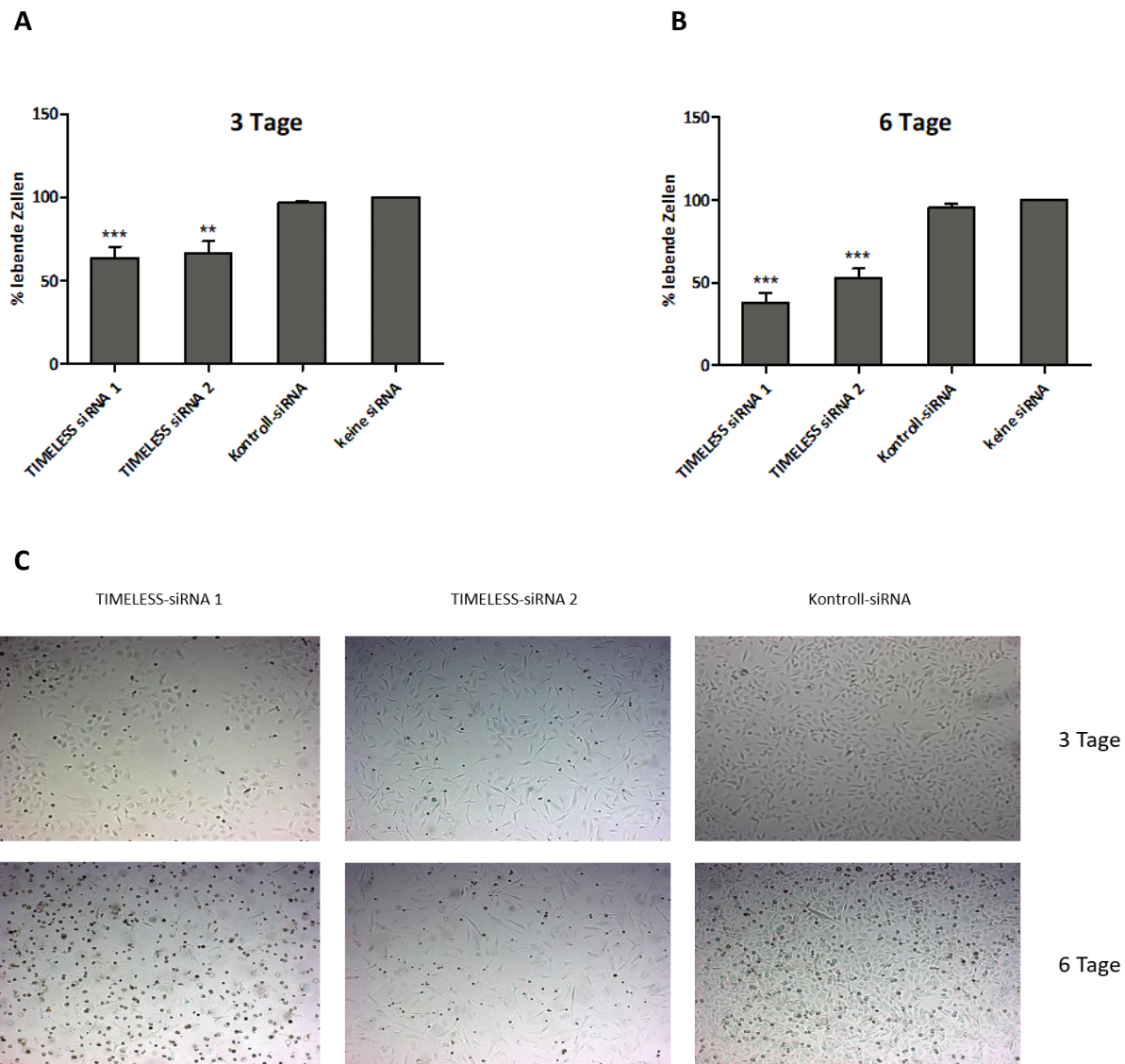


**Abbildung 21: Hemmung von TIMELESS durch spezifische siRNAs.** Nach Hemmung mit drei verschiedenen gegen TIMELESS gerichteten siRNAs zeigte sich gegenüber dem mit Kontroll-siRNA behandeltem Ansatz eine signifikante Reduktion der TIMELESS-Expression sowohl auf mRNA- (21A), als auch auf Proteinebene (21B). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Nach Bestätigung der suffizienten Hemmung von TIMELESS mittels RNA-Interferenz wurden die siRNAs erneut in verschiedenen Ansätzen in 1205Lu Zellen transfiziert und im Anschluss bis sechs Tage nach der Transfektion unter dem Phasenkontrastmikroskop betrachtet und dokumentiert. An Tag 3 und Tag 6 nach Transfektion wurde wie in den Versuchen mit FAM129A die Zellvitalität quantifiziert. 48 h nach TIMELESS-Hemmung kam es zu einem Abrunden der Zellen, im Zeitverlauf lösten sich in den mit TIMELESS-siRNA behandelten Ansätzen die Zellen zunehmend von der Oberfläche der Zellkulturschalen ab. Sechs Tage nach Transfektion bestand bei den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen eine Konfluenz von ca. 90%, während die Ansätze mit TIMELESS-Hemmung Zellen mit veränderter Zellmorphologie und abgelöste Zellen aufwiesen.

Die Quantifizierung der Zellvitalität ergab eine Reduktion der lebenden Zellen auf ca. 35% (siRNA 1) und ca. 50% (siRNA 2) nach sechs Tagen. Zudem zeigte sich vor allem bei den Ansätzen mit siRNA 2 eine Veränderung der Zellmorphologie.

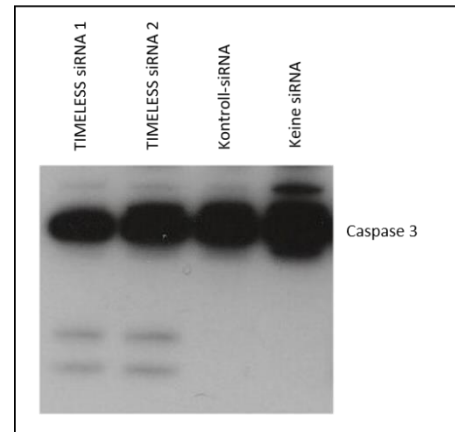
Die Zellen wiesen im Vergleich mit den Kontrollansätzen eine länglichere und spindelförmige Morphologie auf. Diese konnte auch in den Ansätzen mit siRNA 1 beobachtet werden, jedoch aufgrund des vermehrten Zellsterbens nur in Teilen (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Effekte der Hemmung von TIMELESS nach 3 und 6 Tagen.** Die Messung der Zellvitalität nach Hemmung von TIMELESS in 1205Lu zeigt eine signifikante Reduktion an lebenden Zellen nach Transfektion der beiden gegen TIMELESS gerichteten siRNAs 1 und 2 nach 3 (22A) und nach 6 Tagen (22B). In Abbildung 22C sind die Effekte der Hemmung phasenlichtmikroskopisch dargestellt. Nach TIMELESS-Hemmung kam es zu einer Abrundung und schließlich einem Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturschale. Insbesondere bei siRNA 2 fiel zudem eine längliche und spindelförmige Morphologie der Zellen auf. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

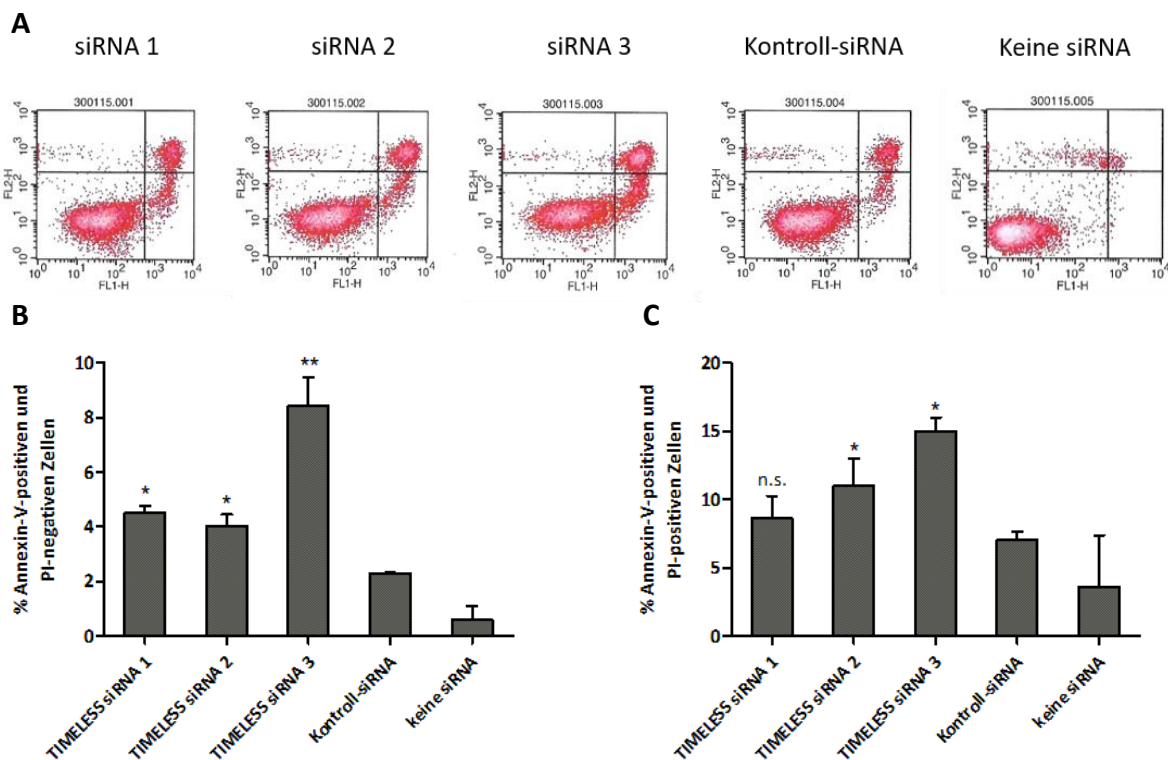
Wie im Falle der FAM129A-Hemmung, sollte auch bei der Hemmung von TIMELESS der Mechanismus des Zellsterbens und der verminderten Zellvitalität näher charakterisiert werden, weshalb wir die Ansätze auf eine Spaltung und damit eine Aktivierung von Caspase 3 (vgl. auch 5.2.1.3.) überprüften. Bei beiden siRNAs war eine Aktivierung der Caspase 3 nachweisbar, was zeigt, dass die Apoptose induziert wurde (Abbildung 23).

Um die durch die nach TIMELESS-Hemmung induzierte Apoptose zu quantifizieren und zu bestätigen, erfolgte zudem eine FACS-Analyse zur Quantifizierung apoptotischer Zellen. Dies ist möglich, da es durch die Spaltung der Caspase 3 zu für die Apoptose typischen Veränderungen kommt. Es findet ein Abrunden und Schrumpfen der Zellen durch die proteolytische Zersetzung des Zytoskeletts und die Fragmentierung von DNA statt. Im Rahmen der Umbauprozesse an der Zellmembran wendet sich charakteristischerweise das Phospholipid Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen auf die extrazelluläre Seite.



**Abbildung 23: Spaltung von Caspase 3 nach Hemmung von TIMELESS in 1205Lu Melanomzellen.**

Makrophagen werden durch dieses Signal angelockt und zur Phagozytose animiert [97]. Da sich Phosphatidylserin mit Annexin V fluoreszenzmarkieren lässt, ermöglicht dies eine durchflusszytometrische Messung der apoptotischen Zellen (vgl. 4.2.7.1.).

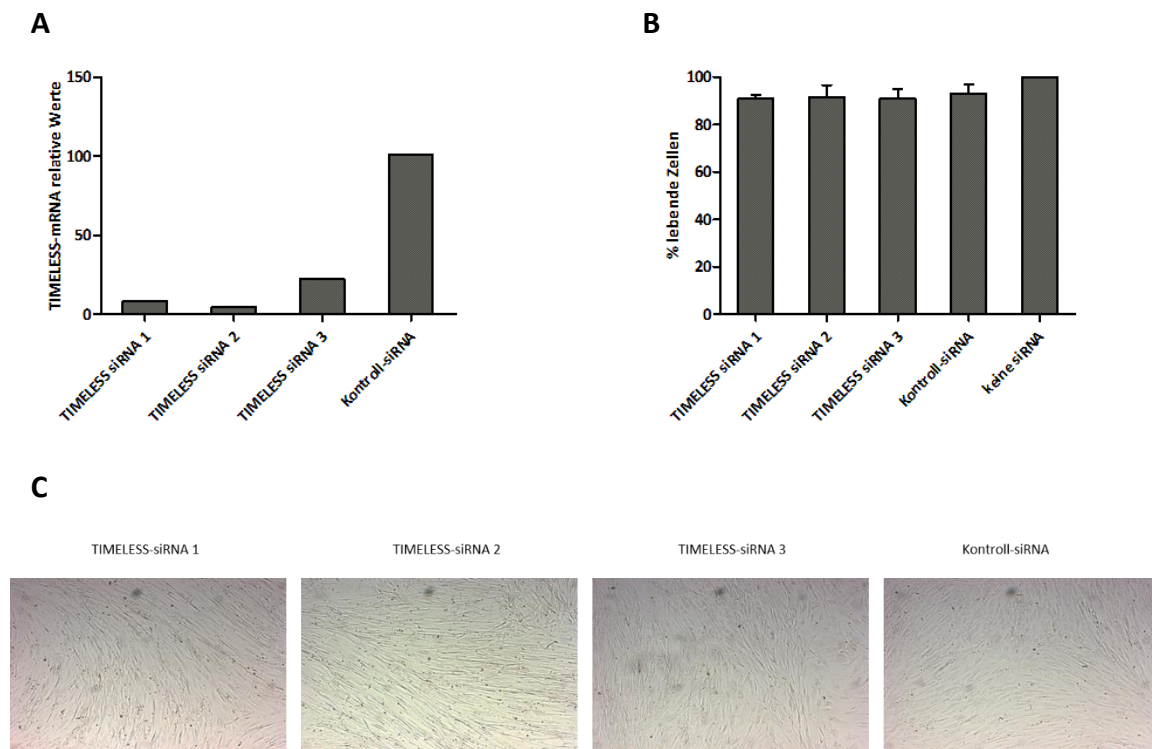


**Abbildung 24: Induktion der Apoptose nach TIMELESS-Hemmung.** Mit TIMELESS-siRNA transfizierte Zellen wurden mittels FACS zur Quantifizierung apoptotischer Zellen (Annexin-V-positiv, PI-negativ) analysiert. Apoptotische Zellen finden sich im rechten unteren, tote Zellen (Annexin-V- und PI-positiv) im rechten oberen Quadranten (24A). Es zeigte sich eine statistisch signifikante Zunahme der apoptotischen Zellen nach TIMELESS-Hemmung (24B). Ebenfalls konnten vermehrt tote Zellen festgestellt werden, hier wurde bei siRNA 1 jedoch keine statistische Signifikanz erreicht (24C). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.



Nach TIMELESS-Hemmung zeigte sich bei allen drei verwendeten siRNAs eine signifikante Zunahme der apoptotischen Zellen im Vergleich zum mit Kontroll-siRNA behandelten Ansatz (Abbildung 24B). Zudem konnten vermehrt tote Zellen nach TIMELESS-siRNA-Hemmung festgestellt werden. Bei siRNA 1 wurde hier jedoch keine statistische Signifikanz erreicht (Abbildung 24C).

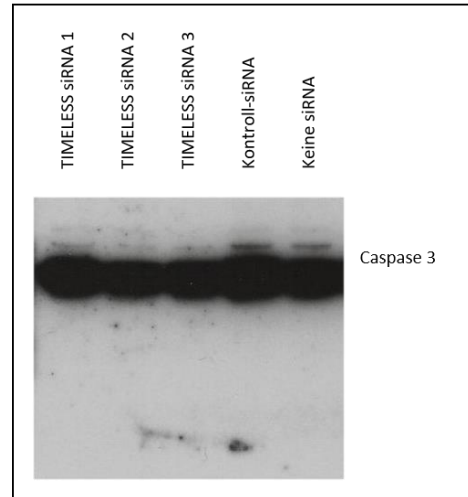
5.2.2.5. Keine Apoptose-Induktion nach TIMELESS-Hemmung in Fibroblasten  
 Weil TIMELESS eine wichtige Rolle im damage signaling nach DNA-Schädigung spielt, stellten wir die Hypothese auf, dass TIMELESS - obwohl ähnlich exprimiert in normalen Zellen und Tumorzellen - für sich rasch teilende Tumorzellen ein essentielles Gen darstellt, nicht aber für normale Zellen. Zur Analyse wurde TIMELESS in unveränderten Hautzellen, in diesem Fall Fibroblasten, gehemmt. Die Entscheidung für Fibroblasten als Modellzelle für normale Hautzellen wurde gefällt, da sich RNA-Interferenz in den uns vorhandenen Zellen gut umsetzen ließ. Eine verlässliche Hemmung in Melanozyten gestaltete sich im Gegensatz dazu schwieriger.



**Abbildung 25: Hemmung von TIMELESS in Fibroblasten.** Es zeigte sich auch in Fibroblasten eine suffiziente siRNA-vermittelte Hemmung von TIMELESS auf mRNA-Ebene (25A). 6 Tage nach Hemmung konnte bezüglich der Zellvitalität (25B) und zellmorphologisch (25C) kein Unterschied zwischen mit TIMELESS- und Kontroll-siRNA transfizierten Zellen festgestellt werden. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten (25B).

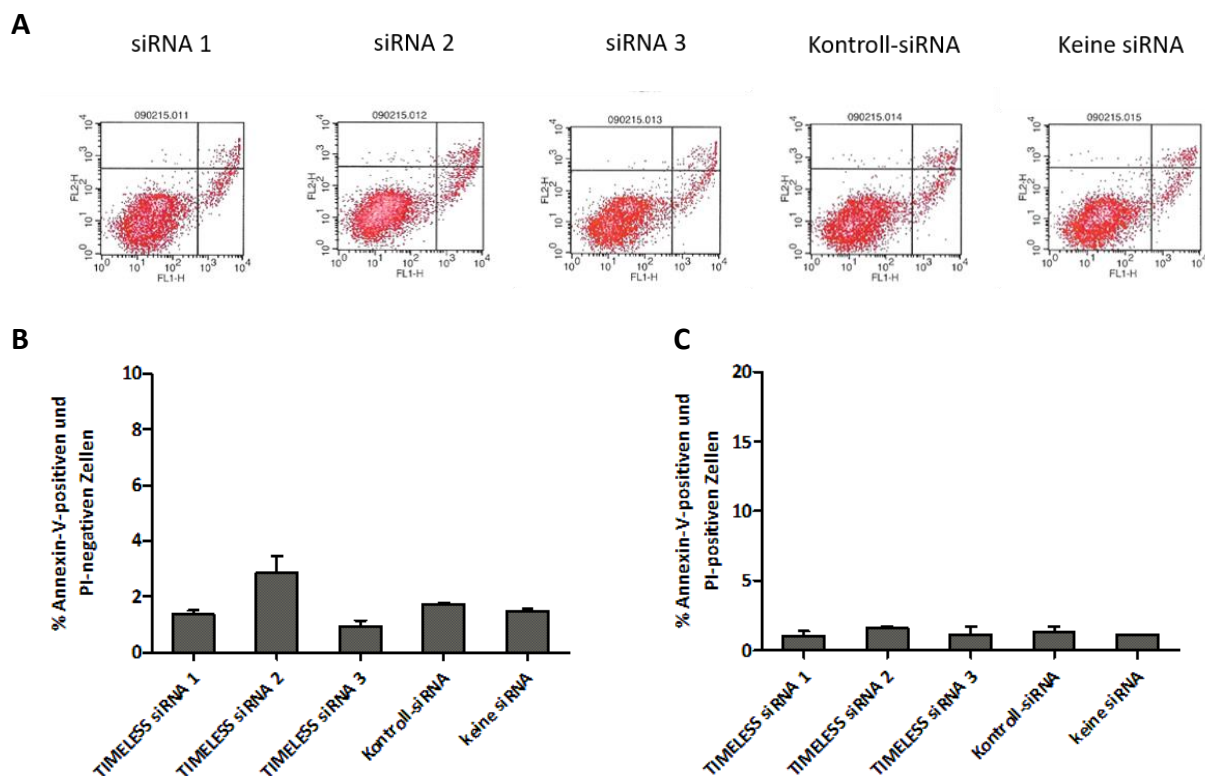


Zunächst kontrollierten wir die Effizienz der Hemmung. Für alle drei siRNAs konnte eine suffiziente Hemmung auch in Fibroblasten festgestellt werden. Anschließend wurden die siRNAs in mehreren Ansätzen transfiziert und beobachtet, im längsten Fall über sechs Tage. Wie in Abbildung 25 ersichtlich, konnten dabei, auch nach einem Zeitraum von sechs Tagen, keine Veränderungen im Vergleich zur Kontroll-siRNA festgestellt werden. Es fand sich lichtmikroskopisch weder eine verminderte Zelldichte, eine Veränderung der Zellmorphologie oder ein vermehrtes Absterben von Zellen, wie es in der Melanomzelllinie 1205Lu beobachtet werden konnten.



**Abbildung 26:** Keine Aktivierung von Caspase 3 nach Timless-Hemmung in humanen Fibroblasten.

Aufgrund der lichtmikroskopischen Beobachtungen überprüfen wir die Versuchsansätze mit transfizierten Fibroblasten ebenfalls auf eine Spaltung und somit Aktivierung von Caspase 3.

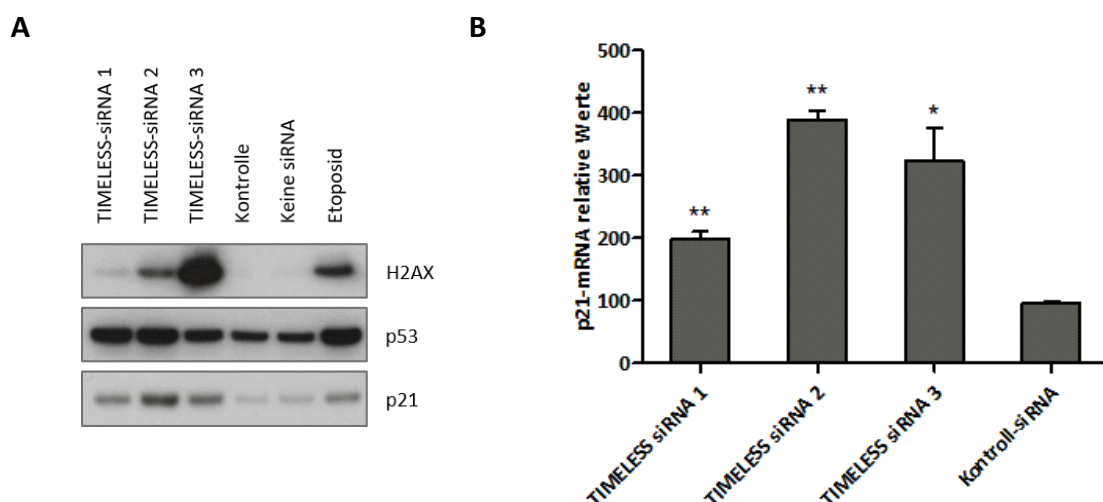


**Abbildung 27:** Keine Induktion der Apoptose nach TIMELESS-Hemmung in humanen Fibroblasten. Mit TIMELESS-siRNA transfizierte Zellen wurden in Fibroblasten mittels FACS zur Quantifizierung apoptotischer Zellen (Annexin-V-positiv, PI-negativ) analysiert (27A). Anders als in 1205Lu Melanomzellen konnte dabei keine vermehrte Anzahl apoptotischer oder toter Zellen nach TIMELESS-Hemmung im Vergleich zum Kontroll-Ansatz festgestellt werden (27B/C). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Passend zu den mikroskopischen Beobachtungen zeigte sich keine Aktivierung der Caspase 3 (Abbildung 26). Die FACS-Analyse zur Quantifizierung apoptotischer Zellen zeigte korrespondierend dazu, anders als in 1205Lu Melanomzellen, keinen Unterschied in der Anzahl apoptotischer Zellen (Annexin-V-positiv und PI-negativ) zwischen den mit TIMELESS-siRNA und Kontroll-siRNA transfizierten Ansätzen (Abbildung 27). Insgesamt kam es in Fibroblasten zu einer deutlich geringen Anzahl apoptotischer und toter Zellen in allen Ansätzen (einschließlich der Kontrollansätze) im Vergleich zu 1205Lu Melanomzellen.

#### 5.2.2.6. Aktivierung von p21 und p53 sowie Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen nach TIMELESS-Hemmung

Nach Beobachtung der tumorspezifischen Apoptose durch Hemmung von TIMELESS wurde diese in weiteren Experimenten näher charakterisiert. In Bezug auf die dabei gleichsinnige Regulation mit Brn3a und die vorbeschriebene Funktion von TIMELESS war von uns der zellzyklusinhibierende p21 von Interesse. Wie bereits erwähnt führt die Hemmung von Brn3a zur Aktivierung des Tumorsuppressors p53 und zu einer Induktion des zellzyklusinhibierenden Faktors p21. Daneben interessierten wir uns in Bezug auf die funktionelle Charakterisierung von TIMELESS auch für das Protein H2AX. Dieses stellt dabei in seiner phosphorylierten Form ( $\gamma$ H2AX) einen Marker für DNA-Doppelstrangbrüche dar [98]. Bei Brn3a-Hemmung zeigte sich in unseren Vorarbeiten eine vermehrte



**Abbildung 28: Die Hemmung von TIMELESS führt zu DNA-Doppelstrangbrüchen und zur Hochregulation von p21 und p53.** Auf Proteinebene zeigte sich nach der Hemmung von TIMELESS eine Hochregulation von p21 und p53, es konnte zudem  $\gamma$ H2AX als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche nachgewiesen werden. Als Positivkontrollle wurde das Zytostatikum Etoposid verwendet (28A). Auch auf mRNA-Ebene zeigte sich eine Hochregulation von p21 (28B). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Experimenten.

Phosphorylierung von H2AX. Dieser Effekt wurde in einer anderen Arbeit auf nach siRNA-vermittelter Hemmung von TIMELESS nachgewiesen [99]. Eine Untersuchung auf phosphoryliertes H2AX in unserem Modell lag daher nahe.

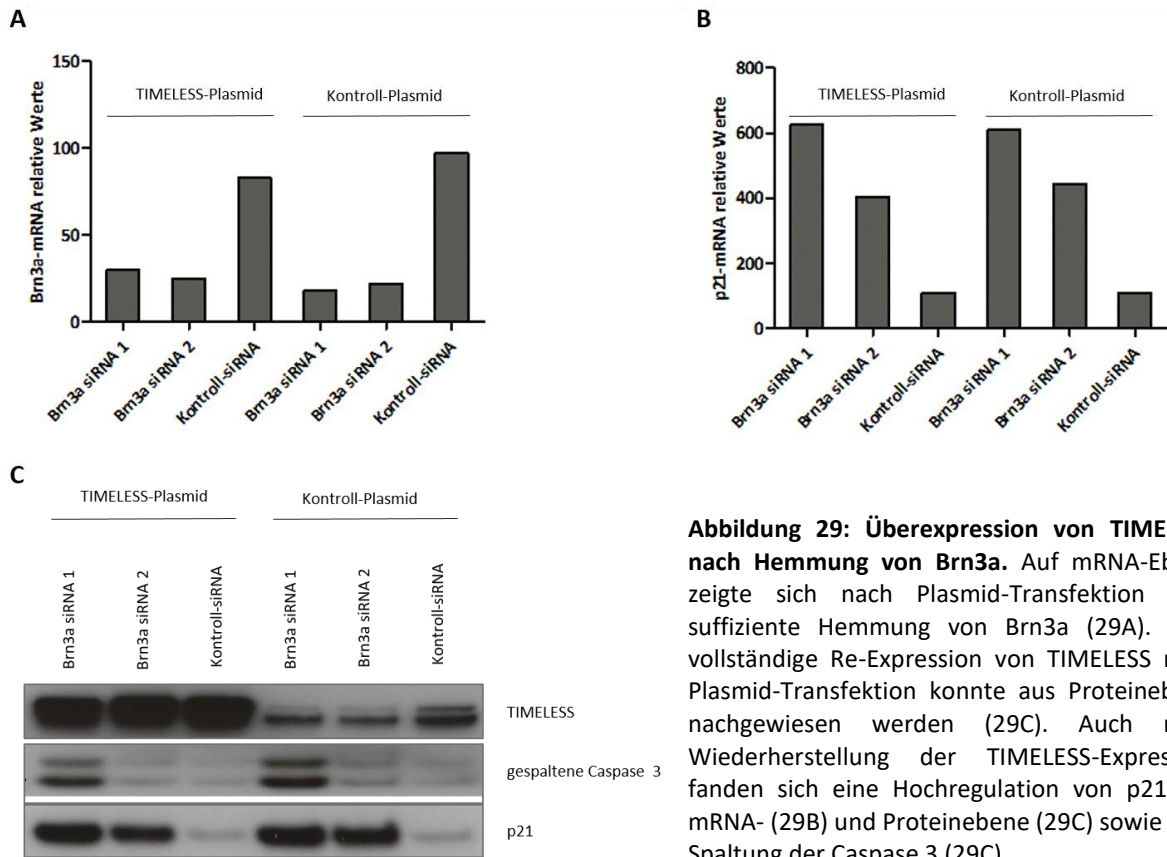
Dazu wurde die Melanomzelllinie 1205Lu mit TIMELESS-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und bezüglich p21, p53 und  $\gamma$ H2AX untersucht.

Für den zellzyklusregulierenden Faktor p21 sowie für p53 ergaben sich nach TIMELESS-Hemmung erhöhte Proteinmengen (Abbildung 28A). Im Falle von p21 konnte eine Hochregulation ebenfalls auf mRNA-Ebene gezeigt werden (Abbildung 28C).

Als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche nach der Hemmung von TIMELESS konnte  $\gamma$ H2AX insbesondere bei TIMELESS-siRNA 2 und 3, schwächer auch bei siRNA 1, nachgewiesen werden (Abbildung 28A). Als Positivkontrolle wurde Etoposid, ein Zytostatikum, welches DNA-Doppelstrangbrüche induziert, verwendet [100].

#### 5.2.2.7. Der bei Brn3a-Hemmung beobachtete Phänotyp ist nicht reversibel durch eine Überexpression von TIMELESS

Wie bereits unter 5.2.1.4. für FAM129A beschrieben, führten wir, nachdem sich TIMELESS als vielversprechendes Zielgen von Brn3a erwiesen hatte, ein „Rescue-Experiment“ durch. Der Ablauf entsprach dabei der Durchführung des Experimentes für FAM129A. Zunächst wurde wieder mittels mRNA-Analyse und Western Blot die Hemmung von Brn3a sowie die Überexpression von TIMELESS überprüft. Dabei wurde mithilfe des Timless-Plasmids in Brn3a-gehemmten Zellen eine deutliche Expression von TIMELESS erreicht (Abbildung 29C). Dennoch war, wie bereits auch bei FAM129A beobachtet, der durch die Brn3a-Hemmung induzierte Phänotyp nicht durch eine Überexpression von TIMELESS reversibel. Im Immunoblot waren Caspase 3 und p21 gleichermaßen aktiviert, wenn TIMELESS ekto exprimiert wurde (Abbildung 29C).

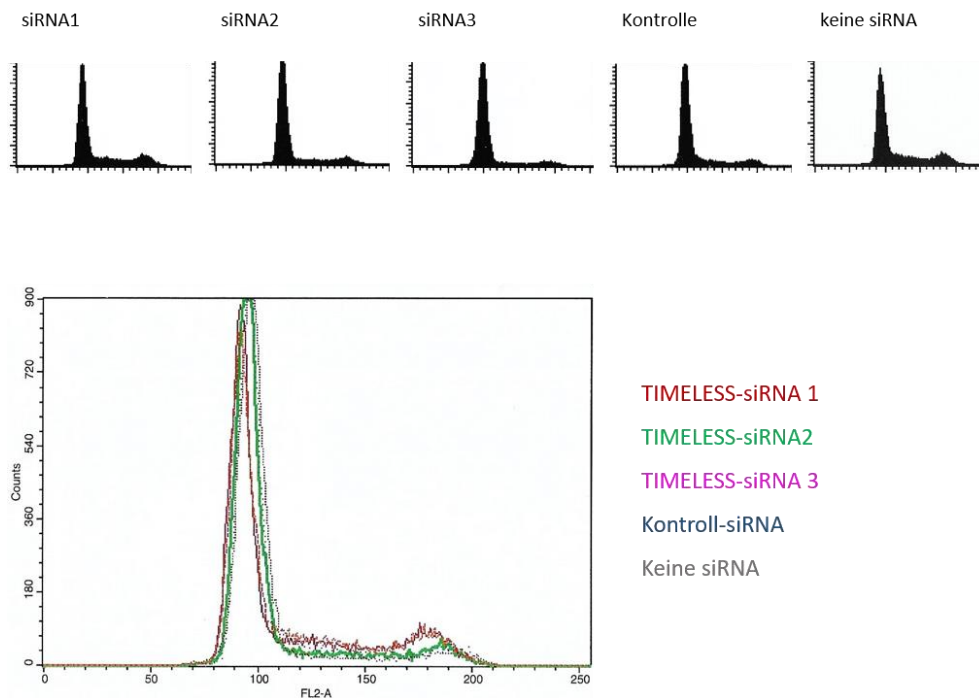


**Abbildung 29: Überexpression von TIMELESS nach Hemmung von Brn3a.** Auf mRNA-Ebene zeigte sich nach Plasmid-Transfektion eine suffiziente Hemmung von Brn3a (29A). Eine vollständige Re-Expression von TIMELESS nach Plasmid-Transfektion konnte aus Proteinebene nachgewiesen werden (29C). Auch nach Wiederherstellung der TIMELESS-Expression fanden sich eine Hochregulation von p21 auf mRNA- (29B) und Proteinebene (29C) sowie eine Spaltung der Caspase 3 (29C).

#### 5.2.2.8. Zellzyklusanalyse nach TIMELESS-Hemmung

Aufgrund der beschriebenen Rolle von TIMELESS in der Zellzyklusregulation [95] und der proteinbiochemisch nachgewiesenen Aktivierung von H2AX, führten wir zudem Untersuchungen des Zellzyklusprogresses mittels Zellzyklus-FACS-Analysen durch.

Um eine Beeinflussung des Zellzyklus durch TIMELESS zu analysieren, wurden 1205Lu Melanomzellen mit den drei verschiedenen siRNAs transfiziert und nach 48 h die PI-Färbung und Durchflusszytometrie durchgeführt. Allerdings zeigten sich für die einzelnen Phasen des Zellzyklus keine Unterschiede zwischen den Ansätzen mit TIMELESS- oder Kontroll-siRNA bzw. keiner siRNA (Abbildung 30). Es finden sich bei den dargestellten Histogrammen zwei Maxima (links G1-Phase, rechts G2/M-Phase), die dazwischenliegende Fraktion stellt die S-Phase dar. Vor der G1-Phase findet sich noch die sogenannte subG1-Population, welche durch die PI-Färbung von DNA-Fragmenten, welche bei einsetzender Apoptose entstehen können, zustande kommt. Die einzelnen Phasen des Zellzyklus und die korrespondierenden Beobachtungen im Zellzyklus-FACS sind unter 4.2.7.2. zusammengefasst.



**Abbildung 30: Zellzyklusanalyse 48 h nach TIMELESS-Hemmung.** Die Histogramme stellen exemplarisch einen Versuch aus drei unabhängigen Experimenten dar. Es zeigte sich nach Transfektion der drei gegen TIMELESS gerichteten siRNAs kein Unterschied zum Kontroll-siRNA transfizierten sowie zum nicht transfizierten Ansatz.

#### 5.2.2.9. Untersuchung der transkriptionellen Regulation von TIMELESS durch Brn3a mittels Reporteranalysen

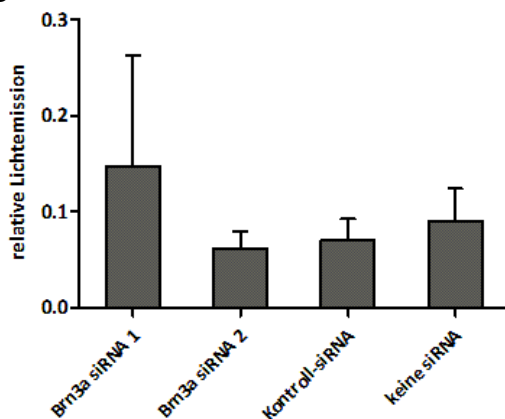
Um herauszufinden, ob es sich bei der Regulation von TIMELESS durch Brn3a um eine direkte Interaktion des Transkriptionsfaktors mit dem Gen TIMELESS handelt, führten wir sogenannte Reporteranalysen durch. Hierbei wird wie unter 4.2.8. beschrieben eine mögliche Bindestelle im Bereich des TIMELESSpromotors in den Promotorbereich eines Firefly-Luziferase-Vektors inkloniert und im Anschluss die Menge des produzierten Enzyms Firefly-Luziferase luminometrisch bestimmt. Es wurde der Vektor pGI2-Brn3.01-luc hergestellt, indem zwei 56 Basen lange, komplementäre Oligonukleotide synthetisiert, zusammengelagert und über flankierende Restriktionsschnittstellen in den Promotor des Reportervektors pGI2-K-luc integriert wurden. Das Oligonukleotid enthielt somit zwei aufeinanderfolgenden Sequenzen der Bindestelle Brn3.01. Der Timless Promotor sowie die potentielle Bindestelle Brn3.01 wurde dabei über die Software MatInspector von Genomatix generiert. Für TIMELESS wurde verschiedene Promotorregionen mit unterschiedlicher Güteklasse („bronze“, „silver“ und „gold“) identifiziert sowie auf verschiedene Bindestellen-Matrizen untersucht. Brn3.01 entspricht dabei einer degenerierten Matrize basierend auf der von Gruber et al. 1997 publizierten

Sequenz „ATTAATTAT“ aller Brn3-Faktoren [101]. Bei der in Matrizen-Form dargestellten Sequenzen ist zu beachten, dass einige Basen als hoch konserviert gelten und für einen hohen Informationsgehalt stehen. Die Zeichen in Großbuchstaben gehören zu der von der Software verwendeten Kernsequenz. Andere Buchstaben als A, T, G und C wurden in der Promotoranalyse als beliebige Zeichen verwendet. Neben Brn3.01 wurden im TIMELESS-Promotor noch weitere potentielle Bindestellen anderer POU-Transkriptionsfaktoren verschiedener Klassen identifiziert (Brn2.01, Brn2.03, Brn2.04, Brn3.01, BRN4.01, Brn4.02, TST1.01). Diese wurden von uns jedoch nicht weiter berücksichtigt.

**A**



**B**



**Abbildung 31: Luziferase-Assay zur Überprüfung einer direkten Regulation von TIMELESS durch Brn3a.** Darstellung der gewählten Promotorregion von TIMELESS mit der Bindestelle Brn3.01 (31A). Die Messung der Lichtemission ergab keinen Hinweis für eine Bindung von Brn3a an die gewählte Promotorregion. Es zeigte sich im Vergleich zum Kontroll-Vektor pGl2-K-luc keine verstärkte Lichtemission bei Transfektion des Vektors pGl2-Brn3.01-luc, der die Bindestelle Brn3.01 enthält. Auch eine siRNA vermittelte Hemmung von Brn3a hatte keinen Einfluss auf die transkriptionelle Aktivität (31B). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten.

1205Lu-Melanomzellen wurden zunächst mit Brn3a-spezifischen siRNAs oder Kontroll-siRNA behandelt und nach 24 h mit dem Genreporterplasmid transfiziert. Die Analyse der Luziferaseexpression erfolgte nach weiteren 24 h. Allerdings wurde dabei in drei unabhängigen Experimenten kein signifikanter Unterschied der Lichtemission zwischen den Ansätzen mit Brn3a-siRNA und Kontroll-siRNA bzw. keiner siRNA gemessen (Abbildung 31).

## 6. Diskussion

Die vorliegende Arbeit baut auf den Ergebnissen der Dissertation von Tobias Hohenauer auf, in welcher Brn3a erstmalig als Transkriptionsfaktor im Melanom erforscht wurde (vgl. 2.2.2). In dieser Arbeit sollten die gewonnenen Erkenntnisse zur Relevanz von Brn3a im Melanom vertieft und die molekulare Funktion von Brn3a weiter aufgeklärt werden. Dazu wurde erstmals eine genomweite Analyse der Brn3a-Zielgene durchgeführt. Ziel der Arbeit war es, direkte Zielgene von Brn3a zu identifizieren und so Brn3a-assoziierte molekulare Mechanismen zu entschlüsseln.

### 6.1. Microarrays zur Identifikation von Zielgenen des Transkriptionsfaktors Brn3a

Wir verwendeten Microarray-Analysen, die bereits in zahlreichen anderen Tumoren und auch im Melanom zum Einsatz kamen, um die Expression verschiedener Gene im Prozess der Tumorentstehung nachvollziehen zu können. Microarrays dienen meist dazu, mehr über die Expression verschiedener Gene innerhalb eines Tumors im Vergleich zu gesundem Gewebe zu erfahren [102]. Der Einsatz der Methode zur Überprüfung der Regulation verschiedener Gene durch einen Transkriptionsfaktor findet sich seltener. Ein großer Vorteil des Microarrays liegt in der Möglichkeit, zahlreiche Gene auf einmal zu analysieren oder genomweite Analysen durchzuführen. Dies ermöglicht eine unvoreingenommene Herangehensweise und damit die Entwicklung neuer Hypothesen.

Ein Nachteil an Microarrays zur Identifikation von Genen, die direkt durch einen Transkriptionsfaktor reguliert werden, ist die fehlende Information bezüglich Wechselwirkungen des Transkriptionsfaktors mit anderen Molekülen und somit die Möglichkeit unspezifischer Effekte [103]. Dieser Problematik versuchten wir durch die Verwendung von zwei verschiedenen komplementären Versuchsansätzen entgegenzuwirken. Es wurden dafür unterschiedliche Zellen (Melanomzellen und Melanozyten) und gegensätzliche Regulationen (siRNA-vermittelte Hemmung und lentivirale Überexpression von Brn3a) eingesetzt. Ziel dieser Kombination war es, eine stringente Selektion von Genen zu erzielen, die durch ihre Regulation in gesundem (Melanozyten) und malignem (Melanomzellen) Gewebe sich schließlich als möglichst direkt durch Brn3a reguliert erweisen. Darüber hinaus hatte sich in der Arbeit von Dr. Hohenauer gezeigt, dass im Microarray der Brn3a-Hemmung in 1205Lu-Zellen der Anteil von Genen, die indirekt über p53 reguliert waren, sehr hoch war. Deshalb wurden bei der letztendlichen Auswahl der relevanten Zielgene nur jene berücksichtigt, welche sich in den Ansätzen, die sowohl mit Brn3a- und p53-siRNA behandelt worden waren, reguliert gezeigt hatten.

Die geschilderte Vorgehensweise führte zu einer deutlichen Selektion (694 Gene im Microarray der Brn3a-Hemmung mit beiden siRNAs, 3153 im Microarray der Brn3a-Überexpression, 48 Gene ausgewählt).

Ein grundsätzlicher Nachteil der Methodik ist, dass Brn3a in Zellen künstlich überexprimiert und gehemmt wurde. Dabei ist anzunehmen, dass auch Gene reguliert werden, welche unter physiologischen Bedingungen nicht dem Einfluss des Transkriptionsfaktors unterliegen. Andererseits kann eine eigentlich bestehende Regulation nicht nachweisbar sein, weil in dem gewählten System enge Kontrollen durch andere Mechanismen bestehen. So trifft die Überexpression von Brn3a in Melanozyten auf keine weiteren genetischen Veränderungen (beispielsweise BRAF-Mutationen), während in Melanomzellen im Rahmen der Tumorentstehung viele genetische Veränderungen zu finden sind (vgl. 2.1.1.). Regulative Prozesse der Transkription in Melanozyten sind dabei gegebenenfalls noch vorhanden, welche in Melanomzellen später entfallen. Unspezifischen, transfektionsbedingten Effekten konnten durch den Einsatz entsprechender Kontrollen (Kontroll-siRNA, Kontroll-Plasmid) überwiegend Rechnung getragen werden.

Auch kann durch einen Microarray zur Analyse der Genregulation eines Transkriptionsfaktors keine Aussage über die Art der Regulation (direkt oder indirekt) getroffen werden. So können indirekte Regulationen oder sekundäre Regulationen über Induktion molekulargenetischer Prozesse nicht sicher ausgeschlossen werden [104]. Eine Möglichkeit, Zielgene mit direkter Regulation durch einen Transkriptionsfaktor zu identifizieren, bietet das Verfahren der Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP). Dabei kann eine direkte Protein-DNA-Interaktion bestimmt werden. Nachteil dieses Verfahrens sind jedoch unspezifische oder funktionell nicht relevante Bindungen, die dabei ebenfalls ermittelt werden [105, 106]. In Bezug auf unsere Microarray-Analysen würden ChIP-Experimente eine gute Ergänzung darstellen. Dies scheidet aktuell allerdings noch an einem für Brn3a nicht in ausreichender Qualität verfügbarem Antikörper.

Im Rahmen unserer Analysen wurden auch einige Gene aussortiert, welche in der Literatur bereits in Zusammenhang mit Melanomen beschrieben wurden, jedoch nur in einem der beiden Microarrays oder bei einer der beiden Brn3a-siRNAs eine deutliche Regulation aufwiesen. Das Gen SLIT3 (slit guidance ligand 3) zeigte sich beispielsweise in beiden Microarrays reguliert, allerdings wurde der gesetzte Schwellenwert für die Regulation bei der zweiten gegen Brn3a gerichteten siRNA nicht erreicht. Die Regulation verlief gegensätzlich zu Brn3a, d.h. Brn3a fungierte hier als Repressor. In der Literatur lagen Beschreibungen zu seiner Rolle in der Migration von Melanomzellen vor [107, 108]. Darüber hinaus zeigte sich im von uns zusätzlich in der Selektion verwendeten Datensatz der GEO-Datenbank eine deutliche Herabregulation in Melanomproben verglichen mit Proben normaler



Hautzellen und benigner Nävi, passend zu seiner Regulation durch Brn3a. Ein Abweichen von den definierten Kriterien hätte die Anzahl der möglichen Zielgene jedoch deutlich erhöht und die Auswertung hätten die Kapazitäten des Labors überstiegen. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte daher nicht außer Acht gelassen werden, dass wahrscheinlich einige Zielgene von Brn3a durch die strikten Selektionskriterien ausgeschlossen wurden.

## 6.2. siRNA-vermittelte Hemmung der Zielgene

Die Relevanz der Gene TIMELESS und FAM129A im Melanom wurde durch siRNA-vermittelte Hemmung geprüft. Ein nennenswertes Problem bei der Verwendung von siRNAs stellt die Gewährleistung der Spezifität der Genhemmung dar, da im Rahmen sogenannter Off-target-Effekte eine unerwünschte Regulation anderer Gene auftreten kann [109].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Verfahren angewendet, um eine möglichst hohe Spezifität der siRNA-vermittelten Hemmung von TIMELESS und FAM129A zu erreichen.

Mithilfe genomweiter DNA-Datenbanken (Basic Local Alignment Search Tool, BLAST, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) wurden die siRNA-Sequenzen auf die Einzigartigkeit ihrer Bindung an die Ziel-mRNA hin überprüft. Nichtsdestotrotz kann eine gewisse Interferenz der gewählten siRNA mit anderen Genen nicht sicher ausgeschlossen werden. Wir entschieden uns deshalb mehrere verschiedene siRNAs zu verwenden. Da bei Anwendung der FAM129A-siRNA 2 bereits zu Beginn eine deutliche Diskrepanz in Bezug auf die Stärke des beobachteten Effektes auffiel, wurde eine dritte siRNA hinzugezogen, welche den Effekt der ersten bestätigte. In Bezug auf die Hemmung von TIMELESS führten wir die ersten Experimente zunächst ebenfalls mit zwei siRNAs durch. Aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse entschieden wir uns auch hier, eine dritte siRNA hinzuzunehmen. Dabei handelte es sich um eine bereits publizierte Sequenz, welche im Rahmen der näheren Charakterisierung der Funktion von TIMELESS bereits Anwendung gefunden hatte [95, 96]. Zusätzlich führten wir bei allen durchgeführten Experimenten einen Kontrollansatz der Genhemmung durch eine Kontroll-siRNA mit. Deren Sequenz ist so gestaltet, dass sie keine Bindestelle im Genom hat. Da gezeigt werden konnte, dass das Auftreten von Off-target-Effekten in Beziehung mit der Konzentration der verwendeten siRNA steht [110], wurde auf die Verwendung geringer jedoch noch wirksamer siRNA-Konzentrationen geachtet.

Aufgrund der durchgeführten Maßnahmen, kann eine hohe Spezifität der verwendeten siRNAs angenommen werden. Dennoch könnten unterschiedlich stark ausgeprägte Effekte nach siRNA-vermittelter Genhemmung (z.B. H2AX-Aktivierung nach TIMELESS-Hemmung), für eine unterschiedliche Effektivität der siRNAs sprechen. Ebenso können gewisse Off-target-Effekte abhängig

von der siRNA für die Unterschiede der verschiedenen siRNAs verantwortlich sein. Da jedoch der beobachtete Phänotyp sehr ähnlich war, scheinen potentielle Off-target-Effekte eher eine untergeordnete Rolle zu spielen.

### 6.3. Unzureichende Reversibilität des Brn3a-Phänotyps durch FAM129A und TIMELESS

Bei den beiden näher untersuchten Zielgenen FAM129A und TIMELESS versuchten wir durch ein sogenanntes „Rescue-Experiment“ den durch eine Brn3a-Hemmung beobachteten Phänotyp mit Apoptose und Aktivierung von p21 und p53 durch eine Überexpression des gewählten Gens (FAM129A oder TIMELESS) zu „retten“ und die beobachteten Phänomene rückgängig zu machen. Wenn das Brn3a-regulierte Gen für den Phänotyp verantwortlich ist, dann sollte dessen Überexpression den Phänotyp bei Brn3a-Hemmung revertieren. Es zeigte sich in beiden Experimenten (siehe 5.2.1.4. und 5.2.2.7.), dass sich dies technisch zwar umsetzen ließ, jedoch nicht die erhofften Ergebnisse erbrachte. Sowohl FAM129A als auch TIMELESS ließen sich in Brn3a-gehemmten Zellen überexprimieren, dies änderte jedoch nichts an dem durch Brn3a-Hemmung erzeugten Phänotypen.

Ein Nachteil von Rescue-Experimenten ist die artifizielle Situation: Der Brn3a-Hemmung wird eine unphysiologisch hohe Expression des Zielgens gegenübergestellt, die an sich oft eigene zelluläre Effekte auf Regulationen und Morbidität der Zellen hat. Daher können damit nur sehr robuste zelluläre Mechanismen aufgezeigt werden.

Die Hemmung von FAM129A und TIMELESS führten genau wie die Hemmung von Brn3a zur Apoptose. Die Tatsache, dass durch die Überexpression von FAM129A und TIMELESS keine Abschwächung oder Reversibilität des Effektes beobachtet werden konnte, spricht dafür, dass bei Brn3a-Hemmung die Induktion der Apoptose neben FAM129A und TIMELESS maßgeblich dem Einfluss weiterer Brn3a-regulierter Gene unterliegt. Plausibel ist, dass mehrere Gene gemeinsam für den Phänotyp verantwortlich sind. Die Microarray-Daten zeigten dementsprechend auch eine Vielzahl an regulierten Genen. Technisch sind Rescue-Experimente mit mehreren verschiedenen Genen jedoch kaum umsetzbar.

### 6.4. FAM129A als Zielgen im Melanom

Im Gegensatz zu TIMELESS gibt es bisher nur vereinzelte Beschreibungen zur Funktion von FAM129A und zu seiner Relevanz in verschiedenen Tumoren. Die Expression von FAM129A wurde bisher in Plattenepithelkarzinomen des Kopf- und Halsbereiches [84], Nierenkarzinomen [85] und Schilddrüsenkarzinomen [111] gezeigt. In letzteren wurde auch seine Funktion als Tumormarker

untersucht [83, 112]. Darüber hinaus spielt FAM129A eine Rolle in der Entstehung der intestinalen Nierenfibrose [113].

Ein wenig mehr ist zu seiner Funktion bekannt. Eine Induktion der Apoptose nach FAM129A-Hemmung konnte in verschiedenen Publikationen gezeigt werden [86, 111, 113], dabei scheint eine AKT-abhängige Phosphorylierung von FAM129A und die darüber induzierte Destabilisierung des Tumorsuppressors p53 eine Rolle zu spielen. Murine Fibroblasten, welche kein FAM129A exprimierten, zeigten nach UV-Bestrahlung höhere Apoptoseraten als die Kontrollzellen mit exprimiertem FAM129A [86].

Im Melanom konnten wir nach Hemmung von FAM129A ebenfalls eine Apoptose-Induktion beobachten, wobei sich dieser Effekt bei drei verwendeten siRNAs unterschiedlich ausgeprägt zeigte. Dennoch konnte für alle drei siRNAs nach Transfektion eine Verminderung der Zellvitalität sowie als Ausdruck der Apoptose eine Spaltung der Caspase 3 gezeigt werden. Welcher genauen Regulation dieser Mechanismus im Melanom unterliegt ist zum aktuellen Zeitpunkt noch unklar. Weitere Untersuchungen der genauen Funktion FAM129A und seiner Interaktionspartner (AKT-Signalweg, p53) im Melanom sollten in Zukunft folgen.

Unsere Untersuchungen zur Expression von FAM129A in normalen Hautzellen und Tumorzellen sowie in Melanomzelllinien aus unterschiedlichen Melanomen hatten keine spezifische Regulation von FAM129A während der Tumorentstehung gezeigt. Auch die Überprüfung des Datensatzes der GEO-Datenbank erbrachte keine eindeutige Hochregulation von FAM129A in Melanomproben gegenüber normalem Hautgewebe oder benignen Nävi. Es wurden bisher keine proteinbiochemischen oder immunhistochemischen Untersuchungen der Expression im Melanom durchgeführt. Diese könnten wichtigen Aufschluss über die Expression von FAM129A in einzelnen Melanomproben geben und erlaubt gegebenenfalls auch die Analyse einer Korrelation der FAM129A-Expression mit verschiedenen weiteren Parametern (z.B. klinischem Verlauf).

Bezüglich der Regulation von FAM129A durch Brn3a ist aufgrund der Ergebnisse des Microarrays von einer starken Beeinflussung der Gentranskription durch Brn3a auszugehen. Allerdings liegen bisher noch keine Hinweise über die Art der Regulation vor. Mithilfe weiterer Verfahren wie die Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) und Reporteranalysen könnte hierzu Aufschluss gegeben werden.

Insgesamt legen unsere Ergebnisse nahe, dass FAM129A für das Überleben von Melanomzellen wichtig ist und die Regulation von FAM129A für einen Teil der Funktion von Brn3a im Melanom verantwortlich sein könnte.

## 6.5. TIMELESS als Zielgen im Melanom

Aufgrund der Ergebnisse der einzelnen Experimente, stellt sich vor allem das Gen TIMELESS als vielversprechendes neues Zielgen im Melanom dar. Die Tatsache, dass eine siRNA-vermittelte Hemmung zum Zellsterben in Melanomzellen, nicht jedoch in Fibroblasten (d.h. gesunden Hautzellen) führt, legt nahe, dass es sich bei TIMELESS um ein für diesen Tumor essentielles Gen handelt. Ein Überleben der Tumorzellen ohne TIMELESS war nicht möglich, wohingegen die Funktion normaler Zellen zumindest im kurzfristigen Verlauf des Experimentes nicht eingeschränkt erschien. Für den Vergleich wurden Fibroblasten und nicht Melanozyten gewählt, da sich in ersteren eine stabile und ausreichende siRNA-vermittelte Hemmung durchführen ließ, während uns dies in Melanozyten leider nicht verlässlich gelang. Die Problematik der schwierigen Transfektion von Melanozyten ist bekannt [65]. Ein Vergleich zwischen Melanozyten und Melanomzellen hätte bezüglich der Bewertung des Effektes der TIMELESS-Hemmung sicherlich eine höhere Aussagekraft. Fibroblasten und Melanozyten sind nur bedingt miteinander vergleichbar. So handelt es sich zwar bei beiden Zellpopulationen um Zellen der Haut, allerdings bestehen deutliche Unterschiede bezüglich ihrer Entwicklung und Funktion. Fibroblasten entstammen anders als Melanozyten nicht der Neuralleiste, sondern leiten sich von mesenchyalem Gewebe ab und gehören wie Knorpel- und Knochengewebe zum Bindegewebe [114]. Dass eine Hemmung von TIMELESS in Fibroblasten keinen Effekt gezeigt hatte, kann folglich nicht einfach auf Melanozyten übertragen werden und die daraus gezogene Schlussfolgerung eines in Melanomzellen spezifischen Effektes von TIMELESS muss mit Vorsicht betrachtet werden. Nichtsdestotrotz können die Ergebnisse des Vergleiches zwischen Fibroblasten als normale Zellen und Tumorzellen erste Hinweise für eine in der Tumorentstehung und -progression wichtige Rolle von TIMELESS liefern.

Diese Annahme wird auch von verschiedenen Veröffentlichungen der letzten Jahre gestützt, welche sich mit der Rolle von TIMELESS in anderen Tumorarten beschäftigt haben. Seine Expression und Funktion wurde dabei unter anderem im Lungen-, Mamma-, Zervix-, nasopharyngealen und hepatozellulären Karzinomen untersucht [89-93]. Es fand sich dabei in allen Beispielen eine deutliche Überexpression von TIMELESS im Vergleich zu normalem Gewebe. Zudem korrelierte die Expression von TIMELESS in vielen Fällen mit dem klinischen Verlauf der untersuchten Patienten. In den untersuchten Zervixkarzinomproben konnte beispielsweise ein Zusammenhang der TIMELESS-Expression mit dem Gesamtüberleben, des progressionsfreien Überlebens und der Wahrscheinlichkeit einer postoperativen Bestrahlung festgestellt werden [93]. Eine Korrelation mit dem Gesamtüberleben zeigte sich auch bei nasopharyngealen Karzinomen [91], sowie Mamma [89]- und Lungenkarzinomen [92]. Die Ergebnisse der Untersuchungen der einzelnen Tumore werden dabei auch von einer Analyse

von Mao et al. gestützt. Hier wurde von den Autoren die Datenbank Oncomine in Bezug auf TIMELESS in Tumoren untersucht. Es konnte dabei eine deutliche Hochregulation von TIMELESS für verschiedene Tumorarten festgestellt werden. Eine weitere Analyse von sechs verschiedenen Microarrays der GEO-Datenbank zeigte ebenso eine Assoziation der TIMELESS-Expression mit fortgeschrittenen Tumorstadien [88].

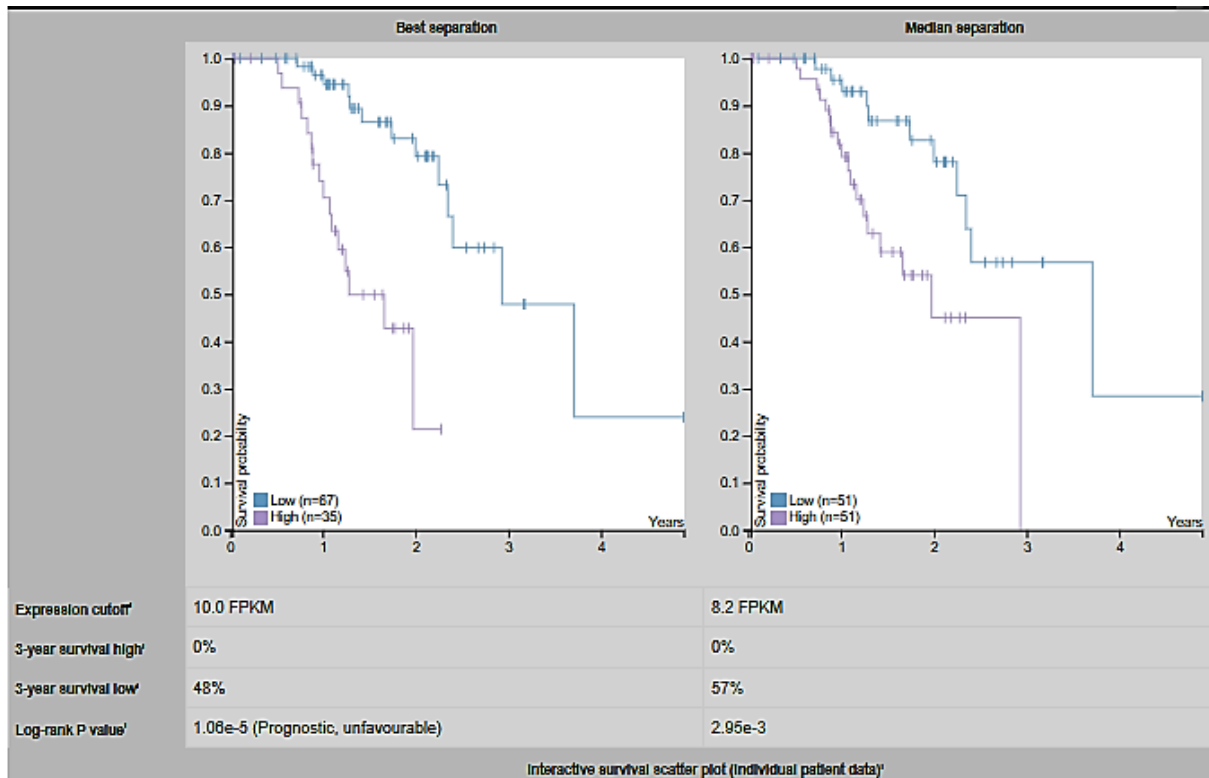
### 6.5.1. Regulation von TIMELESS im Melanom

Die von uns durchgeführte Expressionsanalyse in verschiedenen Melanomzelllinien, sowie Melanozyten, Keratinozyten und Fibroblasten zeigte, anders als die Regulation von Brn3a, keinen signifikanten Unterschied der TIMELESS Expression. Auch die Überprüfung des Datensatzes der GEO-Datenbank erbrachte keine eindeutige Hochregulation von TIMELESS in Melanomproben gegenüber normalem Hautgewebe oder benignen Nävi.

Eine genauere immunhisto- und proteinbiochemische Untersuchung verschiedener Melanomproben wäre für die Zukunft von Interesse. Erste Erkenntnisse diesbezüglich liefert „The Human Protein Atlas“. Hierbei handelt es sich um ein von Schweden aus koordiniertes Projekt, welches sich zum Ziel gesetzt hat, alle humanen Proteine in Zellen, Gewebe und Organen mithilfe verschiedener Omics-Technologien zu beschreiben. Informationstechnologische Verfahren werden hierbei genutzt, um Genome, Proteome oder Metabolome näher zu charakterisieren. Eine Sucheingabe für TIMELESS im „The Human Protein Atlas“ liefert das Ergebnis einer immunhistochemischen Färbung des Proteins in elf Melanomproben. Eine nachweisbare Expression von TIMELESS lag hierbei in sieben Proben vor, wobei sich zwei Proben nur schwach und fünf moderat bis stark anfärben ließen. In normalem Hautgewebe konnte TIMELESS nicht detektiert werden. Eine Analyse von Proben von 102 Patienten mit Melanom zeigte zudem eine Korrelation des Expressionslevels von TIMELESS (hoch bzw. niedrig) mit der Überlebenswahrscheinlichkeit. Patienten hatten je nach gewähltem Toleranzwert (cutoff) eine 3-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von 48% bzw. 57% bei niedriger TIMELESS-Expression, während diese bei 0% für hohe Expressionslevel lag (siehe Abbildung 32) [115]. Diese Ergebnisse lassen eine weitere Analyse der TIMELESS-Expression in weiteren Melanomproben und Patientenkollektiven sehr lohnenswert erscheinen.

Dabei sollte auch die Möglichkeit anderer Regulationsmechanismen von TIMELESS, welche sich nicht in der Menge an gebildeter mRNA oder Protein widerspiegeln, in Betracht gezogen werden. Fu et al. konnten beispielsweise 2012 zeigen, dass zwei sogenannte SNPs (single nucleotide polymorphisms, Einzelnukleotid-Polymorphismus) im TIMELESS Gen eine deutliche Assoziation zum Auftreten von Brustkrebs aufwiesen [116]. Als SNPs werden in der Genetik verschiedene Variationen einzelner

Basenpaare (single nucleotides) innerhalb eines DNA-Strangs bezeichnet. Untersuchungen, welche über eine quantitative Bestimmung von TIMELESS hinausgehen, könnten hier in Zukunft für eine umfassende Charakterisierung des Proteins in Hinblick auf seine Relevanz in der Melanomentstehung ermöglichen.



**Abbildung 32: Korrelation der TIMELESS Expression mit dem Überleben von Patienten mit Melanom nach "The Human Protein Atlas" [115]**

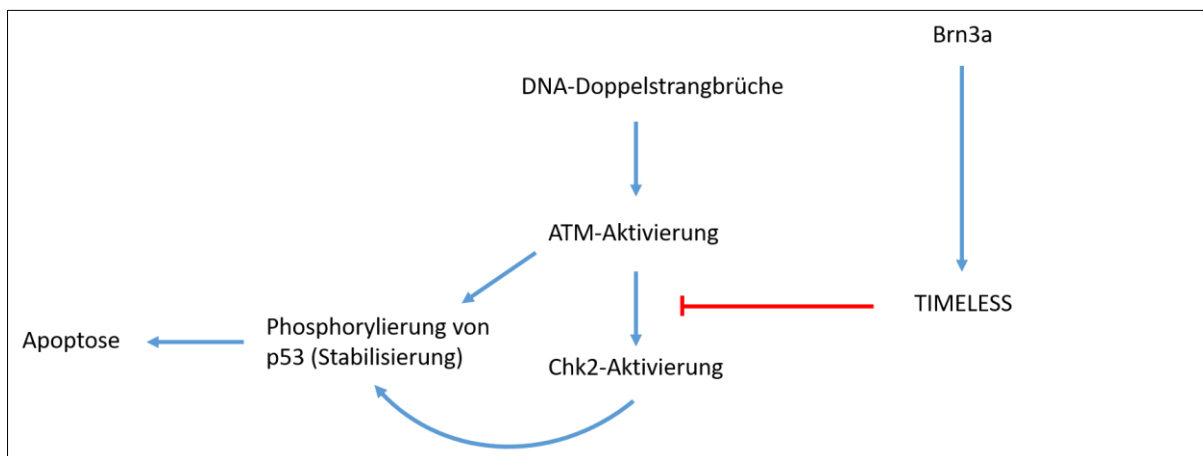
## 6.5.2. Funktion von TIMELESS

Wie bereits unter 5.2.2.1. beschrieben, konnte Yang et al. 2010 zeigen, dass TIMELESS die Checkpointkinase Chk2 hemmt. Über eine Inhibition der Phosphorylierung wird die Chk2-Aktivierung verhindert. Im Folgenden kommt es zu einer verminderten Aktivierung von p53 und konsekutiv zu einer Verhinderung von Zellzyklusarrests und Apoptose. Eine Aktivierung dieses Signalweges wird dabei über DNA-Doppelstrangbrüche, d.h. Schäden an der DNA ausgelöst [95]. Die Funktion von TIMELESS wurde auch in den bereits genannten Tumorarten untersucht, meist kam dabei eine siRNA-vermittelte Hemmung von TIMELESS zum Einsatz. In Lungenkarzinomzellen führte eine TIMELESS-Hemmung zu einer verminderten Proliferation sowie zur Induktion von Apoptose [92]. Ähnliche Ergebnisse ließen sich in hepatozellulären Karzinomzellen nachweisen, hier kam es nach TIMELESS-Hemmung ebenfalls zur Induktion der Apoptose, außerdem ließ sich ein Zellzyklusarrest in der G2-

Phase beobachten [90]. Eine stabile Überexpression von TIMELESS in nasopharyngealen Karzinomzellen erzeugte eine Resistenz der Zellen gegenüber Cisplatin-induzierter Apoptose und führte zu einer Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Signalweges [91].

Young et al. konnten darüber hinaus 2015 zeigen, dass im Rahmen des DNA-damage-signaling ein Komplex aus TIMELESS und dem Protein PARP1 (Poly(ADP-Ribose)-Polymerase 1) - eines der wichtigsten Proteine in der Erkennung von DNA-Doppelstrangbrüchen - gebildet wird. Bei einer ebenfalls siRNA-vermittelten Hemmung, kam es zu einer deutlichen Einschränkung des Reparaturmechanismus von DNA-Doppelstrangbrüchen [117].

In unserer Untersuchung von TIMELESS im Melanom konnten wir ebenfalls eine Induktion der Apoptose über p53 sowie eine Aktivierung des zellzyklusregulierenden Faktors p21 beobachten. Außerdem führte eine Hemmung von TIMELESS zu einer Aktivierung von H2AX, als Ausdruck für vorliegenden DNA-Schaden.



**Abbildung 33: Mögliche Funktion von Timeless im Melanom.** Die Brn3a-vermittelte Regulation von TIMELESS hat über Hemmung Chk2-Kinase-Aktivierung einen Einfluss auf die Phosphorylierung von p53 und die Induktion der Apoptose.

Abbildung 33 zeigt vereinfacht die von Yang et al. beschriebene Funktion von TIMELESS in der Regulation des damage signaling und einen möglichen Zusammenhang mit Brn3a. In Dr. Hohenauers Arbeit wurde nach Brn3a-Hemmung das Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen nachgewiesen, welche im Folgenden über p53 zu einer Induktion der Apoptose sowie einem Zellzyklus-Arrest führten. Es wurde vermutet, dass es sich dabei um Onkogen-induzierte DNA-Schädigung handeln könnte, welche nicht mehr durch Brn3a unterdrückt wird. Aufgrund der nun vorliegenden Ergebnisse, könnte eine Hochregulation von TIMELESS durch Brn3a dafür verantwortlich sein. TIMELESS verhindert über eine Inhibition der Aktivierung der Chk2-Kinase die Phosphorylierung von p53 und somit ein Eintreten der Zellen in die Apoptose. Durch eine Herabregulation von Brn3a kommt es konsequent zu einer

verminderten Expression von TIMELESS und somit zu einer verminderten Inhibition des ATM/Chk2-Signalweges.

Da es sich bei Tumorzellen um sehr rasch proliferierende Zellen handelt, fallen im Rahmen der Zellteilung vermehrt DNA-Schäden an, welche in normalen Zellen entweder zu einem Arrest des Zellzyklus (Seneszenz) oder zum programmierten Zelltod führen würden. Eine Eigenschaft von Tumorzellen stellt, wie in den „hallmarks of cancer“ beschrieben, die Umgehung dieser Mechanismen dar, um eine ungehemmte Proliferation der Zellen zu gewährleisten. Die Hochregulation von TIMELESS über Brn3a könnte dabei im Melanom, bei Auftreten von DNA-Schäden im Rahmen der Replikation, zur Vermeidung der Apoptose beitragen.

### 6.5.3. Beeinflussung des Zellzyklus durch TIMELESS

TIMELESS spielt eine wesentliche Rolle in der Kontrolle des Zellzyklus. Ein Zusammenhang des Zellzyklus mit dem zirkadianen Rhythmus über verschiedene Clock-Proteine, darunter TIMELESS, konnte bereits in mehreren Veröffentlichungen gezeigt werden. Eine Zusammenfassung gibt hierbei die Übersichtsarbeit von Masri et al. [118]. Für TIMELESS ist eine Inhibition des ATM/Chk2-Signalwegs, welcher neben der Induktion der Apoptose hauptsächlich einen G2/M-Zellzyklusarrest bewirkt, beschrieben [95]. Außerdem inhibiert TIMELESS den ATR/Chk1-Signalweg, welcher zu einem Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase führt [119]. Abbildung 34 zeigt die bisher angenommene Rolle von TIMELESS in Bezug auf die Zellzyklusregulation. Ein Zellzyklusarrest in der G2-Phase nach TIMELESS-Hemmung konnte in hepatozellulären Karzinomzellen festgestellt werden [90]. In nasopharyngealen Karzinomzellen hatte sie nach Applikation von Cisplatin den gleichen Effekt [91].

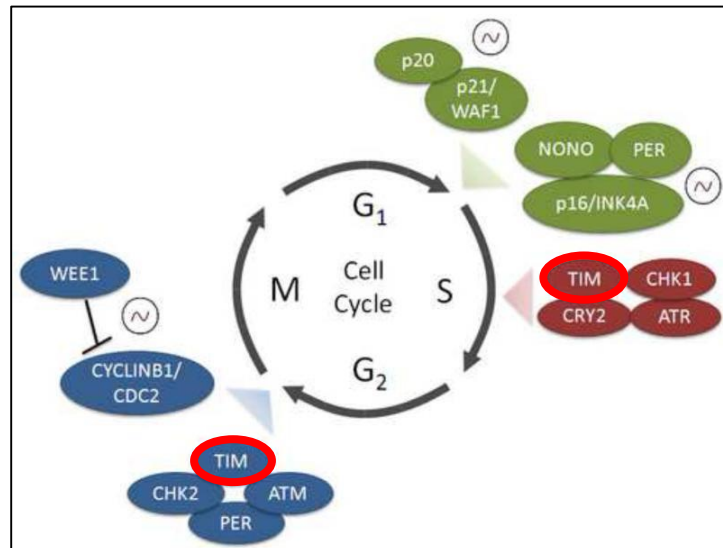
Auch die Hemmung von Brn3a hatte Veränderungen des Zellzyklus, im Sinne einer Reduktion der Zellen in der S- und G2/M-Phase sowie einem Anstieg der Zellen in der G1-Phase ergeben. Dies entspricht einer Arretierung des Zellzyklus in der G1-Phase. Zudem zeigte sich eine subG0-Population, als Ausdruck nachfolgender Apoptose (vgl. 4.2.7.2.). Die zusätzliche Hemmung von p53 bewirkte eine überwiegende Normalisierung des Zellzyklus, so dass eine p53-Aktivierung als ursächlich für die unter Brn3a Hemmung beobachteten Veränderungen angenommen wurde [65].

Eine Überprüfung des Einflusses einer Hemmung von TIMELESS auf den Zellzyklus im Melanom war aufgrund dieser Beobachtungen naheliegend. In unseren Untersuchungen ließ sich 48 h nach TIMELESS-Hemmung jedoch keine quantitative Änderung der einzelnen Subpopulationen innerhalb des Zellzyklus feststellen.

Eine Aktivierung von p53 im Rahmen des damage signalings kann zum Zellzyklusarrest, aber auch zu Apoptose ohne vorausgehende Veränderungen des Zellzyklus führen [120, 121]. Nach TIMELESS-



Hemmung in Melanomzellen zeigte sich eine Aktivierung von p53 und die Induktion der Apoptose, jedoch kein Arrest des Zellzyklus. Zusammen mit den in der Literatur beschriebenen molekularen Mechanismen von TIMELESS lässt sich schlussfolgern, dass eine TIMELESS-Hemmung im Melanom vermutlich über eine ATM/Chk2-Aktivierung zur p53-Stabilisierung und konsekutiver Apoptose führt, ohne dabei den Zellzyklus zu beeinflussen. Der Zellzyklusarrest nach Brn3a-Hemmung ist folglich durch die Regulation anderer Gene bedingt, welche ebenfalls über p53 Einfluss auf den Zellzyklus ausüben.



**Abbildung 34: Die Rolle von TIMELESS im Zellzyklus** (nach Masri et al., 2013 [118]).

Um die Rolle von TIMELESS im Zellzyklus und bei der Apoptose im Melanom und während der Melanomentstehung besser zu charakterisieren sind in Zukunft weitere Experimente notwendig. So wäre beispielsweise eine Hemmung von TIMELESS in UV-bestrahlten Melanozyten denkbar. Dabei könnten Erkenntnisse zur Funktion von TIMELESS im Zellzyklus bei noch nicht maligne transformierten Zellen gewonnen und mögliche onkogene Eigenschaften des Gens näher untersucht werden.

#### 6.5.4. Regulation von TIMELESS durch Brn3a

Zur weiteren Charakterisierung von TIMELESS in Bezug auf seine Regulation durch Brn3a wurde eine Reportergeranalyse mithilfe des Luziferase-Assays durchgeführt. Die Ergebnisse der beiden Microarrays zeigten bereits eine deutliche Regulation von TIMELESS durch Brn3a. Allerdings ließen die Microarrays keinen Rückschluss zu, ob es sich um eine direkte Regulation handelt, die auf einer Bindung von Brn3a am TIMELESS-Promoter beruht.

Nach Auswertung der Promotorregion von TIMELESS wurde von uns der Abschnitt mit der potentiellen Brn3a-Bindestelle [101] in den Luziferasevektor kloniert. In der anschließenden Auswertung konnte

dabei allerdings keine direkte Regulation durch Brn3a festgestellt werden. Diesem Ergebnis können unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen.

Die zunächst nahliegende Schlussfolgerung geht von dem Vorliegen einer indirekten Regulation von TIMELESS durch Brn3a aus. So ist es möglich, dass die Regulation von TIMELESS durch Brn3a durch ein weiteres, zwischen geschaltetes Gen beeinflusst wird.

Eine weitere Ursache könnte sein, dass bei der Reporteranalyse nur potentielle Brn3a-Bindestellen und nicht der gesamte Promotorbereich von TIMELESS eingesetzt wurden. Es ist durchaus möglich, dass die eigentliche Bindungsstelle im Promotor von Brn3a trotz enthaltener Matrize nicht erfasst wurde oder für eine ausreichende Bindung ein größerer Abschnitt des Promotorbereichs notwendig gewesen wäre. Folglich lässt sich mit den hier vorliegenden Ergebnissen eine direkte Regulation von TIMELESS durch Brn3a nicht sicher ausschließen, auch wenn sie aufgrund der durchgeführten Reporteranalysen eher unwahrscheinlich erscheint.

Unabhängig von der Art der Regulation konnte durch die Microarray-Analysen sowie die anschließende Verifizierung der Daten mittels qRT-PCR eine Beeinflussung der Genexpression durch Brn3a bewiesen werden. Eine unspezifische Regulation im Rahmen der Brn3a-Hemmung oder -Überexpression lässt sich durch die eindeutige Regulation in beiden sehr gegensätzlichen Microarrays mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließen.

## 6.6. Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit verdeutlichen die molekularbiologische Komplexität, welche der Entstehung des Melanoms und seiner Progression zugrunde liegt. Eine essentielle Rolle des Transkriptionsfaktors Brn3a wurde in den Vorarbeiten zu dieser Arbeit gezeigt. Das Bestreben in der Erforschung der Prozesse der Tumorentstehung gilt der Entwicklung möglichst spezifischer und zielgerichteter neuer Therapieansätze. Aufgrund seiner regulativen Funktion verschiedenster molekularbiologischer Mechanismen ist ein Transkriptionsfaktor eine therapeutisch schwierig zugängliche Struktur. Die Erforschung der Zielgene von Brn3a und die Untersuchung ihrer Rolle im Melanom war deshalb ein wichtiger weiterer Schritt. Die gewählten Versuchsansätze führten zur stringenten Selektion weniger Gene in einem genomweiten Versuchsansatz und führten schließlich zur Entdeckung neuer Brn3a-regulierter Gene wie FAM129A und TIMELESS. Allerdings zeigen sich auch die Grenzen der Methodik angesichts der Komplexität von Transkriptionsfaktoren. Vermutlich aufgrund der Vielfalt Brn3a-regulierter Gene war es nicht möglich den Phänotyp bei Brn3a-Hemmung auf die Regulation eines einzigen Zielgens zu reduzieren.

Nicht alle der nach Anlage der Schwellenwerte selektierten Gene konnten dabei umfassend untersucht werden. Mit dem Aufkommen neuer Technologien und Verfahren zum Hochdurchsatz-Screening wird es in Zukunft hoffentlich gelingen, sich eine größere Anzahl an Gene in Bezug auf ihre Regulation durch Brn3a und ihre Funktion im Melanom genauer anzusehen und so weitere Einblicke in die komplexen Prozesse der Tumorentstehung und -progression zu erhalten. Wichtig wären in diesem Zusammenhang auch Untersuchungen mittels genomweiter ChIP-Experimente. Dies scheitert momentan an der fehlender Verfügbarkeit ChIP-geeigneter Antikörper für Brn3a.

In Bezug auf FAM129A liegen bisher nur wenige Erkenntnisse vor. Anders als bei TIMELESS konnten wir keine genaueren Aussagen zu seiner Funktion im Melanom treffen. Die Tatsache, dass eine Hemmung von FAM129A die Apoptose von Melanomzellen bewirkt, legt jedoch eine essentielle Funktion von FAM129A im Melanom nahe. Eine weitere Untersuchung dieses Gens sowohl in normalem Gewebe als auch im Melanom zur Erweiterung der bisherigen Erkenntnisse erscheint lohnenswert.

TIMELESS wurde bereits in vielen Tumorarten untersucht und auch im Melanom gelang uns eine Charakterisierung seiner Funktion. Eine Überexpression TIMELESS korrelierte in den meisten in der Literatur beschriebenen Tumorarten mit einem schlechteren klinischen Verlauf. Eine detaillierte Untersuchung dieser Korrelation im Melanom wäre zunächst sicherlich hilfreich, um Erkenntnisse über die Relevanz von TIMELESS als prognostischer Marker in der Krankheitsprogression beim Melanom gewinnen zu können.

Der Einsatz zielgerichteter Therapien gegen TIMELESS erscheint vielversprechend aufgrund der Tatsache, dass eine Hemmung in Fibroblasten zumindest im kurzfristigen Verlauf nicht zum Zellsterben führte. Hierfür ist jedoch definitiv noch eine genauere Charakterisierung der Funktion von TIMELESS in Melanom, aber auch in normalem Gewebe notwendig. Infolge seiner angenommenen Funktion in der Zellzyklusregulation und der Replikation ist zu befürchten, dass eine Therapie, welche eine Hemmung von TIMELESS als Grundlage hat, über längere Zeit auch zu Beeinträchtigung und Schäden von anderem Gewebe und Zellen führt. Sie würde damit mit ähnlichen Problemen herkömmlicher Chemotherapie einhergehen. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass TIMELESS, neben seiner Funktion in der Regulation des Zellzyklus und der Replikation, onkogene Eigenschaften besitzt und die Metastasierung von Tumorzellen begünstigen kann [91]. Hierüber könnten sich zukünftig - z.B. über mit TIMELESS interagierende Proteine – weitere interessante Ansätze für neue Therapien ergeben.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Statista, *Verteilung der Sterbefälle nach Todesursachen*, verfügbar unter: <https://de.statista.com/statistik/daten/studie/240/umfrage/verteilung-der-sterbefaelle-nach-todesursachen/>, aufgerufen am 04.04.2018.
2. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
3. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
4. 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.
5. Institut, Z.f.K.-R.K., *Krebs in Deutschland 2013/2014*. 2017. **11. Auflage**.
6. *Leitlinie Melanom 2013: Diagnostik, Therapie und Nachsorge*.
7. Garbe, C. and U. Leiter, *Melanoma epidemiology and trends*. Clin Dermatol, 2009. **27**(1): p. 3-9.
8. Rastrelli, M., et al., *Melanoma: epidemiology, risk factors, pathogenesis, diagnosis and classification*. In Vivo, 2014. **28**(6): p. 1005-11.
9. Bhatia, S., S.S. Tykodi, and J.A. Thompson, *Treatment of metastatic melanoma: an overview*. Oncology (Williston Park), 2009. **23**(6): p. 488-96.
10. Bender, C., J.C. Hassel, and A. Enk, *Immunotherapy of Melanoma*. Oncol Res Treat, 2016. **39**(6): p. 369-76.
11. Lo, J.A. and D.E. Fisher, *The melanoma revolution: from UV carcinogenesis to a new era in therapeutics*. Science, 2014. **346**(6212): p. 945-9.
12. Long, G.V., et al., *Long-Term Outcomes in Patients With BRAF V600-Mutant Metastatic Melanoma Who Received Dabrafenib Combined With Trametinib*. J Clin Oncol, 2018. **36**(7): p. 667-673.
13. Grob, J.J., et al., *Comparison of dabrafenib and trametinib combination therapy with vemurafenib monotherapy on health-related quality of life in patients with unresectable or metastatic cutaneous BRAF Val600-mutation-positive melanoma (COMBI-v): results of a phase 3, open-label, randomised trial*. Lancet Oncol, 2015. **16**(13): p. 1389-98.
14. Ascierto, P.A., et al., *Cobimetinib combined with vemurafenib in advanced BRAF(V600)-mutant melanoma (coBRIM): updated efficacy results from a randomised, double-blind, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2016. **17**(9): p. 1248-60.
15. Schadendorf, D., et al., *Melanoma*. Nat Rev Dis Primers, 2015. **1**: p. 15003.
16. Hodi, F.S., et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(8): p. 711-23.
17. Robert, C., et al., *Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2011. **364**(26): p. 2517-26.
18. Robert, C., et al., *Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation*. N Engl J Med, 2015. **372**(4): p. 320-30.
19. Weber, J.S., et al., *Nivolumab versus chemotherapy in patients with advanced melanoma who progressed after anti-CTLA-4 treatment (CheckMate 037): a randomised, controlled, open-label, phase 3 trial*. Lancet Oncol, 2015. **16**(4): p. 375-84.
20. Larkin, J., F.S. Hodi, and J.D. Wolchok, *Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma*. N Engl J Med, 2015. **373**(13): p. 1270-1.
21. Postow, M.A., et al., *Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma*. N Engl J Med, 2015. **372**(21): p. 2006-17.
22. 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.
23. Miller, A.J. and M.C. Mihm, Jr., *Melanoma*. N Engl J Med, 2006. **355**(1): p. 51-65.

24. Daud, A. and B.C. Bastian, *Beyond BRAF in melanoma*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2012. **355**: p. 99-117.
25. Pollock, P.M., et al., *High frequency of BRAF mutations in nevi*. *Nat Genet*, 2003. **33**(1): p. 19-20.
26. Curtin, J.A., et al., *Distinct sets of genetic alterations in melanoma*. *N Engl J Med*, 2005. **353**(20): p. 2135-47.
27. Jakob, J.A., et al., *NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma*. *Cancer*, 2012. **118**(16): p. 4014-23.
28. Rubinstein, J.C., et al., *Incidence of the V600K mutation among melanoma patients with BRAF mutations, and potential therapeutic response to the specific BRAF inhibitor PLX4032*. *J Transl Med*, 2010. **8**: p. 67.
29. Lovly, C.M., et al., *Routine multiplex mutational profiling of melanomas enables enrollment in genotype-driven therapeutic trials*. *PLoS One*, 2012. **7**(4): p. e35309.
30. Michaloglou, C., et al., *BRAF<sup>E600</sup>-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi*. *Nature*, 2005. **436**(7051): p. 720-4.
31. Ozenne, P., et al., *The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer*. *Int J Cancer*, 2010. **127**(10): p. 2239-47.
32. Knudson, A.G., Jr., *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1971. **68**(4): p. 820-3.
33. Goel, V.K., et al., *Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAF<sup>V600E</sup> mice*. *Oncogene*, 2009. **28**(23): p. 2289-98.
34. Dankort, D., et al., *Braf<sup>V600E</sup> cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma*. *Nat Genet*, 2009. **41**(5): p. 544-52.
35. Maguire, L.H., A.R. Thomas, and A.M. Goldstein, *Tumors of the neural crest: Common themes in development and cancer*. *Dev Dyn*, 2015. **244**(3): p. 311-22.
36. Hsu, M.Y., et al., *Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas*. *J Investig Dermatol Symp Proc*, 1996. **1**(2): p. 188-94.
37. Jiao, Y., et al., *Matrix metalloproteinase-2 promotes alpha<sub>v</sub>beta<sub>3</sub> integrin-mediated adhesion and migration of human melanoma cells by cleaving fibronectin*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e41591.
38. Uong, A. and L.I. Zon, *Melanocytes in Development and Cancer*. *J Cell Physiol*, 2010. **222**(1): p. 38-41.
39. Crane, J.F. and P.A. Trainor, *Neural crest stem and progenitor cells*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2006. **22**: p. 267-86.
40. Kalluri, R., *The basics of epithelial-mesenchymal transition*. 2009. **119**(6): p. 1420-8.
41. Vance, K.W. and C.R. Goding, *The transcription network regulating melanocyte development and melanoma*. *Pigment Cell Res*, 2004. **17**(4): p. 318-25.
42. Schonemann, M.D., et al., *POU domain factors in neural development*. *Adv Exp Med Biol*, 1998. **449**: p. 39-53.
43. Budhram-Mahadeo, V., et al., *The Brn-3a POU family transcription factor stimulates p53 gene expression in human and mouse tumour cells*. *Neurosci Lett*, 2002. **334**(1): p. 1-4.
44. Chiarugi, V., M. Del Rosso, and L. Magnelli, *Brn-3a, a neuronal transcription factor of the POU gene family: indications for its involvement in cancer and angiogenesis*. *Mol Biotechnol*, 2002. **22**(2): p. 123-7.
45. 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.
46. Ishii, J., et al., *POU domain transcription factor BRN2 is crucial for expression of ASCL1, ND1 and neuroendocrine marker molecules and cell growth in small cell lung cancer*. *Pathol Int*, 2013. **63**(3): p. 158-68.

47. Samady, L., et al., *The Brn-3b POU family transcription factor represses plakoglobin gene expression in human breast cancer cells*. *Int J Cancer*, 2006. **118**(4): p. 869-78.
48. 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.
49. 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 USA*, 1993. **90**(22): p. 10841-5.
50. Eng, S.R., et al., *POU-domain factor Brn3a regulates both distinct and common programs of gene expression in the spinal and trigeminal sensory ganglia*. *Neural Dev*, 2007. **2**: p. 3.
51. 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.
52. Eng, S.R., et al., *Coordinated regulation of gene expression by Brn3a in developing sensory ganglia*. *Development*, 2004. **131**(16): p. 3859-70.
53. 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.
54. 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.
55. Ensor, E., M.D. Smith, and D.S. Latchman, *The BRN-3A transcription factor protects sensory but not sympathetic neurons from programmed cell death/apoptosis*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(7): p. 5204-12.
56. 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.
57. 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.
58. 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.
59. Perez-Sanchez, C., V.S. Budhram-Mahadeo, and D.S. Latchman, *Distinct promoter elements mediate the co-operative effect of Brn-3a and p53 on the p21 promoter and their antagonism on the Bax promoter*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(22): p. 4872-80.
60. Trieu, M., et al., *Direct autoregulation and gene dosage compensation by POU-domain transcription factor Brn3a*. *Development*, 2003. **130**(1): p. 111-21.
61. Ndisang, D., et al., *The Brn-3a transcription factor plays a key role in regulating the growth of cervical cancer cells in vivo*. *Oncogene*, 2001. **20**(35): p. 4899-903.
62. Ahmed, N., et al., *Neuronal transcription factor Brn-3a(l) is over expressed in high-grade ovarian carcinomas and tumor cells from ascites of patients with advanced-stage ovarian cancer*. *J Ovarian Res*, 2010. **3**: p. 17.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. Hudson, C.D., et al., *Brn-3a transcription factor blocks p53-mediated activation of proapoptotic target genes Noxa and Bax in vitro and in vivo to determine cell fate*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(12): p. 11851-8.
68. Bartkova, J., et al., *Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints*. *Nature*, 2006. **444**(7119): p. 633-7.

69. Di Micco, R., et al., *Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication*. *Nature*, 2006. **444**(7119): p. 638-42.
70. Bumgarner, R., *DNA microarrays: Types, Applications and their future*. *Curr Protoc Mol Biol*, 2013. **0 22**: p. Unit-22.1.
71. Shalon, D., S.J. Smith, and P.O. Brown, *A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization*. *Genome Res*, 1996. **6**(7): p. 639-45.
72. Tang, T., et al., *Expression ratio evaluation in two-colour microarray experiments is significantly improved by correcting image misalignment*. *Bioinformatics*, 2007. **23**(20): p. 2686-91.
73. Saei, A.A., *A Glance at DNA Microarray Technology and Applications*. 2011. **1**(2): p. 75-86.
74. Slonim, D.K. and I. Yanai, *Getting Started in Gene Expression Microarray Analysis*. *PLoS Comput Biol*, 2009. **5**(10).
75. Fire, A., et al., *Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans**. *Nature*, 1998. **391**(6669): p. 806-11.
76. Li, M.L., et al., *The evolving world of small RNAs from RNA viruses*. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2016.
77. Reynolds, A., et al., *Rational siRNA design for RNA interference*. *Nat Biotechnol*, 2004. **22**(3): p. 326-30.
78. 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.
79. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. *Nature*, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
80. National Center for Biotechnology Information, *Basic Local Alignment Search Tool*, verfügbar unter: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, aufgerufen am 08.10.2017.
81. Edgar, R., M. Domrachev, and A.E. Lash, *Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository*. *Nucleic Acids Res*, 2002. **30**(1): p. 207-10.
82. Talantov, D., et al., *Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions*. *Clin Cancer Res*, 2005. **11**(20): p. 7234-42.
83. Matsumoto, F., et al., *A novel tumor marker, Niban, is expressed in subsets of thyroid tumors and Hashimoto's thyroiditis*. *Hum Pathol*, 2006. **37**(12): p. 1592-600.
84. Ito, S., et al., *Frequent expression of Niban in head and neck squamous cell carcinoma and squamous dysplasia*. *Head Neck*, 2010. **32**(1): p. 96-103.
85. Adachi, H., et al., *Niban gene is commonly expressed in the renal tumors: a new candidate marker for renal carcinogenesis*. *Oncogene*, 2004. **23**(19): p. 3495-500.
86. Ji, H., et al., *AKT-dependent phosphorylation of Niban regulates nucleophosmin- and MDM2-mediated p53 stability and cell apoptosis*. *EMBO Rep*, 2012. **13**(6): p. 554-60.
87. Riedl, S.J. and Y. Shi, *Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(11): p. 897-907.
88. Mao, Y., et al., *Potential cancer-related role of circadian gene TIMELESS suggested by expression profiling and in vitro analyses*. *BMC Cancer*, 2013. **13**: p. 498.
89. Chi, L., et al., *TIMELESS contributes to the progression of breast cancer through activation of MYC*. *Breast Cancer Res*, 2017. **19**(1): p. 53.
90. Elgohary, N., et al., *Protumorigenic role of Timeless in hepatocellular carcinoma*. *Int J Oncol*, 2015. **46**(2): p. 597-606.
91. Liu, S.L., et al., *TIMELESS confers cisplatin resistance in nasopharyngeal carcinoma by activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway and promoting the epithelial mesenchymal transition*. *Cancer Lett*, 2017. **402**: p. 117-130.
92. Yoshida, K., et al., *TIMELESS is overexpressed in lung cancer and its expression correlates with poor patient survival*. *Cancer Sci*, 2013. **104**(2): p. 171-7.
93. Zhang, W., et al., *Aberrant TIMELESS expression is associated with poor clinical survival and lymph node metastasis in early-stage cervical carcinoma*. *Int J Oncol*, 2017. **50**(1): p. 173-184.

94. Paull, T.T., *Mechanisms of ATM Activation*. Annu Rev Biochem, 2015. **84**: p. 711-38.
95. Yang, X., P.A. Wood, and W.J. Hrushesky, *Mammalian TIMELESS is required for ATM-dependent CHK2 activation and G2/M checkpoint control*. J Biol Chem, 2010. **285**(5): p. 3030-4.
96. Unsal-Kacmaz, K., et al., *The human Tim/Tipin complex coordinates an Intra-S checkpoint response to UV that slows replication fork displacement*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(8): p. 3131-42.
97. Li, M.O., et al., *Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells*. Science, 2003. **302**(5650): p. 1560-3.
98. Sharma, A., K. Singh, and A. Almasan, *Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage*. Methods Mol Biol, 2012. **920**: p. 613-26.
99. Urtishak, K.A., et al., *Timeless Maintains Genomic Stability and Suppresses Sister Chromatid Exchange during Unperturbed DNA Replication*. J Biol Chem, 2009. **284**(13): p. 8777-85.
100. Schonh, I., J. Hennesen, and D.C. Dartsch, *Cellular responses to etoposide: cell death despite cell cycle arrest and repair of DNA damage*. Apoptosis, 2010. **15**(2): p. 162-72.
101. 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.
102. Grant, G.M., et al., *Microarrays in cancer research*. Anticancer Res, 2004. **24**(2a): p. 441-8.
103. Taverner, N.V., J.C. Smith, and F.C. Wardle, *Identifying transcriptional targets*. Genome Biol, 2004. **5**(3): p. 210.
104. Gorte, M., et al., *Microarray-based identification of transcription factor target genes*. Methods Mol Biol, 2011. **754**: p. 119-41.
105. Vinckevicius, A. and D. Chakravarti, *Chromatin immunoprecipitation: advancing analysis of nuclear hormone signaling*. J Mol Endocrinol, 2012. **49**(2): p. R113-23.
106. Turner, B., *ChIP with Native Chromatin: Advantages and Problems Relative to Methods Using Cross-Linked Material*. In: *Mapping Protein/DNA Interactions by Cross-Linking*. 2001, Paris: Institut national de la santé et de la recherche médicale.
107. Denk, A.E., et al., *Slit3 inhibits activator protein 1-mediated migration of malignant melanoma cells*. Int J Mol Med, 2011. **28**(5): p. 721-6.
108. Schubert, T., et al., *Fragments of SLIT3 inhibit cellular migration*. Int J Mol Med, 2012. **30**(5): p. 1133-7.
109. Jackson, A.L., et al., *Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(6): p. 635-7.
110. Persengiev, S.P., X. Zhu, and M.R. Green, *Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs)*. Rna, 2004. **10**(1): p. 12-8.
111. Carvalheira, G., B.H. Nozima, and J.M. Cerutti, *microRNA-106b-mediated down-regulation of C1orf24 expression induces apoptosis and suppresses invasion of thyroid cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(29): p. 28357-70.
112. 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.
113. Liu, J., et al., *Expression of Niban in renal interstitial fibrosis*. Nephrology (Carlton), 2014. **19**(8): p. 479-89.
114. Alberts B, J.A., Lewis J , et al., *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. Fibroblasts and Their Transformations: The Connective-Tissue Cell Family. 2002, New York: Garland Science.
115. The Human Protein Atlas, *TIMELESS in Melanoma*, verfügbar unter: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000111602-TIMELESS/pathology/tissue/melanoma>, aufgerufen am 14.10.2017.
116. Fu, A., et al., *Genetic and epigenetic associations of circadian gene TIMELESS and breast cancer risk*. Mol Carcinog, 2012. **51**(12): p. 923-9.



117. Young, L.M., et al., *TIMELESS Forms a Complex with PARP1 Distinct from Its Complex with TIPIN and Plays a Role in the DNA Damage Response*. Cell Rep, 2015. **13**(3): p. 451-459.
118. Masri, S., M. Cervantes, and P. Sassone-Corsi, *The circadian clock and cell cycle: interconnected biological circuits*. Curr Opin Cell Biol, 2013. **25**(6): p. 730-4.
119. Unsal-Kacmaz, K., et al., *Coupling of human circadian and cell cycles by the timeless protein*. Mol Cell Biol, 2005. **25**(8): p. 3109-16.
120. Hirao, A., et al., *Chk2 is a tumor suppressor that regulates apoptosis in both an ataxia telangiectasia mutated (ATM)-dependent and an ATM-independent manner*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(18): p. 6521-32.
121. Chung, Y.M., et al., *FOXO3 signalling links ATM to the p53 apoptotic pathway following DNA damage*. Nat Commun, 2012. **3**: p. 1000.

# 8. Anhang

## 8.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Signalwege beim Melanom und therapeutische Ansatzpunkte (modifiziert nach Schadendorf et al., 2015) .....	9
Abbildung 2: Melanomentstehung nach Miller and Mihm, 2006.....	11
Abbildung 3: Parallelen zwischen der Entwicklung der Neuralleiste und der Tumorgenese (angelehnt an Maguire et al, 2015) .....	13
Abbildung 4: Brn3a-Expression auf mRNA- und Proteinebene in Keratinozyten, Fibroblasten, Melanozyten und Melanomzellen in unterschiedlichen Progressionsstadien (Hohenauer et al., 2013).....	16
Abbildung 5: Brn3a und seine potentiellen Rollen in der Tumorgenese unter Berücksichtigung bereits bekannter onkogener Mechanismen (Hohenauer et al., 2013).....	17
Abbildung 6: Ablauf eines cDNA-Microarrays im two-channel Verfahren.....	19
Abbildung 7: Quantifizierung apoptotischer Zellen mittels FACS-Analyse .....	41
Abbildung 8: Schematische Abbildung der Zellzyklusanalyse mittels Propidiumiodidfärbung und Durchflusszytometrie .....	42
Abbildung 9: Auswirkungen der Hemmung von Brn3a in Melanomzelllinien sowie der Überexpression in primären Melanozyten.....	46
Abbildung 10: Weitere Selektionskriterien .....	49
Abbildung 11: Exemplarische Darstellung eines Suchergebnisses in der Datenbank GEO.....	51
Abbildung 12: Verifizierung der Microarray-Ergebnisse für FAM129A via qRT-PCR. ....	54
Abbildung 13: FAM129A weist keine spezifische Regulation im Verlauf der Tumorentstehung auf. ..	55
Abbildung 14: Hemmung von FAM129A durch spezifische siRNAs. ....	56
Abbildung 15: Effekte der Hemmung von FAM129A nach 3 und 6 Tagen.....	57
Abbildung 16: Spaltung von Caspase 3 nach Hemmung von FAM129A in 1205Lu Melanomzellen.....	58
Abbildung 17: Überexpression von FAM129A nach Brn3a-Hemmung. ....	59
Abbildung 18: Die Funktion von TIMELESS im damage signaling pathway (nach Yang et al, 2010) .....	61
Abbildung 19: Verifizierung der Microarray-Ergebnisse für TIMELESS via qRT-PCR.....	62
Abbildung 20: TIMELESS weist keine spezifische Regulation in den verschiedenen Melanomzell- und Melanozytenlinien auf.....	63
Abbildung 21: Hemmung von TIMELESS durch spezifische siRNAs. ....	64

Abbildung 22: Effekte der Hemmung von TIMELESS nach 3 und 6 Tagen .....	65
Abbildung 23: Spaltung von Caspase 3 nach Hemmung von TIMELESS in 1205Lu Melanomzellen. ....	66
Abbildung 24: Induktion der Apoptose nach TIMELESS-Hemmung.....	66
Abbildung 25: Hemmung von TIMELESS in Fibroblasten. ....	67
Abbildung 26: Keine Aktivierung von Caspase 3 nach Timless-Hemmung in humanen Fibroblasten ..	68
Abbildung 27: Keine Induktion der Apoptose nach Timless-Hemmung in humanen Fibroblasten .....	68
Abbildung 28: Untersuchung der Induktion von p21 und p53 nach TIMELESS Hemmung.....	69
Abbildung 29: Überexpression von TIMELESS nach Hemmung von Brn3a.....	71
Abbildung 30: Zellzyklusanalyse 48 h nach TIMELESS-Hemmung.....	72
Abbildung 31: Luziferase-Assay zur Überprüfung einer direkten Regulation von TIMELESS durch Brn3a.....	73
Abbildung 32: Korrelation der TIMELESS Expression mit dem Überleben von Patienten mit Melanom nach "The Human Protein Atlas" .....	81
Abbildung 33: Mögliche Funktion von Timeless im Melanom.....	82
Abbildung 34: Die Rolle von TIMELESS im Zellzyklus (nach Masri et al., 2013). ....	84

## 8.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Primäre Antikörper .....	22
Tabelle 2: Sekundäre Antikörper.....	22
Tabelle 3: Geräte .....	22
Tabelle 4: Komplettsysteme .....	23
Tabelle 5: Primer qRT-PCR.....	24
Tabelle 6: Sequenzen der verwendeten siRNAs.....	24
Tabelle 7: Oligonukleotide zur Herstellung von Genreporterplasmiden .....	25
Tabelle 8: verwendete Plasmide .....	25
Tabelle 9: Verbrauchsmaterialien .....	28
Tabelle 10: Zielgene von Brn3a nach Anlage der Schwellenwerte. ....	50
Tabelle 11: Mittels qRT-PCR verifizierte Gene.. ....	52

## 9. Abkürzungen

ATM	Ataxia telangiectasia mutated
ATR	Ataxia telangiectasia and Rad3-related
BCA	Bicinchoninsäure
BRAF	B-Raf Protoonkogen
Brn3a	Brain specific homeobox/POU domain 3a
BSA	Bovines Serumalbumin, Rinderserumalbumin
cDNA	complementary DNA
CDK-Inhibitor 1	Cyclin-dependent-kinase-Inhibitor 1
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
Chk1	Checkpointkinase 1
Chk2	Checkpointkinase 2
DEPC	Diethylidicarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMT	Epitheliale mesenchymale Transition
EGF	Epidermal Growth Factor
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting, Durchflusszytometrie
FAM129A	Family with sequence similarity 129 member A
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G1-Phase	Gap-Phase 1
G2-Phase	Gap-Phase 2
HBSS	Hank's balanced salt solution
LB	Luria broth
LNA	Locked nucleic acids
luc	Luziferase
M	Mitose
MAPK	Mitogen-activated protein kinase

MEK	Mitogen-activated protein kinase kinase
mRNA	messenger RNA
NHEM	Normal human epidermal melanocytes
NCC	Neural crest cells
NRAS	NRAS-Protoonkogen
OIS	Onkogen-induzierten Seneszenz
ORF	Open Reading Frame (Offener Leserahmen)
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
PI	Propidiumiodid
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
S-Phase	Synthese-Phase
siRNA	small interfering RNA
TIMELESS	TIMELESS circadian regulator
WNT5A	Wnt family member 5A

## 10. Danksagung

Mir hat es große Freude bereitet, die vorliegende Arbeit anzufertigen und mit ihr meine ersten Einblicke in die Wissenschaft zu erlangen. Ohne die Unterstützung zahlreicher Personen wäre ihre Durchführung jedoch sicherlich nicht möglich gewesen, ihnen gebührt mein großer Dank.

Zuerst möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. Robert Besch für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten, darüber hinaus aber auch für das kollegiale und freundschaftliche Verhältnis bedanken.

Diese Arbeit wurde durch das Graduiertenkolleg 1202 der DFG gefördert. Insbesondere der Austausch mit anderen Doktoranden und Arbeitsgruppen und die interessanten Vorträge im Rahmen der Fortbildungen haben zu einem grundlegenden wissenschaftlichen Verständnis beigetragen. Für die ideelle und finanzielle Förderung möchte ich meinen Dank aussprechen.

Während der Zeit des experimentellen Arbeitens war unsere gute Seele des Labors, Claudia Kammerbauer, mir immer eine große Unterstützung und Hilfe. Großer Dank gebührt ihr für Einführung in die Geheimnisse der verschiedenen Methoden und ihr stets offenes Ohr für Fragen und Probleme.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Mitdoktorandinnen Saskia Graf und Eva Hornig für ihre fachliche Unterstützung und die vielen netten Gespräche, die maßgeblich zu einer guten Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.

Ohne meine Familie und Freunde wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, Gabriele und Herbert. Sie haben mir nicht nur das Medizinstudium ermöglicht, sondern sind mir dabei auch immer mit ganzem Herzen sowie Rat und Tat zur Seite gestanden. Großer Dank geht auch an Klaus für das Korrekturlesen und das Betrachten dieser Arbeit aus einer etwas anderen (physikalischen) Perspektive.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinem Mann Philipp bedanken für seine stets liebevolle Unterstützung und für seinen unerschütterlichen Optimismus, der mir während der Zeit meiner Dissertation nicht nur einmal das Vertrauen zurückgeben hat. Herzlichen Dank!

## 11. Lebenslauf

## 12. Eidesstattliche Versicherung

**Guder, Stephanie Elisabeth**

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

**„Identifizierung von Zielgenen des neuronalen Transkriptionsfaktors Brn3a im Melanom mittels Microarray-Analysen“**

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.

Hamburg, den 18. Juni 2018

Stephanie Elisabeth Guder