

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie

Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Lars Einar French

**Funktionelle Analyse
des Transkriptionsfaktors SOX10
im Uveamelanom**

Dissertation

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

vorgelegt von

Anja Katharina Wessely

aus

Rosenheim

2024

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Carola Berking

Mitberichterstatter: PD Dr. Ulrich C. Schaller
Prof. Dr. Heiko Hermeking
Prof. Dr. Irmela Jeremias

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. Dr. Markus Vincent Heppt

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 04.06.2024

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Zusammenfassung.....	6
Summary (English):	9
Abbildungsverzeichnis	11
Tabellenverzeichnis	13
Abkürzungsverzeichnis	15
1. Einleitung.....	22
1.1 Das Uveamelanom.....	22
1.1.1 Lokalisation und Inzidenz	22
1.1.2 Risikofaktoren	23
1.1.3 Genetische Besonderheiten und Abgrenzung zu anderen Melanomsubtypen	26
1.1.4 Diagnostik	37
1.1.5 Therapieoptionen	39
1.1.6 Prognose.....	45
1.2 Melanozyten: Ursprung des Uveamelanoms	46
1.2.1 Allgemeines und Melanogenese.....	46
1.2.2 Embryonale Entwicklung der Melanozyten in der Haut und im Auge	48
1.3 Der Neuralleisten-Transkriptionsfaktor SOX10	52
1.3.1 Physiologische und pathophysiologische Rolle	52
1.3.2 Expression im Melanom und anderen Tumorarten	55
1.3.3 SOX10 im Kontext des Uveamelanoms.....	58
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	60
2. Material und Methoden	62
2.1 Material	62
2.1.1 Verwendete primäre Zellen und Zelllinien.....	62
2.1.2 Reagenzien	63
2.1.3 Verbrauchsmaterial	67
2.1.4 Zellkulturmedien	68
2.1.5 Puffer und Lösungen	70
2.1.6 Kommerzielle Kits.....	76
2.1.7 Oligonukleotide.....	77
2.1.8 Expressionsplasmide.....	79
2.1.9 Antikörper.....	79
2.1.10 Geräte	82
2.1.11 Software.....	84
2.2 Methoden	86
2.2.1 Zellkultur.....	86

2.2.2	Transfektionen.....	87
2.2.3	Transformation, Kultivierung, Lagerung und Plasmidisolierung aus <i>Escherichia coli</i>	90
2.2.4	Genexpressionsanalysen	91
2.2.5	Proteinbiochemie.....	96
2.2.6	Funktionelle Analysen	102
2.2.7	Erstellung eines SOX10-basierten UM-Protein-Interaktionsnetzwerks zur Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen im Uveamelanom....	104
2.2.8	Statistische Auswertung	107
3.	Ergebnisse.....	108
3.1	Analyse der basalen SOX10-Expression im Uveamelanom	108
3.2	Funktionelle Charakterisierung durch Hemmung der SOX10-Expression mittels RNA-Interferenz	110
3.2.1	Verringerung der Zellviabilität nach SOX10-Inhibition.....	111
3.2.2	Induktion eines Zellzyklus-Arrests in der G1-Phase.....	113
3.2.3	Induktion der intrinsischen Apoptose	117
3.2.4	Analyse von DNA-Schadensmarkern	122
3.2.5	Analyse verschiedener Signaltransduktionswege nach SOX10-Hemmung 123	
3.3	SOX10-Zielgene als potenzielle Mediatoren der Effekte.....	132
3.3.1	Veränderung der Genexpression von SOX9 und bekannten SOX10- Zielgenen nach SOX10-Hemmung	132
3.3.2	Das SOX10-Zielgen MITF als potenzieller Mediator der Effekte	133
3.4	SOX10-basiertes <i>drug repurposing</i>	144
3.4.1	SOX10-basierte Identifizierung potenzieller Kandidatenstrukturen für eine zielgerichtete Therapie mittels UM-Interaktionsnetzwerk.....	144
3.4.2	Der pan-E2F-Inhibitor HLM006474 als mögliche zielgerichtete Therapie im Uveamelanom	155
4.	Diskussion	159
4.1	Die funktionelle Rolle von SOX10 im Uveamelanom	161
4.1.1	Basale Expression von SOX10 im Uveamelanom	161
4.1.2	Auswirkungen der SOX10-Hemmung auf Zellviabilität, Zellzyklusprogression und Apoptose	162
4.1.3	Analyse verschiedener Signaltransduktionswege nach SOX10-Hemmung 166	
4.1.4	Analyse der globalen Genexpressionsveränderungen mittels RNA- Sequenzierung	169
4.2	SOX10-Zielgene als potenzielle Mediatoren der Effekte.....	171
4.2.1	Genexpression bekannter SOX10-Zielgene	171
4.2.2	MITF als Mediator der Effekte	172
4.3	Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen im Uveamelanom....	176
4.3.1	SOX10 als direkter Angriffspunkt einer zielgerichteten Therapie?	176
4.3.2	SOX10-basiertes <i>drug repurposing</i> zur Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen im Uveamelanom	179
4.4	Schlussfolgerung und Ausblick.....	189

Literaturverzeichnis	191
Danksagung.....	224
Affidavit.....	226
Lebenslauf	227
Publikationsliste.....	228

Zusammenfassung

Das Uvea- oder Aderhautmelanom (UM) ist der häufigste intraokuläre Tumor bei Erwachsenen und entwickelt sich aus den uvealen Melanozyten der Choroidea, des Ziliarkörpers oder der Iris. Es unterscheidet sich sowohl tumorbiologisch als auch klinisch deutlich von anderen Melanomsotypen wie dem kutanen, akrolentiginösen oder mukosalen Melanom. Obwohl eine gute lokale Tumorkontrolle durch eine Bestrahlung oder eine Enukleation erzielt werden kann, stellt insbesondere die Lebermetastasierung, die bei etwa 90 % der fernmetastasierten Patienten auftritt, eine therapeutische Herausforderung dar. Die seit einigen Jahren erfolgreich beim kutanen Melanom eingesetzten zielgerichteten Therapien mit BRAF- und MEK-Inhibitoren und die Immuncheckpoint-Blockade mit Antikörpern wie Ipilimumab und Nivolumab sind im UM nicht oder nur selten wirksam. Seit kurzem gibt es mit dem bispezifischen Molekül Tebentafusp nur eine einzige zugelassene Systemtherapie, die aber nur für einen Teil der Patienten mit UM erfolgreich ist. Daher besteht insbesondere für Patienten im metastasierten Stadium ein hoher Bedarf für die Entwicklung neuer Therapieoptionen.

Einige Transkriptionsfaktoren, die während der Embryogenese eine wichtige Rolle bei der Melanozytenentwicklung übernehmen, werden teilweise auch im kutanen Melanom exprimiert und tragen signifikant zu dessen Entstehung und Progression bei. Der Transkriptionsfaktor SOX10 wird sowohl in normalen Melanozyten als auch melanozytären Tumoren exprimiert und ist essenziell für das Überleben von kutanen Melanomzellen. Im Kontext des UM wurde SOX10 jedoch bislang nur wenig untersucht.

Ziel dieser Arbeit war daher die Durchführung einer funktionellen Charakterisierung von SOX10 im UM, um einerseits zu einem besseren Verständnis der Biologie dieses seltenen Tumors beizutragen und andererseits diese Erkenntnisse für die Ableitung möglicher neuer systemischer Therapiekonzepte zu nutzen. Zu diesem Zweck wurde zunächst die Expression von SOX10 im UM durch Analyse des *The Cancer Genome Atlas* (TCGA)-Datensatzes „Ocular Melanomas“ mit 80 Primärtumoren, immunhistochemische Färbungen an 42 Metastasen sowie durch Gen- und Proteinexpressionsanalysen in neun UM-Zelllinien bestimmt. Hierbei konnte bei fast allen analysierten Proben eine Expression nachgewiesen werden. Um die funktionelle Relevanz von SOX10 im UM zu charakterisieren, wurde die SOX10-Expression in den drei SOX10-hochexprimierenden UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 durch Transfektion mit spezifischen siRNAs gehemmt. Dies führte zu morphologischen Veränderungen der Zellen und einer starken Verringerung der Zellviabilität. Analysen mittels Durchflusszytometrie bzw. Western Blot zeigten, dass es nach SOX10-Hemmung außerdem zu einer Hypophosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb), einer teilweisen Hochregulierung der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p21 und p27 sowie zu einer Zunahme des Anteils an Zellen in der G1-Phase kam, was auf einen Zellzyklusarrest hindeutet. Darüber hinaus führte die SOX10-Hemmung zu einem Anstieg des Anteils an apoptotischen Zellen und einer vermehrten Spaltung der Procaspasen 3 und 9 sowie des Caspase 3-Substrates PARP. Die Analyse von pro- und antiapoptischen Proteinen der Bcl-2-Familie, BH3-only-Proteinen sowie von Bax und Bak ergab jedoch keine weiteren Hinweise auf den genauen

Mechanismus der Induktion der Apoptosekaskade. Der DNA-Schadensmarker γ -H2A.X wurde vermehrt erst 24h nach der Transfektion exprimiert und das Tumorsuppressorprotein p53 zeigte keine Veränderungen im Vergleich zu den Kontrollen. Daher ist davon auszugehen, dass der Zelltod nach SOX10-Hemmung unabhängig von DNA-Doppelstrang-Brüchen und p53 induziert wird. Bei der Analyse der ERK-, p38- und Akt-Signalwegaktivität war insbesondere eine Aktivierung des p38-MAPK-Signalwegs nach SOX10-Hemmung auffällig.

Da SOX10 als Transkriptionsfaktor direkt die Transkription anderer Gene beeinflusst, wurde anschließend untersucht, wie sich die Hemmung von SOX10 auf die Expression bekannter Zielgene wie PMP2, MIA und MITF sowie auf das Transkriptom der UM-Zellen auswirkt. Hierbei zeigte sich, dass es durch die Hemmung von SOX10 zu ausgedehnten Veränderungen des Transkriptoms kam. Der Transkriptionsfaktor MITF wurde in den SOX10-hochexprimierenden Zellen ebenfalls stark exprimiert und nach SOX10-Hemmung deutlich herabreguliert. Die Hemmung von MITF durch spezifische siRNAs führte ähnlich wie die Hemmung von SOX10 zu einer Abnahme der Zellviabilität in zwei von drei untersuchten Zelllinien. In diesen kam es ebenfalls zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase des Zellzyklus, einer Rb-Hypophosphorylierung, Verringerung der Cyclin D1- und p27-Expression, Induktion der p21-Expression sowie zur Apoptose über den intrinsischen Apoptoseweg. Wie schon nach SOX10-Hemmung änderte sich die p53-Proteinexpression nach MITF-Hemmung nicht, sodass auch hier ein p53-unabhängiger Zellzyklusarrest induziert wird. Die ektope Expression von MITF konnte die zytotoxischen Effekte der SOX10-Hemmung in den analysierten Mel270-Zellen abschwächen, weshalb von einer zentralen Rolle von MITF bei der Vermittlung der überlebensfördernden Effekte von SOX10 im UM auszugehen ist.

Da derzeit wirksame Therapien insbesondere für UM-Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung nur begrenzt verfügbar sind, wurden im letzten Teil der Arbeit die zuvor gewonnenen Erkenntnisse über die essenzielle Funktion von SOX10 im UM genutzt, um neue Zielstrukturen für eine zielgerichtete Therapie des UM zu finden. Konkret sollten hierbei neue potenzielle Kandidaten identifiziert werden, deren Funktion im Rahmen einer zielgerichteten Therapie anstelle des pharmakologisch nicht beeinflussbaren SOX10 moduliert werden könnten. Basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit generierten RNA-Sequenzierungsdaten nach SOX10-Hemmung und einem bereits existierenden SOX10-Protein-Interaktionsnetzwerk wurde in einem bioinformatischen Ansatz ein neues Netzwerk für die Selektion neuer therapeutisch angreifbarer Zielstrukturen („target selection network“) generiert. Anschließend wurden mithilfe dieses Netzwerks Kandidaten identifiziert, deren Genexpression nach SOX10-Hemmung einerseits herabreguliert war und die andererseits pharmakologisch über *small molecule*-Inhibitoren oder blockierende bzw. neutralisierende Antikörper gehemmt werden können und daher für eine potenzielle Systemtherapie im UM als prinzipiell geeignet erschienen. Für eine erste *in vitro*-Testung dieses Ansatzes wurden die vier Kandidatengene E2F1, EZH2, TFRC und FGF9 ausgewählt, wobei sich der Transkriptionsfaktor E2F1 als besonders vielversprechend erwies. Die Hemmung mit dem pan-E2F-*small molecule*-Inhibitor HLM006474

führte zu einer deutlichen Abnahme der Zellviabilität, einem Zellzyklusarrest in der S-Phase, einer Herabregulierung der regulatorischen Zellzyklusproteine Cyclin E1, CDK2 und Cyclin A2, einer Rb-Hypophosphorylierung sowie einer reduzierten E2F1-Expression, zur Aktivierung des p38-MAPK-Signalweges und letztlich zum Zelltod durch Apoptose. Diese ersten *In vitro*-Daten zeigen, dass E2F1 möglicherweise ein Kandidat für eine zielgerichtete Therapie des UM sein könnte. Darüber hinaus wird das Potenzial bioinformatischer Ansätze als wichtige Werkzeuge für die Identifizierung neuer therapeutischer Ziele in der Krebstherapie deutlich.

Insgesamt liefert diese Arbeit neue Erkenntnisse über die Biologie des UM und insbesondere die Rolle der Neuralleisten-Transkriptionsfaktoren in dieser Tumorentität und zeigt auch neue Möglichkeiten für die translationale Nutzung dieses Wissens über Transkriptionsfaktoren bei der Entwicklung neuer Therapieoptionen für UM-Patienten.

Summary (English):

Uveal melanoma (UM) is the most common intraocular malignancy in adults and arises from melanocytes in the choroid, ciliary body, or iris. It significantly differs both tumor biologically and clinically from other melanoma subtypes such as cutaneous (CM), acrolentiginous, or mucosal melanoma. Although good local tumor control can be achieved by irradiation or enucleation, the treatment of advanced disease stages is less effective and especially the treatment of liver metastases which occur in about 90 % of patients with advanced disease is challenging. Targeted therapies with BRAF and MEK inhibitors and immune checkpoint blocking antibodies such as ipilimumab and nivolumab have been successfully used for the treatment of metastatic CM, however, they are hardly effective in metastatic UM. To date, the bispecific molecule tebentafusp is the only systemic therapy approach which has led to a survival benefit for a subgroup of metastatic UM patients. Thus, there is a high unmet medical need for the development of new therapeutic options, especially for patients in the metastatic stage. A variety of transcription factors that play an important role in the development of melanocytes during embryogenesis are also expressed in CM and contribute significantly to its development and progression. The transcription factor SOX10 is expressed in normal melanocytes as well as melanocytic tumors and is essential for the survival of CM cells. However, the role of SOX10 in UM has not been elucidated yet.

The aim of this doctoral thesis was to provide a functional characterization of SOX10 in UM in order to achieve a better understanding of the biology of this rare tumor and potentially use these findings for the development of new therapies. First, basal expression of SOX10 in UM was determined by analyzing the publicly available *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) dataset "Ocular Melanomas" including 80 primary tumors, by immunohistochemical stainings of 42 UM metastases, and by gene and protein expression analyses of nine UM cell lines, demonstrating that SOX10 was expressed in almost all analyzed samples. To characterize the functional relevance of SOX10 in UM, its expression was inhibited in the three SOX10-highly expressing UM cell lines 92.1, Mel270, and OMM1.5 by transfecting them with SOX10-specific siRNAs. This resulted in morphological changes of the cells and a strong decrease of cell viability. Flow cytometry and Western blot analyses showed that SOX10 inhibition also led to hypophosphorylation of the retinoblastoma protein (Rb), upregulation of cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p27, and an increase of cells in the G1 phase, suggesting an arrest in this cell cycle phase. In addition, SOX10 inhibition resulted in an increase in the proportion of apoptotic cells and increased cleavage of procaspases 3 and 9 and the caspase 3 substrate PARP. However, despite analyzing the expression of pro- and anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family, BH3-only proteins, and Bax and Bak, the exact mechanisms of action could not be deciphered. The expression of DNA damage marker γ -H2A.X increased only 24h after transfection, and the expression of tumor suppressor protein p53 did not change compared to the controls, suggesting that SOX10 inhibition leads to cell death independently of DNA double-strand breaks and p53 accumulation. Furthermore, analysis of

ERK, p38, and Akt signaling pathway activity showed an activation of p38 MAPK signaling after SOX10 inhibition.

Since SOX10 is a transcription factor and may directly affect the transcription of other genes, the effects of SOX10 inhibition on the expression of known target genes such as PMP2, MIA, and MITF as well as the global transcriptome of UM cells was studied, demonstrating extensive changes in the transcriptome after inhibiting SOX10. The transcription factor MITF was also strongly expressed in the SOX10-highly expressing cells and was significantly downregulated after SOX10 inhibition. Inhibition of MITF by specific siRNAs decreased the cell viability in two of three analyzed UM cell lines, induced a cell cycle arrest in the G1 phase of the cell cycle, led to Rb hypophosphorylation, a decrease of cyclin D1 and p27 expression, induction of p21 expression, and promoted apoptosis via the intrinsic apoptosis pathway. Similar to SOX10 inhibition, p53 protein expression levels did not change upon MITF inhibition, indicating that the cell cycle arrest had also occurred independently of p53. Ectopic expression of MITF attenuated the cytotoxic effects of SOX10 inhibition in Mel270 cells, suggesting that MITF plays a major role in mediating the pro-survival effects of SOX10 in the UM.

Effective therapy options especially for UM patients with advanced disease are limited and new therapy options are urgently needed. Thus, the knowledge about the crucial role of SOX10 in UM was used in the final part of this thesis to explore new putative therapy approaches in UM. As no direct SOX10 inhibitor exists yet, potential target genes which could be modulated instead of SOX10 should be identified. Based on RNA sequencing data after siRNA-mediated SOX10 inhibition and an already published SOX10-protein interaction network, a new protein interaction network for the selection of putative candidates for targeted therapies ("target selection network") was created *in silico*. Then, this network was used to select genes that were down-regulated after SOX10 inhibition and whose function can be inhibited by small molecule inhibitors and blocking or neutralizing antibodies, respectively, suggesting that they may be suitable candidates for systemic therapy in UM. Following this bioinformatical approach, the four candidate genes E2F1, EZH2, TFRC, and FGF9 were selected and tested in *in vitro* experiments, showing that the transcription factor E2F1 might be a promising target. Incubating UM cells with the small molecule pan-E2F inhibitor HLM006474 resulted in a strong decrease of cell viability, a cell cycle arrest in S phase, downregulation of the regulatory cell cycle proteins cyclin E1, CDK2, and cyclin A2, Rb hypophosphorylation, to a reduced E2F1 expression, activation of the p38 MAPK pathway, and ultimately cell death via apoptosis. These first *in vitro* data show that E2F1 may be an interesting new candidate for targeted therapy in UM and further demonstrate the potential of bioinformatics approaches as important tools for the identification of novel therapeutic targets for cancer therapy.

Overall, this work provides new insights into the biology of UM and in particular the role of neural crest transcription factors in this tumor entity and demonstrates the importance of new bioinformatical approaches for translational research and the development of new therapy options.

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Typische Treibermutationen und Signalwegveränderungen im UM, KM und anderen Melanomsubtypen.....	28
Abb. 2: Embryonale Entwicklung der kutanen Melanozyten des Körperstamms und beteiligte Transkriptions- und Wachstumsfaktoren	49
Abb. 3: Embryonale Entwicklung der uvealen Melanozyten aus kranialen NC-Zellen..	51
Abb. 4: Membranbelegung Phospho-Kinase-Array.....	99
Abb. 5: Basale SOX10-Expression in UM-Zelllinien.....	108
Abb. 6: Genexpression von neuronalen Transkriptionsfaktoren in UM-Primärtumoren..	109
Abb. 7: Immunhistochemischer Nachweis der SOX10-Expression in UM-Metastasen	110
Abb. 8: Zellviabilität nach SOX10-Hemmung.....	111
Abb. 9: Morphologische Veränderungen von humanen Melanozyten (HM) und der KM-Zelllinie 1205Lu nach SOX10-Hemmung	112
Abb. 10: Morphologische Veränderungen von UM-Zelllinien nach SOX10-Hemmung	113
Abb. 11: Analyse der Zellzyklusprogression nach SOX10-Hemmung.....	114
Abb. 12: Analyse der Retinoblastom-Protein-Phosphorylierung nach SOX10-Hemmung	115
Abb. 13: Proteinexpression von p53, p21 und p27 nach SOX10-Hemmung.....	116
Abb. 14: SOX10-Hemmung induziert Apoptose in UM-Zellen.....	118
Abb. 15: Analyse der Proteinexpression pro- und antiapoptotischer Proteine des intrinsischen Apoptoseweges	120
Abb. 16: Inhibition der Apoptose nach SOX10-Hemmung durch den Caspase-3-Inhibitor Z-DEVD-FMK	121
Abb. 17: Expression von DNA-Schadensmarkern und Zellzyklusinhibitoren nach SOX10-Hemmung.....	123
Abb. 18: Expression der MAP-Kinasen ERK1, ERK2 und p38	124
Abb. 19: Aktivität des Akt-Signalweges basal und nach Hemmung von SOX10	126
Abb. 20: Aktivitätsanalyse weiterer Signalwege nach SOX10-Hemmung mittels Phospho-Kinase-Array	127
Abb. 21: Principal component-Analyse (PCA)	129
Abb. 22: GO-Term-Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten nach SOX10-Hemmung	130
Abb. 23: Analyse der Genexpression von <i>SOX10</i> sowie der durch <i>SOX10</i> transkriptionell regulierten Gene <i>PMP2</i> , <i>MIA</i> und <i>SOX9</i> nach <i>SOX10</i> -Hemmung	132
Abb. 24: Basale Proteinexpression von MITF.....	134
Abb. 25: Veränderung der MITF-Expression nach SOX10-Hemmung.....	136
Abb. 26: Verringerung der Zellviabilität nach MITF-Hemmung.....	137
Abb. 27: Zellzyklusarrest in der G1-Phase des Zellzyklus nach Hemmung von MITF	138
Abb. 28: Expressionsanalyse von zellzyklusregulierenden Proteinen bestätigt Zellzyklusarrest in der G1-Phase nach MITF-Hemmung	139
Abb. 29: Zelltodanalysen mittels Durchflusszytometrie nach MITF-Hemmung.....	140
Abb. 30: MITF-Hemmung führt zur Spaltung der Procaspasen 9 und 3 und des Zielproteins PARP	140
Abb. 31: Analyse der Expression pro- und antiapoptotischer Proteine sowie des DNA-Schadensmarkers γ -H2A.X nach MITF-Hemmung.....	141

Abb. 32: Analyse der Zellviabilität nach ektopter Expression von MITF und zeitgleicher SOX10-Hemmung.....	142
Abb. 33: Analyse der Caspase-Aktivität nach ektopter Expression von MITF und zeitgleicher SOX10-Hemmung.....	143
Abb. 34: Kern-Interaktionsnetzwerk im Uveamelanom	145
Abb. 35: Netzwerk zur Identifizierung potenzieller therapeutischer Zielstrukturen im UM („ <i>target selection network</i> “).....	145
Abb. 36: Basale Gen- und Proteinexpression der potentiellen Kandidatengene in UM-Zelllinien und der KM-Zelllinie 1205Lu.....	150
Abb. 37: Genexpression der vier Kandidatengene <i>E2F1</i> , <i>TFRC</i> , <i>EZH2</i> und <i>FGF9</i> nach SOX10-Hemmung.....	152
Abb. 38: Proteinexpression von E2F1, CD71, EZH2 und FGF9 nach SOX10-Hemmung	152
Abb. 39: Verringerung der Zellviabilität nach Inkubation mit HLM006474 bzw. Tazemetostat und Expression von E2F-Transkriptionsfaktoren.....	154
Abb. 40: Analyse der Zellviabilität nach Inkubation mit neutralisierenden Antikörpern gegen FGF9 bzw. CD71.....	154
Abb. 41: Zellzyklusarrest in der S-Phase des Zellzyklus nach Inkubation mit HLM006474	155
Abb. 42: Expressionsanalyse von zellzyklusregulierenden Proteinen nach Inkubation mit HLM006474.....	156
Abb. 43: Zelltodanalysen mittels Durchflusszytometrie nach Inkubation mit HLM006474	157
Abb. 44: Inkubation mit HLM006474 führt zu Apoptose, p38-Aktivierung und γ -H2A.X-Induktion	158
Abb. 45: Arbeitsmodell der basalen E2F1-Funktion im UM sowie nach Inkubation mit dem pan-E2Fi HLM006474	183

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Chromosomale Veränderungen im Uveamelanom in nicht-metastasierenden und metastasierenden Primärtumoren sowie Metastasen [115]	35
Tabelle 2: Verwendete primäre humane Zellen	62
Tabelle 3: Verwendete uveale und kutane Melanomzelllinien.....	62
Tabelle 4: Verwendete Reagenzien.....	63
Tabelle 5: Verwendetes Verbrauchsmaterial	67
Tabelle 6: HM-Medium, 500 ml.....	68
Tabelle 7: Uvea-Medium, 500 ml.....	69
Tabelle 8: TU2%-Medium, 500 ml	69
Tabelle 9: Einfriermedium, 10 ml	70
Tabelle 10: CaCl ₂ -Lösung, 2 M, 10 ml, für TU2%-Medium und Inkubationspuffer (Apoptose-FACS).....	70
Tabelle 11: 1x Trypsin/EDTA-Lösung, 0,05 %, 50 ml	70
Tabelle 12: Luria Broth (LB), 1 l.....	71
Tabelle 13: LB-Agar, 1 l.....	71
Tabelle 14: dNTP-Mix für qPCR, 10 mM, 200 µl.....	71
Tabelle 15: 11 mM EDTA/PBS, 50 ml.....	72
Tabelle 16: 5x CSH-Stock, 20 ml.....	72
Tabelle 17: 1x CSH-Lysepuffer, 5 ml.....	72
Tabelle 18: 1x Laufpuffer, 1000 ml	73
Tabelle 19: 1x Transferpuffer, 500 ml.....	73
Tabelle 20: 1x Waschpuffer, 500 ml	73
Tabelle 21: 1x Blocking-Lösung, 550 ml	73
Tabelle 22: Inkubationspuffer, 50 ml, für Apoptose-FACS	74
Tabelle 23: Annexin-V-Färbelösung für Apoptose-FACS, Ansatz für 1 Probe.....	74
Tabelle 24: Propidiumjodid-Vorverdünnung für Apoptose-FACS, 100 µl	74
Tabelle 25: Propidiumjodid-Färbelösung für Apoptose-FACS, Ansatz für 1 Probe	74
Tabelle 26: FACS-Waschpuffer, 50 ml, für Zellzyklus-FACS	75
Tabelle 27: Propidiumjodid-Stocklösung, 5 mg/ml, für Zellzyklus-FACS	75
Tabelle 28: RNase A-Lösung, 10 mg/ml, für Zellzyklus-FACS.....	75
Tabelle 29: Propidiumjodid-Färbelösung für Zellzyklus-FACS, Ansatz für 1 Probe	75
Tabelle 30: Verwendete Kits.....	76
Tabelle 31: Verwendete Primer für sondenbasierte qPCR.....	77
Tabelle 32: Verwendete Primer für qPCR mit interkalierendem Farbstoff dsGreen	78
Tabelle 33: Verwendete siRNAs	78
Tabelle 34: Verwendete Expressionsplasmide	79
Tabelle 35: Verwendete Primärantikörper für Proteinexpressionsanalysen	79
Tabelle 36: Verwendete HRP-gekoppelte Sekundärantikörper für Proteinexpressionsanalysen	81
Tabelle 37: Neutralisierende und blockierende Antikörper gegen FGF9 und Transferrin-Rezeptor (CD71).....	81
Tabelle 38: Primärer Antikörper für immunhistochemischen SOX10-Nachweis	82
Tabelle 39: Verwendete Geräte.....	82
Tabelle 40: Verwendete Programme	84

Tabelle 41: siRNA-Vorverdünnung, Ansatz für 1 Well einer 6-Well-Platte	88
Tabelle 42: RNAiMAX- Vorverdünnung, Ansatz für 1 Well einer 6-Well-Platte.....	88
Tabelle 43: Ansatz für Plasmid-DNA-Transfektion, Ansatz für 1 Well einer 6-Well-Platte	89
Tabelle 44: Lipofectamine™ 3000-Ansatz, Ansatz für 1 Well einer 6-Well-Platte	89
Tabelle 45: Reverse Transkriptase-Mix	92
Tabelle 46: qPCR-Mastermix für sondenbasierte qPCR, Ansatz für 1 Probe.....	93
Tabelle 47: Programm zur Durchführung der sondenbasierten qPCR	93
Tabelle 48: qPCR-Mastermix für qPCR mit interkalierendem Farbstoff dsGreen, Ansatz für 1 Probe	94
Tabelle 49: qPCR-Programm zur Durchführung der qPCR mit interkalierendem Farbstoff dsGreen	94
Tabelle 50: Probenvorbereitung für SDS-PAGE, Ansatz für 1 Probe.....	97
Tabelle 51: Membranbelegung Phospho-Kinase-Array	99
Tabelle 52: Wichtige intrazelluläre Signalwege im Uveamelanom und REACTOME-Identifikationsnummern	104

Abkürzungsverzeichnis

¹⁰⁶ Ru	Ruthenium-106	BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
¹²⁵ I	Jod-125	BRAFi	BRAF-Inhibitor
5-FU	5-Fluorouracil	BRCA1	BRCA1 DNA Repair Associated (Breast cancer 1)
A.	Arteria	BSA	Bovines Serumalbumin
ABCC5	ATP Binding Cassette Subfamily C Member 5	cAMP	Zyklisches AMP
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon	CCND1	Cyclin D1
AJCC	American Joint Committee on Cancer	CDH1	Cadherin 1 (E-Catherin)
Akt	AKT serine/threonine kinase	CDK	Cyclin-abhängige Kinase (<i>cyclin-dependent kinase</i>)
ALM	akrolentiginöses Melanom	CDKN2A	Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A (= INK4A)
AN	Annexin V	cDNA	complementary DNA
ANOVA	Analysis of variance	CEACAM 1	CEA cell adhesion molecule 1
APCE	Adenokarzinom des pigmentierten Ziliarkörper-epithels	ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
ASO	Antisense-Oligonukleotid	ChIP-Seq	Chromatin-Immunpräzipitation mit DNA-Sequenzierung
ATM	ATM serine/threonine kinase	Chr.	Chromosom
ATP	Adenosintriphosphat	CI	Konfidenzintervall (<i>confidence interval</i>)
ATR	ATR serine/threonine kinase	CLPTM1L	CLPTM1 like
BAP1	BRCA-assoziertes Protein 1	CRE	C-responsive element
BARD1	BRCA1 Associated RING Domain 1	CREB	CRE-bindendes Protein
BCA	Bicinchoninsäure	CRNDE	Colorectal Neoplasia Differentially Expressed
BMP	Bone morphogenetic protein	CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4
bp	Basenpaar	CTNNB1	Catenin Beta 1

CYSLTR2	Cysteinylleukotrienrezeptor 2 (CysLT2R)	EIF1AX	eukaryotic translation initiation factor 1A
DAG	Diacylglycerol	EMP1	Epithelial Membrane Protein 1
DC	Dendritische Zelle	EMP3	Epithelial Membrane Protein 3
DCR	Krankheitskontrollrate (<i>disease control rate</i>)	EMT	Epitheliale-mesenchymale Transition
DCT	Dopachrom-Tautomerase	ENPP2	Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 2
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser (Aqua bidest)	ER	Endoplasmatisches Retikulum
DEPC	Diethylcarbonat	ERBB3	Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase	ERK1	Mitogen-activated Protein Kinase 3
DMSO	Dimethylsulfoxid	ERK2	Mitogen-activated Protein Kinase 1
DMT1	Divalent Metal Ion Transporter 1	EZH2	Enhancer of zeste homolog 2
DNA	Desoxyribonukleinsäure	EZM	Extrazelluläre Matrix
DNA-PK	DNA-abhängige Protein-kinase	FACS	Durchflusszytometrie (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotid-triphosphat	FAM	Fluorescein
dsDNA	doppelsträngige DNA	FBS	Fötales bovines Serum
dsRNA	doppelsträngige RNA	FDA	U.S. Food and Drug Administration
DTT	Dithiothreitol	FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor (<i>fibroblast growth factor</i>)
E. coli	<i>Escherichia coli</i>	FOXD3	Forkhead box D3
E2F1	E2F Transcription Factor 1	fw	forward
E2Fi	E2F-Inhibitor	FWER	family-wise error rate
EDNRB	Endothelin Receptor Type B		
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure		
EGF	Epithelialer Wachstumsfaktor (<i>epithelial growth factor</i>)		
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor		

FZD6	Frizzled Class Receptor 6	HIF1 α	Hypoxia Inducible Factor 1 Subunit Alpha
γ -H2A.X	an SER139 phosphorylierte Histonvariante H2A.X	HM	humane Melanozyten
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)	HMG	high mobility group
GAPDHS	spermispezifische Isoform der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase	HR	Hazard Ratio
GNA11	Guanine Nucleotide-binding Protein Subunit Alpha-11	HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
GNAQ	Guanine Nucleotide-binding Protein Subunit Alpha Q	HVEM	Herpes virus entry mediator
GO Term	Gene Ontology Term	i.v.	intravenös
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor	ICB	Immuncheckpoint-Blockade
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid	IFN- γ	Interferon-gamma
HAI	hepatische (intra-)arterielle Infusionstherapie	IHC	Immunhistochemie
HBP1	HMG-box protein 1	IHP	isolierte hepatische Perfusion
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution	IL	Interleukin
HCC	Hepatozelluläres Karzinom	INK4A	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A (= CDKN2A)
HDAC	Histondeacetylase	IP3	Inositol-1,4,5-triphosphat
HDACi	HDAC-Inhibitor	IQR	Interquartilsabstand (<i>interquartile range</i>)
HEAT	Huntington, Elongation Factor 3, PR65/A, TOR (Domäne im Protein SF3B1)	IRF	Interferon regulatory factor
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure	JAK	Januskinase
HERC2	HECT and RLD domain containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 2	JUN	Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit
		kDa	Kilodalton
		KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
		KIT	KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
		KM	Kutanes Melanom
		LACTB	Lactamase β

LB	Luria Broth	MUM	Schleimhaut- bzw. mukosales Melanom
LD ₅₀	Letale Dosis, bei der 50% der mit der Substanz behandelten Tiere starben	NaCl	Natriumchlorid
LDH	Laktatdehydrogenase	NaF	Natriumfluorid
lncRNA	long non-coding RNA	NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Lys	Lysin	NaN ₃	Natriumazid
μM	mikromolar	NANOG	NANOG homeobox
MACF1	Microtubule Actin Crosslinking Factor 1	NaOH	Natriumhydroxid
MAPK	Mitogen-activated protein kinase	NC	Neuralleiste (<i>neural crest</i>)
MBD4	Methyl-CpG-Binding Domain Protein 4	NCBI	National Center for Biotechnology Information
MC1R	Melanocortin-1-Rezeptor	NF1	Neurofibromin 1
MEKi	MEK-Inhibitor	NHEJ	non-homologous end joining
MIA	Melanoma inhibitory activity	nm	Nanometer
miRNA	microRNA	NRAS	NRAS proto-oncogene, GTPase
MITF	Microphthalmia-associated transcription factor	NRG1	Neuregulin 1
MKK3	Mitogen-activated protein kinase kinase 3	NSG	NOD SCID Gamma
MKK6	Mitogen-activated protein kinase kinase 6	NW	Nebenwirkung
MLH1	MutL Homolog 1	OCA2	OCA2 Melanosomal Transmembrane Protein
mM	millimolar	OCT	Optische Kohärenztomographie
mRNA	messenger RNA	OR	Odds Ratio
MSH	Melanozytenstimulierendes Hormon	OS	Gesamtüberleben (<i>overall survival</i>)
MSX1	Msh homeobox 1	PALB2	Partner and localizer of BRCA2
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin	PARP	Poly (ADP-ribose)-Polymerase
		PAX3	Paired box 3
		PBS	Phosphate-buffered saline

PCA	Hauptkomponentenanalyse (<i>principal component analysis</i>)	PJ	Propidiumjodid
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen	PKC	Proteinkinase C
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)	PLCB4, PLC β	Phospholipase C Beta 4
PCWH	Periphere demyelinisierende Neuropathie-zentrale dysmyelinisierende Leukodystrophie-Waardenburg-Syndrom-Hirschsprung-Krankheit	PMP2	Peripheral myelin protein 2
PD-1	Programmed death-1	PNS	Peripheres Nervensystem
PDGFRB	Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta	POMC	Proopiomelanocortin
PD-L1	Programmed death ligand 1	POT1	Protection Of Telomeres 1
PDPK1	3-Phosphoinositide dependent protein kinase 1	POU4F1	POU class 4 homeobox 1
PFS	Progressionsfreies Überleben (<i>progression free survival</i>)	PRAME	Preferentially expressed antigen in melanoma
PHLDA1	Pleckstrin Homology Like Domain Family A Member 1	PRC2	Polycomb repressive complex 2
PHP	perkutane hepatische Perfusion	PROTAC	Proteolysis-targeting chimera
PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit alpha	PS	Phosphatidylserin
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat	PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PIP ₃	Phosphatidylinositoltriphosphat	PVDF	Polyvinylidenfluorid
		qPCR	quantitative Realtime-PCR
		Rac1	Rac Family Small GTPase 1
		Rb	Retinoblastom-Protein
		rev	reverse
		RFA	Radiofrequenzablation
		RFS	Rezidivfreies Überleben
		RhoA	Ras Homolog Family Member A
		RISC	RNA-induced silencing complex
		RNA	Ribonukleinsäure
		ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>reactive oxygen species</i>)

RPE	retinales Pigmentepithel	SOP	Standard Operating Procedure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)	SOX	Sex determining region of Y-HMG-Box
RR	Relatives Risiko	SPARC	Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich
RRM2	regulatorische Untereinheit M2 der Ribonukleotid-reduktase	STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
RSK	Ribosomal s6 family kinase	SUMO- ylierung	Durch SUMO (<i>small ubiquitin-like modifier</i>) vermittelte post-transkriptionelle Modifikation
RT	Raumtemperatur	TACE	Trans-arterielle Chemoembolisation
RTK	Rezeptortyrosinkinase	TAO	Thousand and one amino acid
SAM	S-Adenosyl-Methionin	TCGA	The Cancer Genome Atlas
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)	TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
SDS- PAGE	Natriumlaurylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)- Polyacrylamid- gelelektrophorese	TDP1	Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1
SEER	Surveillance, Epidemiology, and End Results	TFDP	Transkriptionsfaktor- dimerisierungspartner
Ser	Serin	TFRC	Transferrin-Rezeptor
SF3B1	Splicing Factor 3B Subunit 1	TGF- β	Transforming Growth Factor Beta
shRNA	short hairpin RNA	Thr	Threonin
siRNA	small interfering- Ribonukleinsäure	TMB	Tumormutationslast (<i>tumor mutational burden</i>)
SIRT	selektive interne Radiotherapie	TNF	Tumornekrosefaktor
SNP	Einzelnukleotid-Polymor- phismus (<i>single nucleotide polymorphism</i>)	tPA	tissue plasminogen activator
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein particle	TPM	Transcripts per million
SNV	Single nucleotide variant		

TRIO	Trio Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor	UQCC	Ubiquinol-Cytochrome C Reductase Complex Chaperone CBP3 Homolog
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	UV	Ultraviolett
tRNA	Transfer-RNA	V.	Vena
TSS	Transkriptionsstartstelle	VEGF	Vascular endothelial growth factor
TYR	Tyrosinase	vs.	versus
Tyr	Tyrosin	Wnt	Wnt family member
TYRP1	Tyrosinase-related protein 1	WS4	Waardenburg-Syndrom Typ 4
UBC9	Ubiquitin-konjugierendes Enzym 9	wt	Wildtyp
UM	Uveamelanom	YAP	Yes1 Associated Transcriptional Regulator

1. Einleitung

1.1 Das Uveamelanom

1.1.1 Lokalisation und Inzidenz

Das Uvea- oder Aderhautmelanom (UM) ist die häufigste bösartige Tumorerkrankung des Auges bei Erwachsenen und umfasst etwa 5 % aller neu diagnostizierten Melanome [1, 2]. Unter dem Begriff des UM werden Melanome zusammengefasst, die sich aus den Melanozyten der mittleren Augenhaut (Uvea) entwickeln, zu der die Aderhaut (Choroidea), der Ziliarkörper und die Regenbogenhaut (Iris) zählen [3]. Von allen okulären Melanomen entfallen etwa 85 % auf das UM, 5 % auf Bindehautmelanome und 10 % entwickeln sich aus Melanozyten in anderen anatomischen Strukturen des Auges [2]. Bei etwa 90 % der UM-Patienten¹ tritt das UM in der Choroidea auf, während im Ziliarkörper und der Iris entstehende Melanome nur etwa 6 % bzw. 4 % der Patienten betreffen [4].

Die allgemeine Inzidenz des UM beträgt etwa 5,1 pro 1 Million Einwohner in Europa [5], während die altersadjustierte Inzidenz 4,4 pro Million in Europa [5] und 5,1 pro Million in den USA beträgt [6]. Innerhalb der europäischen Länder gibt es dabei deutliche geografische Unterschiede mit einem Nord-Süd-Gefälle: Während im Zeitraum von 1995 bis 2002 in Südeuropa die altersstandardisierte Inzidenz bei 3,1 pro Million lag, wurde für Nordeuropa eine deutlich höhere Inzidenz von 5,8 pro Million festgestellt [5]. In einer früheren Untersuchung von Daten aus den Jahren 1983 bis 1994 wurde ebenfalls die niedrigste Inzidenz mit 2 pro Million in Spanien und die höchste Inzidenz mit mehr als 8 pro 1 Million Einwohner in Dänemark und Norwegen dokumentiert [7]. Die weltweit niedrigsten Inzidenzraten mit weniger als 1 pro Million wurden in Lateinamerika (Costa Rica), Asien (Regionen Singapur und Osaka) sowie in den USA in der afroamerikanischen Bevölkerung (*Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) Black-Kohorte) festgestellt [8]. In Deutschland betrug die altersadjustierte Inzidenzrate 6,41 pro Million im Zeitraum von 2009 bis 2015 [9]. Innerhalb Deutschlands gibt es ebenfalls geografische Unterschiede mit den niedrigsten Inzidenzen in den südlicher liegenden Bundesländern Hessen, Baden-Württemberg und Rheinland-Pfalz (2,1, 3,4 bzw. 4,5 pro Million) und den höchsten im Norden in Schleswig-Holstein, Brandenburg und Mecklenburg-Vorpommern (10,2, 11,4 bzw. 12,5 pro Million) (Daten der Jahre 2009 bis 2015) [9]. Pro Zunahme des Breitengrads um 10° steigt die Inzidenz um den Faktor 1,4 [7]. Als Gründe für die ausgeprägten Inzidenzunterschiede abhängig vom Breitengrad werden Umwelteinflüsse wie Veränderungen der UV-Strahlungsintensität oder unterschiedliche Ethnien und die daraus resultierenden Unterschiede der Haut- und Augenfarbe diskutiert [5, 7, 8]. Anders als beim kutanen Melanom (KM), dessen Inzidenzraten im gleichen

¹ Aus Gründen der besseren Lesbarkeit wird in dieser Dissertation das generische Maskulinum verwendet. Es werden weibliche und anderweitige Geschlechteridentitäten ausdrücklich mitgemeint.

Zeitraum um das Drei- bis Vierfache anstiegen und immer noch weiter steigen [10], legen Daten aus den USA nahe, dass die Inzidenz des UM seit den 1970er Jahren relativ stabil geblieben ist [6]. Im UM gibt es nur geringe geschlechterspezifische Unterschiede hinsichtlich der Inzidenz und des Erkrankungsalters [5, 6, 9, 11]. Altersstandardisiert liegen die Inzidenzraten bei Männern mit 2,86 pro Millionen Personenjahren etwas höher als bei Frauen (2,14 pro Millionen Personenjahre) [5, 6, 9, 11]. Laut SEER-Datenbank des Zeitraumes 1975 bis 2016 liegt das mittlere Alter bei der Erstdiagnose bei 60,8 Jahren (Standardabweichung (SD) $\pm 14,1$) und ist bei Männern geringfügig niedriger als bei Frauen ($60,5 \pm 13,9$ vs. $61,1 \pm 14,3$, $p = 0,027$) [11]. In Deutschland wurde ein medianes Alter von 67,5 Jahren bei Erstdiagnose berichtet [9]. Ähnlich wie auch bei anderen Tumorarten steigt die Wahrscheinlichkeit, an einem UM zu erkranken, mit steigendem Alter an. Eine europaweite Untersuchung von Daten aus dem Zeitraum von 1995 bis 2002 ergab eine altersabhängige Steigung der Inzidenz von 0,33 pro Million bei den 15- bis 24-Jährigen über 4,72 pro Million bei den 25- bis 64-Jährigen bis zu 16,06 pro Million bei den über 65-Jährigen [5]. Eine Analyse von Daten von 3.654 UM-Patienten aus Deutschland zeigte, dass Personen im Alter von 70 bis 74 Jahren die höchsten alters-adjustierten Inzidenzraten aufwiesen und mehr als die Hälfte aller Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnose älter als 65 Jahre waren [9].

1.1.2 Risikofaktoren

Bisher konnten einige exo- und endogene Risikofaktoren identifiziert werden, die mit einem häufigeren Auftreten des UM assoziiert sind.

1.1.2.1 Pigmentierung von Haut und Augen

Die Pigmentierung von Haut und Augen stellt einen Risikofaktor für die UM-Entwicklung dar. Personen mit einer hellen, also blauen oder grauen Augenfarbe, haben laut einer systematischen Übersichtsarbeit und drei Fall-Kontrollstudien aus Deutschland bzw. den Niederlanden ein höheres Risiko für die Entwicklung eines UM als Personen mit braunen Augen (Odds Ratio (OR) 1,38 (95 % Konfidenzintervall (CI) 1,04 – 1,82) bis 3,0 (95 % CI 1,5 – 6,0); OR Metaanalyse: OR 1,75, 95 % CI 1,31 – 2,34) [12-15]. Laut einer systematischen Übersichtsarbeit haben außerdem Personen mit atypischen kutanen Nävi (OR 2,82, 95% CI 1,10 – 7,26), hellem Hauttyp (OR 1,8, 95% CI 1,31 – 2,47), normalen kutanen Nävi (OR 1,74; 95% CI 1,74, 95% CI 1,27 – 2,39), Sonnenbrandneigung (OR 1,64, 95% CI 1,29 – 2,09), Irisnävi (OR 1,53, 95% CI 1,03 – 2,27) und Sommersprossen (OR 1,27, 95% CI 1,09 – 1,49) ein höheres UM-Risiko [15]. Allerdings besteht kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem UM-Risiko und Personen mit blonden bzw. roten Haaren (OR 1,02, 95% CI 0,82 – 1,26) [15]. Benigne Nävi können auch in der Choroidea auftreten, allerdings wird deren Transformationsrate zu einem Malignom als sehr gering eingeschätzt [16].

1.1.2.2 Weitere genetische Risikofaktoren

Neben der Haut- und Augenfarbe gibt es weitere genetische Risikofaktoren für die Entwicklung von UM. Bisher wurden sowohl somatische als auch Keimbahnmutationen in Genen identifiziert, die im UM häufig in mutierter Form vorliegen [17-20].

Die Lebenszeitprävalenz des UM wird auf 2,6 pro 1.000 (1:400) bei Personen mit okulärer Melanozytose geschätzt und ist damit deutlich häufiger als in der Allgemeinbevölkerung [21]. Bei der okulären Melanozytose handelt es sich um eine abnorme Vermehrung von uvealen Melanozyten, die sich in Form von braungrauen bis bläulichen Flecken auf der Lederhaut (Sklera) des Auges, einer Irisheterochromatie oder einer erhöhter Pigmentierung des Augenhintergrundes (Fundus) manifestieren kann; bei einer zusätzlichen kutanen Hyperpigmentierung um das Auge herum wird der Befund als okulodermale Melanozytose bzw. Nävus von Ota bezeichnet [22]. Genetische Analysen deuten darauf hin, dass es sich bei der okulären Melanozytose um einen kongenitalen uvealen Nävus handelt [17]. Da bei Personen mit okulärer Melanozytose weder Keimbahnmutationen gefunden wurden noch eine Vererbung erfolgt, wird davon ausgegangen, dass somatische Mutationen z. B. im Gen *Phospholipase C Beta 4 (PLCB4)* für dessen Entstehung verantwortlich sind und diese zur häufigeren UM-Entstehung beitragen [17].

Der Großteil der UM tritt spontan auf, allerdings gibt es Hinweise auf eine mögliche familiäre Tumorprädisposition von UM-Patienten bzw. eine familiäre Häufung von UM bei einem Teil der Patienten [23]. Abdel-Rahman et al. identifizierten bei UM-Patienten trunkierende Keimbahnmutationen im *BRCA-assoziierten Protein 1 (BAP1)*-Gen als mögliche Ursache für ein familiär gehäuftes Auftreten von Krebserkrankungen [18]. Direkte Verwandte von UM-Patienten, die auch Träger dieser Mutation waren, erkrankten ebenfalls an UM sowie anderen Tumoren wie etwa Adenokarzinomen der Lunge oder Meningeomen [18]. Die Analyse von drei dieser Tumoren zeigte, dass es in diesen zu einem *loss of heterozygosity* des Chromosoms (Chr.) 3p gekommen war und damit auch der Bereich der chromosomalen Lokalisation von *BAP1* (3p21) betroffen war [18]. *BAP1*-Keimbahnmutationen wurden auch bei weiteren UM-Patienten gefunden und traten in der Promotorregion, verschiedenen Exons als auch Introns des *BAP1*-Gens auf [24-28]. Je nach Mutation hatte dies Auswirkungen auf das Splicing der *BAP1*-RNA, die Kernlokalisation oder die Enzymaktivität des Proteins [25]. Das *BAP1*-Tumorprädispositionssyndrom wird auch mit einer familiär gehäuften Entwicklung von Mesotheliomen [29], Nierenzellkarzinomen [30] und melanozytären kutanen Tumoren [31] in Zusammenhang gebracht. Laut Schätzungen basierend u.a. auf Daten der SEER-Datenbank beträgt die UM-Prävalenz von Personen mit pathogenen *BAP1*-Keimbahnmutationen 2,8 % (95 % CI 0,88 - 4,81) in den USA [32]. Andere Studien gehen von einer Prävalenz zwischen 1,6 % [33] und 3 % (bei jedoch geringerer Patientenzahl) aus [34]. UM-Patienten mit *BAP1*-Keimbahnmutation haben signifikant größere Primärtumoren als Patienten ohne eine solche (mittlerer Durchmesser 15,9 vs. 12,3 mm, $p = 0,004$), häufiger eine Beteiligung des Ziliarkörpers (75 % vs. 21,6 %, $p = 0,002$) und sie entwickeln häufiger

Metastasen (71,4 % vs. 18 %, $p = 0,003$), wohingegen kein statistisch signifikanter Zusammenhang mit dem Alter zum Zeitpunkt der Diagnose besteht (56,8 vs. 58,4 Jahre, $p = 0,44$) [33].

Keimbahnmutationen des Gens *Methyl-CpG-Binding Domain Protein 4 (MBD4)*, die zum Verlust der Proteinfunktion führen, wurden ebenfalls bei Patienten mit UM gefunden [19, 20]. Die Prävalenz von *MBD4*-Keimbahnmutationen bei UM-Patienten beträgt zwischen 0,2 % [20] und 0,7 % [19]. Träger dieser Keimbahnmutationen haben ein 9,15-fach höheres Risiko (95 % CI 4,25 – 19,73) für die Entwicklung eines UM im Vergleich zur Gesamtbevölkerung [19]. Es ist jedoch umstritten, ob *MBD4*-Mutationen überhaupt als prädisponierend für das UM angesehen werden können oder nicht [20]. Ein potenzieller Zusammenhang zwischen einer UM-Prädisposition und Keimbahnmutationen wird auch für die Gene *Protection Of Telomeres 1 (POT1)*, einem Gen, das an der Aufrechterhaltung der Telomerlänge beteiligt ist [35] sowie für *Partner and localizer of BRCA2 (PALB2)* und *MutL Homolog 1 (MLH1)* diskutiert [36]. Genomweite Assoziationsstudien konnten zudem eine Assoziation zwischen den Loci *Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 (TDP1)*, *CLPTM1 like (CLPTM1L)* sowie Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, SNP) in der Region von *HECT and RLD domain containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 2 (HERC2)/ OCA2 Melanosomal Transmembrane Protein (OCA2)*, die die Pigmentierung der Iris und damit die Augenfarbe beeinflusst, und einem erhöhten UM-Risiko identifizieren [37, 38].

1.1.2.3 Umwelteinflüsse

Ultraviolette (UV) Strahlung gilt als einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung des KM [39, 40], im UM scheint dies jedoch eher weniger der Fall zu sein. Für die UV-Strahlung als möglichen Risikofaktor spricht, dass beispielsweise Schweißer ein deutlich höheres Risiko für die Entwicklung von UM haben (OR 7,3, 95 % CI 2,6 – 20,1 bei Männern) [41] und es auch Berichte über bilaterale UM bei dieser Berufsgruppe gibt [42]. Beim Schweißen entsteht neben UV-A- (Wellenlänge 315 bis 400 nm) und UV-B- (280 bis 315 nm) auch die energiereiche UV-C-Strahlung (100 bis 280 nm), die zwar im Spektrum des Sonnenlichts enthalten ist, aber normalerweise die Erdoberfläche nicht erreicht, da sie bereits in der Erdatmosphäre von der Ozonschicht absorbiert wird [43, 44]. Gegen einen kausalen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von UM und der UV-Exposition sprechen jedoch mehrere Aspekte. Auf dem Weg bis zu den Photorezeptoren der Netzhaut (Retina) passiert das Licht nacheinander zuerst die Hornhaut (Cornea), das Kammerwasser, die Linse und dann den Glaskörper [44]. Die verschiedenen anatomischen Strukturen des Auges absorbieren abhängig von der Wellenlänge den Großteil des einfallenden UV-Lichts, sodass letztlich weniger als 1 % der UV-Strahlung auf die Retina trifft [44]. Die kurzwellige UV-C-Strahlung wird bereits von der Cornea vollständig absorbiert [44]. Die längerwelligere UV-A-Strahlung erreicht bei jungen Menschen zwar die Retina, wird bei älteren Menschen aber bereits von der Linse vollständig absorbiert [44]. Somit dürfte die UV-Exposition der Choroidea, die hinter der Retina liegt und in der die meisten UM entstehen [3, 44], relativ gering sein. Zum anderen werden typische UV-Mutationssignaturen wie die Transition von Cytosin zu Thymin (C>T) in den DNA-

Sequenzen TCN und CCN, die etwa in Hauttumoren aus sonnenexponierten Körperstellen nachgewiesen werden können [45], im UM mit Ausnahme der Iris melanome nicht gefunden [46–49]. Auch die Mutationslast des Tumors (*tumor mutational burden*, TMB) ist im UM sehr gering [46], was ebenfalls nicht für einen UV-induzierten Tumor spricht. Zudem konnten in einer systematischen Übersichtsarbeit und Metaanalyse auch kein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen einer häufigeren UM-Entwicklung und der beruflichen Sonnenexposition (OR 1,37, 95% CI 0,96 – 1,96), Nähe des Breitengrads des Geburtsorts zum Äquator (OR 1,08, 95% CI 0,67 – 1,74) oder einer vermehrten Freizeitaktivität im Freien (OR 0,86, 95% CI 0,71 – 1,04) gefunden werden [15]. Neben der künstlichen UV-Strahlung werden daher auch die Exposition mit Dämpfen und Chemikalien, die beim Schweißprozess entstehen, als Erklärung für das erhöhte UM-Risiko von Schweißern diskutiert [15]. Abgesehen von Schweißern wurde auch bei weiteren Berufsgruppen ein erhöhtes UM-Risiko identifiziert. In einer bevölkerungsbasierten Fall-Kontroll-Studie in neun europäischen Ländern hatten vor allem Köche (relatives Risiko (RR) 2,40, 95% CI 1,35 – 4,28), Wäschereimitarbeiter (RR 3,14, 95 CI 1,44 – 6,86) und Reinigungspersonal (RR 2,15, 95% CI 1,30 – 3,54) ein höheres Risiko für die Entwicklung eines UM [50]. Die Exposition mit land- und forstwirtschaftlich eingesetzten Pestiziden [51] und endokrin wirksamen Substanzen [52] scheint hingegen keinen Einfluss auf das UM-Risiko zu haben.

1.1.3 Genetische Besonderheiten und Abgrenzung zu anderen Melanomsubtypen

Obwohl Melanozyten die Ursprungszellen sowohl des UM als auch des KM und des mukosalen Melanoms (MUM) sind, lassen sich diese Malignome sowohl genetisch als auch klinisch klar voneinander abgrenzen.

1.1.3.1 Genetische Veränderungen im KM und anderen Melanomsubtypen

Die im KM am häufigsten vorkommenden genetischen Veränderungen betreffen aktivierende Mutationen in den Genen *B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase* (*BRAF*) auf Chr. 7q34 [53] und *NRAS proto-oncogene, GTPase* (*NRAS*) auf Chr. 1p13.2 [54], die zu einer konstitutiven Überaktivierung des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweges führen, der das Überleben und die Proliferation von Zellen fördert [40, 55, 56]. Etwa 41 % [57] bis 52 % [58] aller KM tragen *BRAF*-Mutationen. Ein Mutations-Hotspot betrifft das Codon 600 in der Kinasedomäne des Proteins und die am häufigsten dort zu findenden Veränderungen führen zu einem Austausch der Aminosäure Valin zu Glutaminsäure (*BRAF*^{V600E}) [55, 58]. Diese Veränderung führt zur dauerhaften Aktivierung des Proteins [55]. KM mit *BRAF*-Mutationen kommen häufiger in Hautarealen ohne chronische Lichtschäden [57] sowie bei bis zu 50 % der sehr seltenen Bindehautmelanome vor [59, 60]. Aktivierende *NRAS*-Mutationen, die bei 18 % [57] bis 28 % der KM-Tumoren auftreten, betreffen vor allem die Hotspot-Mutation im Codon 61 mit dem Austausch der Aminosäure Glutamin durch Arginin (*NRAS*^{Q61R}) [58] und treten gehäuft in KM auf chronisch lichtgeschädigten Hautarealen auf [57]. Ein weiteres, häufig mutiertes

Gen im KM ist *NF1* auf Chr.17q11.2 [61], das für das Protein Neurofibromin 1 codiert und bei 14% der KM-Patienten mutiert ist; im Gegensatz zu Mutationen von *NRAS* und *BRAF* führen diese Mutationen nicht zu einer Überaktivierung, sondern zu einem Funktionsverlust des Proteins [58]. Im MUM, akrolentiginösen Melanom (ALM) und in Melanomen, die in chronisch sonnengeschädigter Haut auftreten, werden außerdem gehäuft genetische Veränderungen im Gen *KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase (KIT)* auf Chr. 4q12 gefunden [62], das für eine Rezeptortyrosinkinase (RTK) codiert und den PI3K/Akt-, MAPK- und Januskinase (JAK)/*Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT)-Signalweg aktivieren kann [63, 64]. Interessanterweise sind alle diese Mutationen im UM so gut wie gar nicht zu finden [49, 65].

Das UM ist ein Tumor mit einer sehr geringen medianen TMB zwischen 0,5 Mutationen pro Megabase [46, 48, 66] und 1,3 Mutationen pro Megabase, [47, 67]. Im Gegensatz dazu gehört das KM mit einem Median von 14,4 Mutationen pro Megabase zu den Tumoren mit der höchsten TMB [67]. Eine Analyse von Daten aus dem *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) von KM- und UM-Primärtumoren ergab, dass beide Tumorentitäten deutlich mehr SNP als Deletionen oder Insertionen aufwiesen, am häufigsten dabei C>T Transitionen [68]. Allerdings lag die mediane Anzahl an Veränderungen bei 223,5 im KM und nur bei 11 im UM [68]. Ebenfalls unterscheiden sich KM und UM bezüglich des DNA-Methylierungsmusters und der Expression von microRNAs (miRNAs) signifikant voneinander [68].

1.1.3.2 Häufige Mutationen im UM

Trotz der geringen Mutationsrate konnten auch im UM Mutationen entdeckt werden, die gehäuft auftreten und entscheidend an der Pathogenese beteiligt sind. Die Mutationshäufigkeit der im UM am häufigsten mutierten Gene *G-Proteine Guanine Nucleotide-binding Protein Subunit Alpha Q (GNAQ)*, *Guanine Nucleotide-binding Protein Subunit Alpha-11 (GNA11)*, *BAP1*, *PLCB4*, *Splicing Factor 3B Subunit 1 (SF3B1)*, *Eukaryotic translation initiation factor 1A (EIF1AX)* oder *Cysteinylleukotrienrezeptor 2 (CYSLTR2)* unterscheidet sich zwischen den Geschlechtern nicht [11].

1.1.3.2.1 GNAQ und GNA11

Etwa 80 % bis 90 % aller UM tragen Mutationen in den Genen *GNAQ* auf Chr. 9q21 [69] oder *GNA11* auf Chr. 19p13 [70], welche für die α -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine *GNAQ* und *GNA11* codieren, die an der Weiterleitung des Signals von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an die nachgeschalteten Signalwege im Zellinneren beteiligt sind [71-75]. *GNAQ*-Mutationen kommen bei 43 % [74] bis 50 % der UM [46] sowie bei 6 % der Personen mit einem Nävus Ota sowie 83 % aller blauen Nävi vor [71, 76]. Bei Iris melanomen wurde sogar eine Häufigkeit von 68 % beschrieben [73]. *GNA11*-Mutationen wurden bei etwa 45 % [46] bis 49% [74] der UM gefunden und wurden in 32 % der UM-Primärtumoren und bis zu 57 % der UM-Metastasen [76] sowie in 7 bis 11 % aller blauen Nävi nachgewiesen [76, 77]. Für das Iris melanom wurde eine Häufigkeit von etwa 16 % ermittelt [73]. Die Mutationen in *GNAQ* und *GNA11* betreffen fast

ausschließlich das Codon 209 im Exon 5 (hauptsächlich *GNAQ/GNA11*^{Q209L}, seltener *GNAQ/GNA11*^{Q209P}), welches in der Ras-Domäne von GNAQ und GNA11 liegt und für die GTPase-Funktion essenziell ist, außerdem mit ca. 6 % deutlich seltener das Codon 183 im Exon 4 (*GNAQ/GNA11*^{R183}-Mutationen) und führen im weiteren Verlauf über MEK und ERK zu einer dauerhaften Aktivierung des MAPK-Signalweges [46, 48, 71, 73, 76, 78, 79], des TRIO/Rac1/RhoA- und Yes1 Associated Transcriptional Regulator (YAP)-Hippo-Signalweges [80, 81] sowie des β -Catenin-Signalweges (Abb. 1) [82].

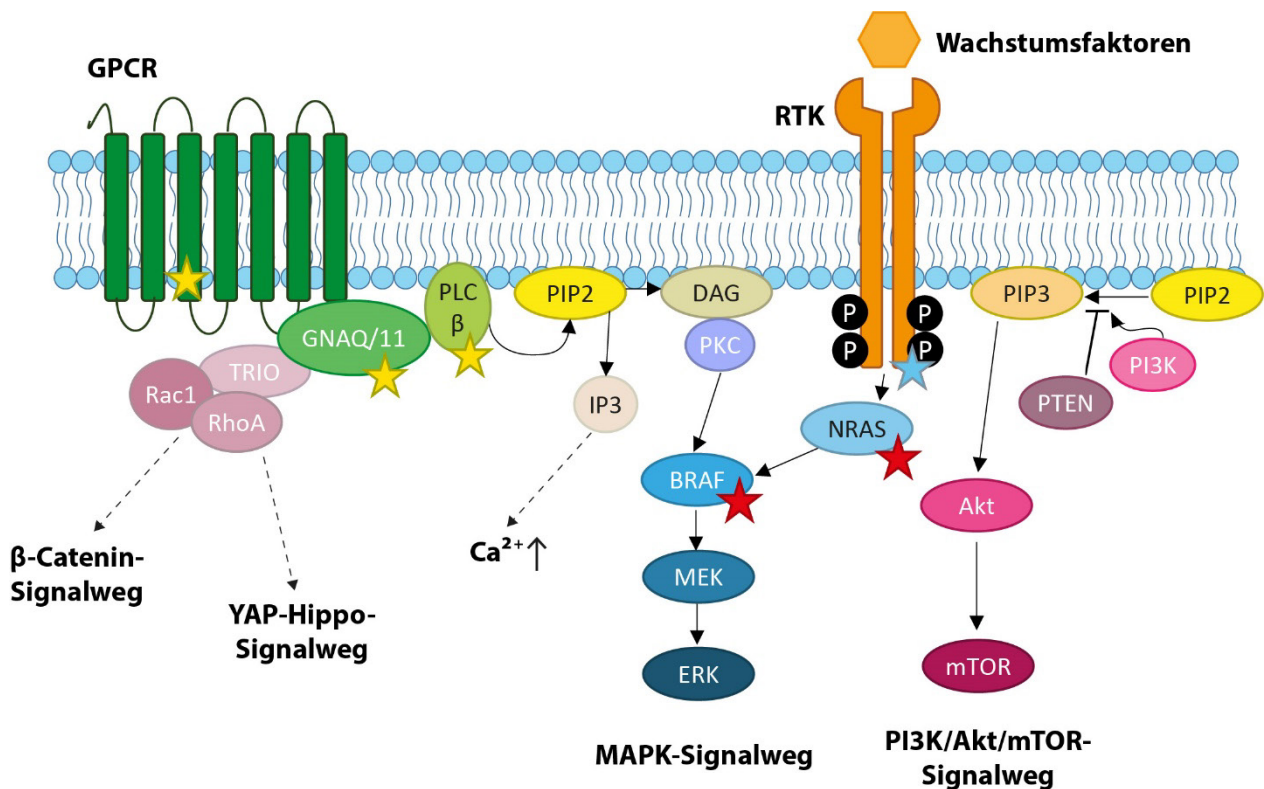


Abb. 1: Typische Treibermutationen und Signalwegveränderungen im UM, KM und anderen Melanomsubtypen.

Treibermutationen im UM (gelbe Sterne) betreffen vor allem die G-Proteine GNAQ und GNA11, G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) wie den Cysteinylleukotrienrezeptor 2 (CysLT₂R) und die Phospholipase C-Beta (PLC β), die zur konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signalweges sowie zur Aktivierung des YAP-Hippo- und β -Catenin-Signalweges und über PIP₂ des PI3K/Akt/mTOR-Signalweges führt. Im Gegensatz dazu betreffen die häufigsten Treibermutationen im KM (rote Sterne) die Kinasen BRAF und NRAS sowie in MUM, ALM und Melanomen der sonnengeschädigten Haut Mutationen in der Rezeptortyrosinkinase (RTK) KIT (blauer Stern). Abbildung erstellt nach Park et al. 2018 [82] und Carvajal et al. 2017 [83].

Experimentelle Daten und Untersuchungen im Tumorgewebe von Primärtumoren und Metastasen legen nahe, dass die Mutationen *GNAQ/GNA11*^{Q209} und *GNA11*^{R183} als Treibermutationen des UM fungieren und bereits früh im Verlauf der Erkrankung entstehen [71, 76, 84]. Im Tierversuch wurde bei Mäusen, denen mit *GNA11*^{Q209L} oder *GNA11*^{R183C}

transduzierte Melan-a-Zellen - eine immortalisierte murine Melanozytenzelllinie - gespritzt wurden, ein deutliches Tumorstadium im Vergleich zu den mit *GNA11*-Wildtyp (wt)-transfizierten Zellen beobachtet [76]. Ähnlich führte die Transfektion mit *GNAQ*^{Q209L} bei Melanozyten zum Zellwachstum unabhängig von der Anhaftung an den Untergrund (*anchorage-independent growth*) und mit *GNAQ*^{Q209L} transfizierte Melan-a-Zellen konnten ebenfalls die Entwicklung von Tumoren in Mäusen induzieren [71]. Bei anderen Melanomsotypen als dem UM kommen *GNAQ*- und *GNA11*-Mutationen in weniger als 1 % aller Fälle vor und nicht zusammen mit anderen typischen Treibermutationen in *BRAF*, *NRAS* oder *KIT* [85, 86]. Genetisch ähneln diese Tumoren dem UM, da sie häufig auch andere UM-typische Mutationen in Genen wie *EIF1AX*, *SF3B1* oder *BAP1* sowie eine vergleichsweise geringe TMB aufweisen [86]. Die UV-typischen C>T Transitionen treten in diesen Melanomen weniger häufiger auf als in anderen KM, allerdings deutlich häufiger als in UM [86].

Aufgrund der prominenten Rolle von *GNAQ* und *GNA11* bei der Pathogenese des UM liegt es nahe, diese Proteine als Zielstrukturen für eine zielgerichtete Therapie mit einem *small molecule*-Inhibitor analog zu den *BRAF*-Inhibitoren (*BRAFi*) beim KM zu nutzen. Das zyklische Depsipeptid FR900359 aus der gekerbten Spitzblume (*Ardisia crenata*) wirkt als allosterischer Inhibitor der G-Proteine *GNAQ* und *GNA11* und kann *in vitro* das Zellwachstum, die Aktivierung des ERK-Signalweges und die Expression proliferationsfördernder Proteine in den *GNAQ*-mutierten UM-Zelllinien 92.1 und OMM1.3 hemmen sowie zum Zellzyklusarrest und zur Apoptose der Zellen führen [87]. Onken et al. konnten ähnliches bei Versuchen mit Patientenmaterial in der Kurzzeitkultur beobachten [88]. Angesichts dessen, dass FR900359 sowohl die Funktion des Wildtyp- als auch des mutierten *GNAQ*- bzw. *GNA11*-Protein hemmt, heterotrimere G-Proteine jedoch an einer Vielzahl an lebenswichtigen Signalwegen beteiligt sind und eine Hemmung daher mutmaßlich mit vielfältigen systemischen Nebenwirkungen (NW) einhergeht [89], testeten Onken et al. auch die Auswirkungen der Substanz auf verschiedene physiologische Prozesse im Tiermodell [88]. Unterhalb der LD₅₀ von 0,6 mg/kg wurden nur moderate Effekte wie etwa eine vorübergehende Hypotonie nach der Injektion der Substanz beobachtet, sodass die Autoren der Studie davon ausgehen, dass es ein therapeutisches Fenster für die Nutzung beim Menschen geben könnte [88]. Seit kurzem wird das Antikörper-Inhibitor-Konjugat DYP-688, das aus einem Antikörper besteht, der an das häufig im UM exprimierte Oberflächenprotein gp100 bindet und an den ein *GNAQ*/*GNA11*-Inhibitor SDZ475 gekoppelt wurde, in der unverblindeten, multizentrischen *first-in-human* Phase-1/2-Studie NCT05415072 bei Patienten mit metastasiertem UM und *GNAQ*- bzw. *GNA11*-Mutation getestet [90].

1.1.3.2.2 *BAP1*

Das *BAP1*-Gen auf Chr. 3p21.1 [91] ist bei etwa 21 % [75] bis 40 % der UM insgesamt und bei etwa 84 % der metastasierenden UM mutiert [24]. Bei einer genetischen Untersuchung von 19 Iris melanomen wurden keine *BAP1*-Mutationen gefunden [73]. Im Gegensatz zu den Mutationen in *GNAQ* und *GNA11*, die sich auf einige wenige Hotspots konzentrieren [71, 76], wurden *BAP1*-Mutationen an verschiedenen Stellen des Gens

gefunden, die zu Veränderungen in der katalytischen Domäne, den Domänen für die Bindung von BRCA1 und dem Protein BRCA1 Associated RING Domain 1 (BARD1) oder zur Expression trunkierter Proteine führen [24]. Bei einem geringen Teil der UM-Patienten lassen sich wie oben beschrieben *BAP1*-Keimbahnmutationen nachweisen [18, 24-28]. Bei UM-Tumoren mit einem hohen Metastasierungsrisiko kommt es sehr häufig auch zu einer Monosomie 3, was darauf schließen lässt, dass der Verlust beider *BAP1*-Allele für den Krankheitsprogress nötig ist [24]. Mutationen in *GNAQ* und *BAP1* können sowohl parallel als auch unabhängig voneinander in UM-Tumoren vorkommen [24]. Allerdings treten *BAP1*-Mutationen im Gegensatz zu *GNAQ*- und *GNA11*-Mutationen erst später im Krankheitsverlauf in zeitlichem Zusammenhang mit der Metastasierung auf [24]. *BAP1* ist eine Deubiquitinase und agiert einerseits als Tumorsuppressorprotein, da es eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen spielt und als transkriptioneller Regulator agiert [92]. Andererseits kann *BAP1* in UM-Zellen auch den Zellzyklusprogress fördern, indem es als Coregulator des Transkriptionsfaktors E2F1 agiert und die Transkription von S-Phase-Genen fördert [93]. *In vitro* führte der kurzzeitige Knockdown von *BAP1* in UM-Zelllinien zu einer verringerten Proliferation der Zellen, während sich bei längerer *BAP1*-Hemmung keine Unterschiede bezüglich der Zellviabilität, Proliferation und des Zellzyklusfortgangs ergaben [94]. *In vivo* führte die Implantation von *BAP1*-defizienten UM-Zellen zu einer geringeren Metastasengröße verglichen mit den Kontrollen [94]. Die *BAP1*-Hemmung mittels *short hairpin* RNA (shRNA) führte zu einer Herabregulierung von Genen wie *Microphthalmia-associated transcription factor* (*MITF*) und *Dopachrom-Tautomerase* (*DCT*), die Bestandteil der melanozytären Differenzierung sind [94]. Demgegenüber wurde der Stammzellfaktor *Nanog homeobox* (*NANOG*) nach *BAP1*-Hemmung hochreguliert und morphologische Veränderungen wie ein weniger spindelförmiges Aussehen und weniger Dendriten waren zu beobachten [94]. Der Verlust von *BAP1* scheint also weniger die Proliferationsfähigkeit der Zellen zu steigern als vielmehr die Dedifferenzierung und damit die Metastasierungsfähigkeit der Zellen zu fördern [94]. *BAP1*-Mutationen wurden auch im *blue nevus-like melanoma* gefunden [77].

1.1.3.2.3 *SF3B1*

Das Gen *SF3B1* auf Chr. 2q33.1 [95] codiert für die *Splicing Factor 3B Subunit 1*, eine Untereinheit des SF3b-Multiproteinkomplexes, und ist zu Beginn des Spleißosomaufbaus für verschiedene Umlagerungen der kleinen nukleären Ribonukleinproteinpartikel (*small nuclear ribonucleoprotein particles*, snRNP) zuständig [96]. Nachdem letztere dadurch richtig an den Spleißstellen der prä-messenger RNA (mRNA) positioniert wurden, führen sie das Splicing durch, wobei die Intron-Sequenzen aus der transkribierten prä-mRNA entfernt und letztlich nur die codierenden Bereiche der Exons in der prozessierten mRNA übrig bleiben [96]. Die Häufigkeit von *SF3B1*-Mutationen im UM wird zwischen 15 % [46, 47, 97] und 22 % [84] angegeben. Bei einer genetischen Untersuchung von 19 Iris melanomen wurden keine *SF3B1*-Mutationen gefunden [73]. Die Mutationen konzentrieren sich auf die sogenannten *Huntington*, *Elongation Factor 3*, *PR65/A*, *TOR* (HEAT)-Domänen und betreffen am häufigsten das Codon 625 (*SF3B1*^{R625H/C/G/P/L}),

seltener befinden sich die Mutationen in anderen HEAT-Domänen wie etwa im Fall der Mutationen *SF3B1*^{K666T/M} oder *SF3B1*^{K700E} [47, 48, 75, 97, 98]. Die Auswirkungen der *SF3B1*-Mutationen auf die globale RNA-Prozessierung und Genexpression sowie dessen Beitrag zur Pathogenese des UM sind noch nicht eindeutig geklärt. Harbour et al. fanden beim Vergleich der Genexpression von fünf *SF3B1*-mutierten und sechs *SF3B1*-wt-UM-Tumoren nur zehn differenziell exprimierte Gene, die allerdings keine Rückschlüsse auf die funktionelle Relevanz der *SF3B1*-Mutation zuließen [98]. Ebenso konnten die Autoren keine Veränderungen im Splicingverhalten, d.h. bezüglich der Spleiß-Donor- und Akzeptorstellen und des Beibehaltens von Introns, beobachtet werden [98]. Im Gegensatz dazu fanden Furney et al. bei der Untersuchung von jeweils drei *SF3B1*-mutierten und *SF3B1*-wt-UM-Tumoren 325 differenziell exprimierte Gene ohne Anreicherung für bestimmte *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG)- oder REACTOME-Signalwege sowie Abweichungen beim Splicing von 130 Genen [47]. Die Autoren identifizierten bei der Analyse verschiedener Datensätze ein alternatives Splicing am 3'-Ende der Gene *ATP Binding Cassette Subfamily C Member 5* (*ABCC5*) und *Ubiquinol-Cytochrome C Reductase Complex Chaperone CBP3 Homolog* (*UQCC*) sowie der *long non-coding RNA* (lncRNA) *Colorectal Neoplasia Differentially Expressed* (*CRNDE*) in *SF3B1*-mutierten UM-Tumoren [47]. Bigot et al. konnten bei 20 % der metastasierten UM-Patienten mit *SF3B1*-mutierten Tumoren jedoch immunogene Neoantigene, die vermutlich durch aberrantes Splicing aufgrund der Mutationen entstanden waren, sowie CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen finden [99]. Interessanterweise konnten diese T-Zellen *SF3B1*-mutierte UM-Zellen erkennen und abtöten, was darauf hinweist, dass diese Neoantigene von den UM-Zellen auch präsentiert und dadurch für die Erkennung durch das Immunsystem prinzipiell zur Verfügung stehen [99]. In anderen Melanomsubtypen kommen *SF3B1*-Mutationen bei 1,66 % aller Fälle vor [77, 85].

1.1.3.2.4 *EIF1AX*

EIF1AX codiert für das Protein *eukaryotic translation initiation factor 1A* und ist an der Translationsinitiierung beteiligt, indem es die Anlagerung der Initiator-Methionyl-Transfer-RNA (tRNA) an die 40S-Ribosomuntereinheit und so die Zusammenlagerung des Präinitiationskomplexes fördert [100, 101]. Bei 12,5 % bis 24 % der UM-Tumoren finden sich Mutationen in diesem Gen, das auf dem X-Chromosom an Position Xp22 lokalisiert ist [75, 97]. In Iris melanomen scheinen *EIF1AX*-Mutationen bei 42 % der Fälle und damit etwas häufiger aufzutreten [73]. Am häufigsten führten die Mutationen zum Austausch einer der 15 N-terminal gelegenen, in Eukaryoten hochkonservierten Aminosäuren [97]. In einigen Fällen kam es aber auch zu kurzen Deletionen oder Veränderungen der Spleiß-Akzeptorstellen und damit zur Generierung von alternativ gespleißten *EIF1AX*-mRNAs, wobei es jedoch zu keinen *loss-of-function*-Mutationen kam [97]. Martin et al. fanden bei der Analyse der Tumoren von UM-Patientinnen ausschließlich mutierte *EIF1AX*-Transkripte, was vermuten lässt, dass das nichtmutierte *EIF1AX*-Allel durch die X-Chromosomeninaktivierung stillgelegt wurde [97]. Die Mutationen im N-terminalen Abschnitt von *EIF1AX* kommen zusammen mit Mutationen in *GNAQ* oder *GNA11* vor [48]. Die auch in dieser Arbeit untersuchte UM-Zelllinie 92.1 besitzt eine homozygote

EIF1AX^{G6D}-Mutation [48]. *In vitro* führt der Knockdown von *EIF1AX* zu einer Verringerung der Zellviabilität sowohl in *EIF1AX*-wt als auch *EIF1AX*-mutierten UM-Zelllinien [48]. Martin et al. spekulierten, dass *EIF1AX*-Mutationen im N-terminalen Ende des Proteins dazu führen könnten, dass die Erkennung der Initiationsstellen schlechter funktioniert oder dass andere AUGs als Startcodons erkannt werden, was zur Verwendung alternativer Startcodons bei der Translation tumorhemmender oder –fördernder Gene führen könnte [97]. Johnson et al. fanden bei *in vitro*-Experimenten dann allerdings Hinweise darauf, dass *EIF1AX*-Mutationen zu einer verminderten Translationseffizienz von Genen führen, die für ribosomale Proteine codieren [48]. In den Tumoren weiblicher UM-Patientinnen wurden höhere *EIF1AX*-mRNA-Level gefunden als bei männlichen Patienten [11]. Sowohl *SF3B1*- als auch *EIF1AX*-Mutationen waren häufiger in UM-Tumoren mit Disomie 3 zu finden [97]. Mutationen in *SF3B1*, *EIF1AX* und *BAP1* kommen zwar häufig zusammen mit *GNAQ*- oder *GNA11*-Mutationen vor, allerdings gibt es nur wenige Einzelfälle, bei denen mehr als eines der drei Gene mutiert ist [48, 97]. In anderen Melanomsubtypen treten *EIF1AX*-Mutationen nur bei 0,62 % aller Fälle auf [85].

1.1.3.2.5 *CYSLTR2*

Das auf Chr. 13q14 lokalisierte Gen *CYSLTR2* codiert für den Cysteinylleukotrienrezeptor 2 (CysLT₂R), einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) bestehend aus sieben Transmembrandomänen, der durch die Bindung von Leukotrienen aktiviert wird [102]. *GNAQ* und *GNA11* sind dabei am Transfer des Signals vom Rezeptor CysLT₂R an die nächsten Proteine der Signalkaskade wie die Proteinkinase C (PKC), Phospholipase C β (PLC β) und β -Catenin beteiligt [82]. Eine Hotspot-Mutation an einer hochkonservierten Stelle der Helix der Transmembrandomäne 3 im Codon 129 (*CYSLTR2*^{L129Q}) tritt bei etwa 2 % [46] bis 4 % [75] aller UM auf, jedoch ausschließlich bei denjenigen UM, die keine *GNAQ*- oder *GNA11*-Mutationen aufweisen [74]. Diese Mutation führt zu einer Konformationsänderung des Proteins, wodurch es zu einem *gain-of-function* und einem dauerhaften Signaling des Rezeptors über *GNAQ*/*GNA11* und PLC β unabhängig von der Bindung eines Liganden kommt [74, 103]. Im Tiermodell konnten sowohl die murine immortalisierte Fibroblastenlinie NIH3T3 als auch Melan-a-Zellen, welche mit einem *CYSLTR2*^{L129Q}-Konstrukt transfiziert worden waren, nach subkutaner Implantation Tumoren in immunsupprimierten Mäusen induzieren [74]. In Melan-a-Zellen führte die *CYSLTR2*^{L129Q}-Variante zu einer verstärkten Pigmentierung der Zellen und nach Transfektion in die UM-Zelllinie Mel290 wurde eine Zunahme der Genexpression der melanozytären Gene Tyrosinase (*TYR*), Tyrosinase-related protein 1 (*TYRP1*) und *DCT* festgestellt [74]. Somit scheint die Mutation nicht nur die Expression melanozytärer Gene, sondern auch die Tumorentstehung zu fördern. *CYSLTR2*-Mutationen wurden auch bei 1 % der blauen Nävi gefunden und treten im *blue nevus-like melanoma* auf [77].

1.1.3.2.6 *PLCB4*

Mutationen des auf Chr. 20p12.3 –p12.2 lokalisierten Gens *PLCB4* [104] treten bei etwa 2,5 % [75] bis 5 % [46] der UM auf, jedoch nur selten zusammen mit *GNAQ*- oder *GNA11*-Mutationen [74]. Falls doch, handelt es sich bei diesen Fällen vorwiegend um

Tumoren mit den selteneren *GNAQ/GNA11*^{R183H}-Mutationen [74]. *PLCB4* wird durch *GNAQ* und *GNA11* in der Signaltransduktionskaskade aktiviert [66] und katalysiert dann die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (*PIP*₂) in der Zellmembran zu Diacylglycerol (*DAG*) und zum *second messenger* Inositol-1,4,5-triphosphat (*IP*₃) [105]. *DAG* verbleibt an der Zellmembran und führt zur Aktivierung der *PKC*, die wiederum die Proliferation, Migration, Differenzierung und den Zelltod beeinflussen kann [106, 107]. *IP*₃ bindet dagegen im Zytosol an Rezeptoren am endoplasmatischen Retikulum (*ER*), was zum *Ca*²⁺-Ausstrom aus dem *ER* führt [107]. Die daraus resultierende Erhöhung der intrazellulären *Ca*²⁺-Konzentration nimmt letztlich ebenfalls Einfluss auf die Migration, Zellteilung und den Zelltod [107]. *In vitro* führt die Hemmung mit dem *PLC*-Inhibitor *U-73122* zu einer Verringerung der Zellproliferation in den *UM*-Zelllinien 92.1 und Mel202 [108]. Auch in diesem Gen gibt es mit der *PLCB4*^{D630Y}-Mutation einen Mutationshotspot, der sich in der *Y*-Domäne der hochkonservierten katalytischen Domäne des Proteins befindet und zu dessen konstitutiven Aktivierung und damit zu einem *gain-of-function* führt [66, 108]. Melan-a-Zellen mit stabiler *PLCB4*^{D630Y}-Expression zeigten *in vitro* ein Wachstum in Zellkulturmedium ohne Phorbol-12-myristat-13-acetat, welches diese Zellen normalerweise zur Wachstumsstimulation benötigen und führten im Vergleich zu *PLCB4*-wt-transduzierten Zellen zur Entwicklung von größeren Tumoren in *NOD-SCID*-Gamma-(*NSG*)-Mäusen [108]. *PLCB4*-Mutationen wurden auch bei 1 % der blauen Nävi gefunden sowie im *blue nevus-like melanoma* [77].

1.1.3.2.7 *MBD4*

MBD4 auf Chr. 3q21.3 codiert für eine DNA-Glykosylase, die an der DNA-Reparatur im Rahmen der Basen-Exzisionsreparatur beteiligt ist und bevorzugt an methylierte CpG-Dinukleotide bindet [109]. *MBD4* entfernt in CpG-Dinukleotiden die Basen Thymin und Uracil, die fälschlicherweise mit Guanin paaren und durch die hydrolytische Desaminierung von 5-Methylcytosin bzw. Cytosin entstanden sind, sowie andere durch Entzündungsprozesse oder Chemotherapien chemisch veränderte Basen wie etwa 5-Chloruracil, 5-Fluorouracil (5-FU) oder 5-Joddesoxyuracil [109]. Rodrigues et al. konnten bei einem Patienten mit ungewöhnlich gutem Ansprechen auf die Therapie mit dem *Programmed cell death 1* (*PD-1*)-Inhibitor Pembrolizumab eine Keimbahnmutation im Gen *MBD4* detektieren [110]. Bei diesem Patienten war das zweite Allel in den *UM*-Zellen durch eine Monosomie 3 verloren gegangen [110]. Interessanterweise wiesen die untersuchten Tumorproben aus dem Primärtumor und einigen Metastasen deutlich mehr Mutationen auf als es bei *UM* normalerweise zu erwarten wäre [110]. Bei über 90 % der Mutationen handelte es sich dabei um CpG>TpG-Transitionen, die typisch für eine spontane Desaminierung von 5-Methylcytosinen sind [110]. Bei der Analyse eines TCGA-Datensatzes mit RNA-Sequenzierungsdaten von 80 *UM*-Patienten stießen die Forscher auf einen weiteren Patienten mit *MBD4*-Mutation und ebenfalls einer deutlich erhöhten Anzahl an *single nucleotide variants* (*SNV*) im Vergleich zu den übrigen Patienten des Datensatzes [110]. Später wurde ein weiterer Fall einer *UM*-Patientin mit *MBD4*-Keimbahnmutation publiziert, bei der die Therapie mit Pembrolizumab initial zu einer Stabilisierung der Erkrankung führte und die insgesamt erst zwei Jahre nach Entdeckung der

ersten Metastasen und einer weiteren Therapie mit dem anti-*Cytotoxic T-lymphocyte associated protein 4* (CTLA-4)-Antikörper Ipilimumab verstarb [111]. Auch diese Patientin hatte eine Monosomie 3 und eine hohe TMB [111]. Die hohe Mutationslast wurde auch von Rodrigues et al. in einem weiteren Kollektiv aus 75 Metastasen und 16 Primärtumoren von 25 Patienten beschrieben; die Forscher konnten hier in den Tumoren mit *MBD4*-Mutationen und Monosomie 3 deutlich mehr SNV nachweisen [112]. Die Profile der Kopienzahlveränderungen zwischen *MBD4*-wt und *MBD4*-mutierten Tumoren unterschieden sich nicht [112]. Patienten mit *MBD4*-wt hatten zwischen 5 und 25 SNV in den Exonen der Primärtumoren (Median: 13) und zwischen 5 bis 33 SNV in den Metastasen (Median: 16), wohingegen die *MBD4*-mutierten-Tumoren zwischen 348 und 706 SNV in den Primärtumoren und zwischen 266 und 652 SNV in den Metastasen aufwiesen [112]. Die Tumoren mit *MBD4*-Mutation zeigten außerdem eine ausgeprägtere Heterogenität zwischen Primärtumor und Metastasen [112]. In allen publizierten Fällen kamen *MBD4*-Mutationen zusammen mit anderen bekannten Mutationen wie *GNAQ*, *GNA11* oder *BAP1* vor [110-112]. Die Häufigkeit von *MBD4*-Mutationen im UM beträgt etwa 0,7 % [19] bis 3,6 % [20]. Im Gegensatz zu den *GNAQ*- und *GNA11*-Mutationen scheint es im *MBD4*-Gen ebenfalls keine Mutationshotspots zu geben [19, 20]. Keimbahnmutationen des Gens *MBD4*, die zum Verlust der Proteinfunktion führen, wurden auch bei Patienten mit UM gefunden [19, 20]. Es ist jedoch umstritten, ob *MBD4*-Mutationen überhaupt als prädisponierend für das UM angesehen werden können oder nicht [20]. Derrien et al. postulierten, dass *MBD4* ein prädisponierendes Gen sein könnte basierend auf der Annahme, dass für *MBD4*-Mutationen ein RR von 9,15 (95% CI 4,24 – 19,73) für die Entwicklung eines UM errechnet wurde [19]. Allerdings trat weder eine familiäre Häufung von UM, noch bilaterale UM oder UM in einem jüngeren Lebensalter bei Patienten mit *MBD4*-Keimbahnmutation auf, wie es sonst häufig bei Tumorprädispositionssyndromen der Fall ist [19].

1.1.3.3 Chromosomale Aberrationen

Strukturelle Varianten kommen im UM deutlich seltener als in anderen Melanomsubtypen vor und entsprechen nur etwa 40 % der Häufigkeit des KM, 20 % des ALM und 10 % des MUM [47]. Es gibt jedoch eine Reihe an wiederkehrenden chromosomalen Aberrationen. Diese umfassen die Monosomie 3 [47, 75, 113] bei 53 % [48] bis 57 % der UM-Patienten [46, 66], den Verlust von Chr. 1p [46, 47, 75] bei ca. 24 % [114], den Verlust von Chr. 6q [46, 47, 113] bei ca. 28 % [114], Verlust von Chr. 8p [46, 47, 66] sowie den Verlust von Chr. 16q [46, 47, 66] bei 16% [114]. Ein Zugewinn von Chr. 6p [46, 47, 75, 113] kommt bei 18 % [114] und ein Zugewinn von Chr.8q [46, 47, 66, 75, 113] bei 53 % [114] der Patienten vor. Seltener wurden auch andere Varianten wie etwa ein Zugewinn von Chr. 11 [47] oder der Verlust des X-Chromosoms [66] beschrieben. Die Häufigkeiten der chromosomalen Aberrationen unterscheiden sich je nachdem, ob es sich um einen nicht-metastasierenden Primärtumor, einen metastasierenden Primärtumor oder um Metastasen handelt (Tabelle 1) [115].

Tabelle 1: Chromosomale Veränderungen im Uveamelanom in nicht-metastasierenden und metastasierenden Primärtumoren sowie Metastasen [115]

Chromosomale Veränderung	Nicht-metastasierende Primärtumoren	Metastasierende Primärtumoren	Metastasen
Monosomie 3	21 %	73 %	67 %
Verlust Chr. 1p	0 %	33 %	33 %
Verlust Chr. 6q	7 %	40 %	83 %
Verlust Chr. 8p	14 %	27 %	0 %
Verlust Chr. 13q	14 %	13 %	50 %
Verlust Chr. 18	7 %	13 %	33 %
Zugewinn Chr. 1q	0 %	7 %	33 %
Zugewinn Chr. 6p	29 %	20 %	17 %
Zugewinn Chr 8q	14 %	53 %	100 %
Zugewinn Chr. 16p	0 %	7 %	33 %

1.1.3.4 Einteilung nach Gensignaturen

Trotz der vergleichsweise geringen Anzahl an genetischen Veränderungen wurden zahlreiche Versuche unternommen, UM anhand ihres Mutationsprofils in Klassen zu unterteilen und mit der Prognose zu korrelieren. Onken et al. untersuchten hierfür 25 zuvor unbehandelte UM-Primärtumoren mittels sondenbasierten *high-density* Oligonukleotid-Arrays und fanden heraus, dass sich die Tumoren zu zwei unterschiedlichen molekularen Klassen zuordnen ließen [116]. In Tumoren der Klasse 1 (niedriges Risiko) waren histologisch mehr gut differenzierte spindelförmige Zellen zu sehen und auf chromosomaler Ebene war ein Zugewinn von Chr. 6p detektierbar [116]. In Klasse 2 (hohes Risiko) waren auf Chr. 3 lokalisierte Gene herab- und auf Chr. 8q lokalisierte Gene hochreguliert, zudem waren histologisch mehr schlecht differenzierte, epitheloide Zellen zu sehen und auf chromosomaler Ebene ein Verlust von Chr. 3 zu beobachten [116]. Tumoren mit einem Verlust von Chr. 6q und ein Zugewinn von Chr. 8q waren nicht eindeutig einer molekularen Klasse zuzuordnen [116]. Patienten mit Tumoren der Klasse 1 hatten eine 92-Monats-Überlebenswahrscheinlichkeit von 95 %, Patienten mit Tumoren der Klasse 2 nur von 31 % ($p = 0,01$) [116]. Interessanterweise genügte eine Analyse der Genexpression der drei Gene *Pleckstrin Homology Like Domain Family A Member 1* (*PHLDA1*), *Frizzled Class Receptor 6* (*FZD6*) und *Ectonucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase 2* (*ENPP2*), um anhand dieser die Tumoren zuverlässig einer der beiden molekularen Klassen zuordnen zu können [116]. Die Vorhersage des Überlebens anhand der molekularen Klasse war insgesamt zuverlässiger als Vorhersagen, die anhand pathologischer, zellmorphologischer oder klinischer Faktoren

wie etwa der Tumorlokalisation oder des Tumordurchmessers getroffen wurden [116]. Weitere molekularbiologische Analysen von Klasse 2-Tumoren zeigten, dass in diesen Tumoren Gene für die Melaninbiosynthese wie *DCT* und *TYR* sowie Gene der Neuralleistenspezifikation inklusive Regulatoren des Wnt-Signalweges wie *Catenin Beta 1* (*CTNNB1*) und *Endothelin Receptor Type B* (*EDNRB*) herabreguliert waren [117]. Dahingegen waren epitheliale Gene wie *Epithelial Membrane Protein 1* (*EMP1*) und *Epithelial Membrane Protein 3* (*EMP3*) sowie Zelladhäsionsmoleküle wie *Cadherin 1* (*CDH1*) und Gene sowie die für die Interaktion mit der Basalmembran wichtige Gene *Microtubule Actin Crosslinking Factor 1* (*MACF1*) und *Secreted Protein Acidic And Cysteine Rich* (*SPARC*) hochreguliert [117]. Dies erklärt auch die epitheloide Morphologie der Klasse 2-Tumoren [117].

Die Weiterentwicklung der Sequenziertechniken ermöglichte es später, noch detailliertere Einblicke in die molekulare Landschaft des UM zu gewinnen. Royer-Bertrand et al. sequenzierten 24 Primärtumoren und neun Lebermetastasen sowie entsprechende Normalgewebe mittels Hochdurchsatz-*whole genome*-Sequenzierung und konnten vier molekulare Subgruppen identifizieren [49]. Tumoren der Klasse A und B wiesen eine Monosomie 3 auf sowie Verluste von Chr. 8p auf, bei Tumoren der Klasse B kamen auch Verluste von Chr. 6q vor [49]. Für Klasse A-Tumoren war darüber hinaus ein Verlust von Chr. 1p charakteristisch [49]. Die Tumoren in Klasse C wiesen kaum chromosomale Aberrationen auf und in Klasse D traten Hinzugewinne des distalen Teils von Chr. 8q auf [49]. Bei 77 % der Tumoren mit Monosomie 3 traten auch somatische Mutationen in *BAP1* auf [49]. Während *GNAQ*- oder *GNA11*-Mutationen in allen untersuchten Proben gefunden wurden, wurden *SF3B1*- und *EIF1AX*-Mutationen vor allem in Tumoren der Klassen C und D gefunden und *SF3B1*-Mutationen vor allem in Klasse D [49]. Interessanterweise fanden die Forscher keine signifikanten Unterschiede zwischen Primärtumoren und Metastasen [49].

Robertson et. al. analysierten einen noch größeren Datensatz basierend auf ausgedehnten molekularbiologischen Analysen von 80 UM-Primärtumoren der TCGA-Datenbank [75]. Ähnlich wie Royer-Bertrand et al. konnten auch sie die Tumoren in vier molekulare Gruppen einteilen [75]. Cluster 1 und 2 enthielten Tumoren mit Disomie 3 und höherer *BAP1*-Genexpression, Cluster 3 und 4 Tumoren mit Monosomie 3, *BAP1*-Mutationen und verringerter *BAP1*-Genexpression [75]. Die Tumoren in Cluster 1 waren durch die wenigsten chromosomalen Aberrationen sowie durch einen partiellen oder vollständigen Zugewinn von Chr. 6p charakterisiert; zudem traten auch nur in diesem Cluster *EIF1AX*-Mutationen auf [75]. In Cluster 2 wurde ein Zugewinn von Chr. 6p und ein partieller Zugewinn von Chr. 8q beobachtet sowie Mutationen in *SF3B1*; in Cluster 3 traten Zugewinne von Chr. 8q auf und in Tumoren des Clusters 4 wurde das Isochromsom 8q (= Chr. 8 mit 2 q-Armen) detektiert [75].

Field et al. fanden bei einer weiteren Analyse von *whole exome sequencing*-Daten von 139 Primärtumoren eine Mutationssignatur, die mit der Alterung assoziiert ist und auch die Hotspot-Mutationen in *GNAQ*, *GNA11* und *SF3B1* im Codon 625 erklärt [84]. Darüber hinaus wurde eine Signatur, die mit DNA-Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies

(ROS) assoziiert ist sowie eine weitere Mutationssignatur unbekannten Ursprungs entdeckt [84]. UV-Signaturen kamen hingegen nicht vor [46-49, 84].

1.1.3.5 Evolution der genetischen Aberrationen

Aufgrund genetischer Untersuchungen von Tumormaterial aus Primärtumoren und Metastasen konnte gezeigt werden, dass UM die charakteristischen genetischen Aberrationen in verschiedenen Stadien des Krankheitsprogresses akquirieren bzw. diesen unterschiedlich beeinflussen. Die Hotspotmutationen in *GNAQ* und *GNA11* scheinen bereits früh im Verlauf der Erkrankung zu entstehen und damit maßgeblich zur Initiierung des UM beizutragen [71, 76]. Ausführlichere Analysen zur Klonalität von 139 UM-Primärtumoren durch Field et al. zeigten, dass Mutationen in *GNAQ*, *GNA11*, *CYSLTR2* und *PLCB4*, die für Proteine des Gq-Signalweges codieren, bei allen untersuchten Tumoren zu finden waren [84]. Mutationen in diesen Genen sowie in *BAP1*, *EIF1AX* und *SF3B1* und häufig zusammen mit diesen auftretende chromosomale Veränderungen wie etwa die Monosomie 3, ein Zugewinn von Chr. 6p und von Chr. 8q, waren in allen Tumorzellen eines Tumors zu finden [84]. Dies lässt darauf schließen, dass die typischen Treibermutationen bereits sehr früh in der Entwicklung des UM im Primärtumor auftreten und nur wenige weitere im Verlauf der Erkrankung hinzukommen [84]. Der Verlust des Chr. 3 scheint hauptsächlich vor dem Auftreten von *BAP1*-Mutationen zu geschehen; erst danach entstehen weitere Mutationen auf Chr. 3 [75]. Allerdings gibt es dennoch genetische Unterschiede zwischen Metastasen und Primärtumoren. Karlsson et al. sequenzierten sechs subkutane und 26 Lebermetastasen mittels *whole genome sequencing* und führten eine Transkriptomanalyse bei 28 der Metastasen durch und verglichen diese mit den Daten von 80 UM-Primärtumoren des TCGA-Datensatzes [118]. Dabei detektierten die Forscher wie erwartet die gehäuft im UM auftretenden Mutationen in den Genen *GNAQ*, *GNA11*, *CYSLTR2*, *PLCB4*, *SF3B1* und *BAP1*, jedoch nicht in *EIF1AX* [118]. Bei 29 der untersuchten Metastasen (91 %) wurden *BAP1*-Mutationen entdeckt, die in den meisten Fällen zusammen mit einer Monosomie 3 auftraten [118]. Ein Zugewinn von Chr. 8q trat bei allen Metastasen auf und generell häufig zusammen mit einer Monosomie 3 [118]. Insgesamt kamen Amplifikationen oder Verluste einzelner Chromosomenarme signifikant häufiger in den Metastasen im Vergleich zu den Primärtumoren des TCGA-Datensatzes vor [118]. In UM-Metastasen wurden auch Deletionen im Gen *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A)* gefunden, das für die Tumorsuppressorproteine p16^{INK4a} und p14^{ARF} codiert [118]. Der Zugewinn von Chr. 8q scheint erst später in der Entwicklung des UM stattzufinden, da 93 % der Mutationen auf Chr. 8q vor der Verdoppelung entstanden waren [66].

1.1.4 Diagnostik

Die Diagnostik, Behandlung und Nachsorge von UM-Patienten ist im deutschsprachigen Raum sehr heterogen organisiert und wird von verschiedenen Fachdisziplinen durchgeführt, wie eine Befragung aus dem Jahr 2021 zeigte [119]. Dies liegt auch daran, dass es derzeit nur eine von der Arbeitsgemeinschaft Standard Operating Procedures (SOP)

des Netzwerkes der Onkologischen Spitzenzentren Deutschlands veröffentlichte SOP zur Standardisierung der Diagnostik und Behandlung des UM in den klinischen Zentren des Netzwerkes gibt [120]. Eine evidenzbasierte Leitlinie in Deutschland speziell zu dieser Tumorentität existiert noch nicht.

Der Primärtumor des UM verursacht in vielen Fällen keine oder nur geringe Beschwerden, daher wird die Diagnose bei etwa 30 % der Patienten zufällig bei augenärztlichen Untersuchungen ohne vorangehende Symptome gestellt [121]. Falls Symptome auftreten, sind diese häufig unspezifisch: Mit 37,8 % werden am häufigsten verschwommenes Sehen genannt, gefolgt vom Sehen von Lichtblitzen (Photopsie, 8,6 %), Glaskörpertrübungen (*floaters*) (7,0 %), Gesichtsfeldeinschränkungen (6,1 %) oder Schmerzen (2,4 %) [121]. Ein mit bloßem Auge sichtbarer Tumor tritt nur bei etwa 3 % der Patienten auf [121]. Besteht der Verdacht auf ein UM, soll eine weiterführende Diagnostik durchgeführt werden, die im Idealfall eine augenärztliche sowie allgemeine Anamnese, Bestimmung des Visus und des Augeninnendrucks sowie Biomikroskopie des vorderen Augenabschnittes und des Fundus beinhalten sollte [120]. Zusätzlich dazu kann auch eine optische Kohärenztomographie (OCT), eine OCT-Angiographie oder auch Autofluoreszenzanalyse durchgeführt werden [120]. Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung sollte die Behandlung in einem spezialisierten Zentrum durchgeführt werden [120]. Zur Diagnosesicherung bei unklaren Befunden bzw. für genetische Analysen kann eine Biopsie des Tumors durchgeführt werden, allerdings muss diese gegen potenzielle Risiken abgewogen werden [120, 122, 123]. Die Glaskörperblutung ist mit 96,5 % die mit Abstand häufigste Komplikation nach transvitrealer Biopsie, bildet sich aber bei den meisten Patienten (86,6 %) innerhalb von 2 Jahren wieder spontan zurück [123]. Eine Netzhautablösung wird bei etwa 17 % der Patienten nach Biopsie beobachtet [123]. Die Ausbreitung der Tumorzellen im Auge nach der Biopsierung scheint dagegen kaum aufzutreten [123]. Histologisch können UM-Tumoren aus spindelartigen (Grad G1), epitheloiden Zellen (Grad G3) oder einem Mix aus beiden Morphologien bestehen (Grad G2), wobei größere Tumoren eher epitheloide Zellen beinhalten und mit einer schlechteren Prognose assoziiert sind [124, 125]. UM können darüber hinaus sowohl pigmentiert (melanotisch) als auch unpigmentiert (amelanotisch) sein [124].

Für die weitere Therapieplanung ist ein Staging essenziell, um möglicherweise vorhandene Fernmetastasen frühzeitig zu entdecken [120]. Dazu wird zusätzlich zu den oben beschriebenen Untersuchungen eine Oberbauchsonografie durchgeführt, um potenzielle Lebermetastasen zu detektieren, sowie ggf. eine weitergreifende Bildgebung und eine Bestimmung der Laktatdehydrogenase (LDH), des Tumormarkers S100 und der Leberfunktionswerte im Serum [120]. Die Einteilung in die Stadien erfolgt nach der 8. Version des *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) Staging Manuals [120, 125]. Das Stadium I bezeichnet dabei Tumoren der TNM-Klassifikation T0N0M0 (Tumorbasis ≤ 9 mm plus Tumordicke ≤ 6 mm bzw. Tumorbasis zwischen 9 und 12 mm plus Tumordicke ≤ 3 mm, keine Lymphknoten- oder Fernmetastasen), während größere Tumoren je nach Dicke, Ausmaß der Ziliarkörperbeteiligung und extraokulären Ausdeh-

nung den Stadien II und III zugeteilt werden [125]. Patienten mit regionalen Lymphknoten- oder mit Fernmetastasen werden dem Stadium IV zugerechnet [125]. Bei einem klinischen Verdacht auf Metastasen erfolgt eine weitergebende Diagnostik wie eine Computertomographie des Thorax und Abdomen und eine Magnetresonanztomographie [120].

1.1.5 Therapieoptionen

1.1.5.1 Therapie des Primärtumors

Der Primärtumor kann in der Regel durch lokale Verfahren gut therapiert werden. Kleine Tumoren bis zu einer Größe von 6 mm werden vor allem augenerhaltend durch eine lokale Bestrahlung (Brachytherapie) mittels Ruthenium-106- (^{106}Ru) Applikator oder Protonenstrahlen behandelt [120]. ^{106}Ru emittiert β -Strahlung und hat eine deutlich geringere Eindringtiefe als etwa der γ -Strahler Jod-125 (^{125}I), was zwar den Einsatz auf kleine Tumoren begrenzt, allerdings werden dadurch weniger strahlenbedingte Schäden an benachbarten Strukturen wie der Retina oder dem Sehnerv verursacht [126, 127]. Durch die ^{106}Ru -Applikation kann eine gute lokale 5-Jahres-Tumorkontrolle bei mehr als 80 % der Patienten erreicht werden [127]. Je nach Lage des Tumors kann aber auch primär eine Protonentherapie indiziert sein wie etwa bei juxtapapillärer, zentraler Lage [120]. Bei größeren Tumoren kommt ebenfalls eine Protonenbestrahlung infrage, die ggf. mit einer adjuvanten Tumorresektion kombiniert werden kann [120]. In zweiter Linie werden auch Brachytherapien mit ^{125}I -Applikation durchgeführt [120]. Eine weitere Behandlungsmöglichkeit von Tumoren ohne extraokuläre Beteiligung stellt die stereotaktische Bestrahlung dar [120]. Diese kann mit einem Bestrahlungsroboter wie z.B. CyberKnife® erfolgreich mit minimalen NW für den Patienten durchgeführt werden [128, 129]. Durch diese lokalen Maßnahmen kann das Auge und im Idealfall die Sehfähigkeit erhalten werden, allerdings kann es neben den bereits erwähnten strahlenbedingten Schäden an der Retina auch insbesondere bei der Bestrahlung von großen Tumoren zur Ausbildung eines toxischen Tumorsyndroms kommen [130]. Hierbei kommt es zu einer fortschreitenden Ablösung der Retina und einem Glaukom infolge der Anhäufung von Zerfallsprodukten des Tumors [130]. Bei großen Tumoren und extraorbitaler Beteiligung wird das Auge im Rahmen einer Enukleation chirurgisch entfernt, bei sehr ausgedehnten Befunden werden auch die benachbarten Strukturen der Orbita mit entfernt (Exenteration) [120, 131]. Die multizentrische randomisierte Collaborative Ocular Melanoma Study mit 1.317 UMPatienten konnte keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Überlebens von UMPatienten mit ^{125}I -Brachytherapie im Vergleich mit Patienten feststellen, die eine Enukleation erhalten hatten (12-Jahres-Mortalität 43 % vs. 41 %) [132]. Bei sehr kleinen Tumoren im vorderen Augenabschnitt wie etwa bei Irismelanomen kann auch eine Exzision des Tumors mit Erhalt des Auges durchgeführt werden [131]. Im Falle eines Lokalrezidivs kommen Verfahren wie die adjuvante transpupilläre Thermotherapie, Brachytherapie, Teletherapie oder die Enukleation zum Einsatz [120].

1.1.5.2 Therapie im metastasierten Stadium

Trotz guter lokaler Tumorkontrolle entwickeln etwa die Hälfte aller UM-Patienten Fernmetastasen, welche zu mehr als 90 % in der Leber auftreten und daher eine Besonderheit des UM darstellen [133-136]. Bei etwa 55 % aller Patienten mit Metastasen treten ausschließlich Lebermetastasen auf [133]. Außerhalb der Leber können sich Metastasen aber auch in anderen Organsystemen wie der Lunge (16 % bis 31 %), dem Gehirn (5 % bis 6 %), den Knochen inklusiver der Wirbelkörper (9 % bis 23 %), kutan/subkutan (4 % bis 17 %) oder in Lymphknoten (10 % bis 14 %) ansiedeln [133, 134, 136]. Metastasen treten bei der Mehrzahl der Patienten innerhalb der ersten fünf Jahre nach der Erstdiagnose auf [133, 135]. Es gibt jedoch auch Berichte über eine Metastasierung noch nach langen Zeiträumen von mehr als 30 bis 40 Jahren [133, 135]. Die Ursachen für den ausgeprägten Hepatotropismus des UM sind noch nicht vollständig verstanden, es wird aber diskutiert, dass das Mikromilieu der Leber mit der Expression von zahlreichen Wachstumsfaktoren [137], der langsame Blutfluss in der Leber und die Expression von Adhäsionsmolekülen auf den Sinusendothelzellen [138] die Etablierung und das Wachstum von Metastasen begünstigen [139, 140]. Darüber hinaus profitieren die Tumorzellen vom dort herrschenden immunsuppressiven Mikromilieu, um sich der Kontrolle durch das Immunsystem zu entziehen [139, 140]. Aufgrund dieser besonderen Ausgangssituation werden häufig leberspezifische Therapieverfahren bei Patienten mit metastasiertem UM angewendet. In Deutschland, Österreich und der Schweiz werden diesbezüglich am häufigsten die selektive interne Radiotherapie (SIRT, in 80 % der befragten zertifizierten Hautkrebszentren), Radiofrequenzablation (RFA, 59 %), trans-arterielle Chemoembolisation (TACE, 56 %) sowie die stereotaktische Bestrahlung (50 %) angeboten [119].

1.1.5.2.1 Leberspezifische Therapieverfahren

Einzelne, klar abgegrenzte Metastasen können chirurgisch entfernt werden, wenn nach der Resektion noch 30 % bis 40 % funktionsfähiges Lebergewebe verbleibt [141]. Das mediane Gesamtüberleben (OS) lässt sich so von 8 Monaten auf 14 Monate verlängern und resultiert in einer 1-Jahres-OS-Rate von 56,7 % bzw. einem 5-Jahres-OS von 7,0 % [141]. Bei freien Resektionsrändern beträgt das mediane OS 27 Monate, bei R1-Resektion beträgt das mediane OS noch 17 Monate und nach R2-Resektion (makroskopisch erkennbar keine tumorfreien Schnittränder) 11 Monate [141]. Prognostisch günstige Faktoren, die mit einem besseren 2-Jahres-OS einhergehen, sind eine R0-Resektion, weniger als vier Lebermetastasen, nur ein betroffener Leberlappen, keine disseminierten Lebermetastasen sowie ein krankheitsfreies Intervall zwischen der Diagnose des Primärtumors und der Metastasen von mehr als 24 Monaten [141].

Bei der SIRT oder Radioembolisation werden über einen Katheter 20 bis 60 µm große Mikropartikel (Mikrosphären) aus Glas oder Harz, die mit dem β -Strahler Yttrium-90 beladen wurden, in die zur Metastase führenden Äste der Leberarterie eingebracht [142]. Die Mikrosphären verbleiben dann in den Kapillaren des Tumors und bestrahlen ihn von innen heraus, wodurch gesundes Leberparenchym im Gegensatz zu einer von außen erfolgenden Bestrahlung geschont wird [142]. Das mediane OS nach SIRT beträgt laut

einer systematischen Übersichtsarbeit von Alexander et al. 12,3 Monate, das mediane hepatische progressionsfreie Überleben (PFS) 5,4 Monate [143]. Die Krankheitskontrollrate (DCR) beträgt 67,5 % [143]. Die SIRT führt häufig zu NW wie Fatigue, Übelkeit, Erbrechen und abdominellen Schmerzen im Schweregrad 1 bis 2, seltener werden auch schwerwiegendere NW vom Grad 3 und 4 wie Leberversagen, strahlenbedingte Cholezystitis, Magenulzera oder Schmerzen berichtet [143].

Die RFA eignet sich zur Therapie einzelner Lebermetastasen bis etwa 3 cm Durchmesser [144]. Bei diesem Verfahren werden eine oder mehrere nadelartige Elektroden unter bildgebender Kontrolle durch die Haut in den Tumor gestochen und Strom appliziert, wodurch es zu einer lokalen Erhitzung des Gewebes auf etwa 60°C und anschließenden Nekrose des Tumors kommt [144, 145]. Die RFA kann auch intraoperativ mit einer Metastasektomie kombiniert werden [145, 146]. Das mediane OS dieser Kombinationstherapie ähnelt dem nach alleiniger Resektion (28 vs. 27 Monate); allerdings kann durch die RFA mehr gesundes Lebergewebe bewahrt und so können auch Patienten behandelt werden, bei denen eine chirurgische Entfernung der Metastasen sonst nicht möglich wäre [145]. Darüber hinaus wird die RFA auch zur Behandlung von rezidivierenden Lebermetastasen nach einer chirurgischen Entfernung eingesetzt [146]. Nach RFA betragen die 2-Jahres- und 4-Jahres-OS-Raten 68 % bzw. 45 % [146]. Das 1-, 2-, 3- und 4-Jahres-rezidivfreie Überleben (RFS) nach RFA beträgt 71 %, 56 %, 37 % bzw. 19 % [146].

Die TACE ist ein lokales Chemotherapieverfahren, bei dem beispielsweise Doxorubicin, Mitomycin C, Cisplatin, Irinotecan oder 5-FU mit einem Embolisat (Öl, Sphären, Gelatineschwämmchen oder Polyvinylalkoholpartikel) vermischt und über einen Katheter direkt in die zu den Metastasen führenden Leberarterien infundiert wird [147]. Der Vorteil hierbei ist, dass durch die lokale Begrenzung der Behandlung einerseits eine höhere Dosierung appliziert werden kann und andererseits durch den Verschluss der zuführenden Gefäße durch das Embolisat die Blutversorgung des Tumors beeinträchtigt wird, wodurch es zu ischämischen Schäden und einer Nekrose des Gewebes kommt [147]. Generell wird die TACE relativ gut vertragen [148, 149]. Als NW der Therapie können ein Postembolisierungssyndrom mit Fieber, Übelkeit und Schmerzen auftreten, selten auch ein Leberversagen sowie systemische Folgen wie eine Veränderung des Hautkolorits, Mukositis oder eine Knochenmarksdepression [147, 149]. Das mediane OS liegt zwischen 5 Monaten [149] und 21 Monaten [148]. Die Ansprechraten liegen zwischen 16 % [149, 150] und 57 % [151], die DCR bei 72 % [149, 150].

Bei den isolierten Perfusionstherapien wird der hepatische Kreislauf vom restlichen Blutkreislauf abgekoppelt und anschließend nur die Leber mit dem Chemotherapeutikum Melphalan perfundiert, um die systemische Toxizität zu verringern [152, 153]. Im Rahmen der isolierten hepatischen Perfusion (IHP) werden in einer offenen Operation die Leber und alle zu- und abführenden Gefäße freipräpariert, vom restlichen Körperkreislauf durch Ligaturen abgekoppelt und ein venovenöser Bypass von der V. saphena zur rechten V. axillaris angelegt, bevor die Leber mit dem Chemotherapeutikum Melphalan

perfundiert wird [152]. Die perkutane hepatische Perfusion (PHP) funktioniert nach einem ähnlichen Prinzip, allerdings werden die Gefäße nicht in einer offenen Operation abgeklemmt, sondern minimalinvasiv ein spezieller Doppel-Ballon-Katheter in die V. cava inferior zur Abkopplung des Leberkreislaufes vom Körperkreislauf eingebracht [152]. Der Zufluss der Perfusionsflüssigkeit erfolgt über einen Katheter, der über die Oberschenkelarterie bis in die A. hepatis communis eingeführt wird, der Abfluss über den im Mittelteil fenestrierten Doppel-Ballon-Katheter in der V. cava inferior [152]. Im Perfusionskreislauf läuft das aus der Leber kommende Blut durch Kohlefilter, die das Chemotherapeutikum herausfiltern, bevor es über die V. jugularis interna wieder in den Blutkreislauf zurückgeführt wird [152]. Der Vorteil der PHP ist, dass sie als minimalinvasiver Eingriff weniger belastend für den Patienten ist und im Gegensatz zur IHP mehrere Male wiederholt werden kann, weil für die PHP keine ausgedehnte Operation durchgeführt werden muss [152, 153]. Die Ansprechraten mit IHP liegen zwischen 37,5 % und 66 %, die der PHP liegen bei 34 % bis 50 % [153-156]. Das mediane PFS nach IHP beträgt 8,0 Monate (Bereich 6,0 bis 13,9 Monate) und 7,6 Monate (Bereich 6,0 bis 14,3 Monate) nach PHP, das mediane OS liegt bei 12,1 Monaten (Bereich 10,0 bis 22,4) nach IHP und 15,3 Monate (Bereich 12,0 bis 19,1 Monate) nach PHP [153, 156-158]. Allerdings kommt es nach der IHP deutlich häufiger als nach der PHP zu schweren postoperativen Komplikationen oder zum Leberversagen bis hin zum behandlungsbedingten Tod bei bis zu 27 % der Patienten nach IHP [153, 158, 159].

Die intraarterielle Chemotherapie (auch hepatische (intra-)arterielle Infusionstherapie, HAI) bezeichnet ein Verfahren, bei dem das Chemotherapeutikum Fotemustin direkt in die A. hepatica appliziert wird [160]. Über diese Arterie werden in der Regel die Metastasen versorgt, während die Versorgung des Leberparenchyms überwiegend über die Portalvene erfolgt [160]. Im Vergleich zur intravenösen (i.v.) Applikation von Fotemustin konnte in der prospektiven, randomisierten und kontrollierten Phase-3-Studie EORTC 18021 kein Überlebensvorteil mit der HAI erzielt werden (Hazard Ratio (HR) 1,09; 95 % CI 0,79 – 1,50) [160]. Das mediane OS lag nach HAI bei 14,6 bis 15 Monaten und nach Fotemustin i.v. bei 13,8 Monaten [160, 161]. Das mediane PFS lag mit HAI bei 4,5 Monaten und war signifikant besser als mit Fotemustin i.v. (3,7 Monate) [160, 161]. Die 1-, 2- und 3-Jahres-OS-Raten mit HAI liegen bei 67 %, 29 % bzw. 12 % [161]. Die Ansprechraten für die HAI liegen bei 10,5 % und mit Fotemustin i.v. bei 2,4 % [160]. Eine andere Publikation berichtet von Ansprechraten von 36 % nach HAI [161]. Im Vergleich zur i.v. Chemotherapie kommt es bei der HAI seltener zu hämatologischen NW wie etwa Thrombozytopenien oder einer febrilen Neutropenie [160]. Bei fast einem Drittel der HAI-Patienten treten katheterbedingte Komplikationen wie etwa Fehlperfusionen, Stenosen oder Thrombosen auf [160]. Weitere NW umfassen Bauchschmerzen, Magengeschwüre oder Übelkeit und Erbrechen [160, 162]. Bei adjuvanter Anwendung der HAI nach Protonenbestrahlung konnte ein medianes OS von 9 Jahren im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 7,4 Jahren erreicht werden sowie ein 5-Jahres-OS von 75 % bzw. 56 % [162]. In diesem Setting berichteten die Autoren über einen hohen Anteil an hepatischen NW der

Schweregrade 3 bis 4, darunter Erhöhungen der Transaminase, gamma-Glutamyltransferase, alkalischen Phosphatase und der Bilirubinkonzentration, die sich nach Ende der Therapie jedoch wieder zurückbildeten [162].

1.1.5.2.2 Systemische Therapien: Immuncheckpoint-Blockade und zielgerichtete Therapien

Die Immuncheckpoint-Blockade (ICB) mit Antikörpern gegen CTLA-4 (Ipilimumab) bzw. PD-1 (Nivolumab, Pembrolizumab) hat im KM zu spektakulären Erfolgen und langen Ansprechdauern geführt und wurde daher auch mit großer Hoffnung im fortgeschrittenen UM eingesetzt [163-166]. Eine systematische Übersichtsarbeit von Heppt et al. zeigt aber, dass die ICB im UM nur bei sehr wenigen Patienten wirksam ist [167]. Die Ansprechraten mit Ipilimumab lagen zwischen 0 % und 6,5 % mit einem medianen PFS von weniger als 3 Monaten und einem medianen OS zwischen 5,2 bis 9,8 Monaten [167]. Für die Therapie mit Nivolumab wurden Ansprechraten zwischen 0 % und 25 % und mit Pembrolizumab zwischen 0 % und 37 % berichtet, allerdings waren die Fallzahlen in den Studien teilweise sehr gering und randomisierte kontrollierte Studien fehlen [168-170]. Die Kombination von Ipilimumab und Nivolumab erzielte Ansprechraten von 3 % bis 17 % und längere OS als die jeweiligen Monotherapien, allerdings kam es bei einem deutlich größeren Teil der Patienten zu stärkeren NW [168]. Es wird vermutet, dass die schlechten Ansprechraten unter anderem auf die sehr geringe TMB des UM und die damit einhergehende geringere Anzahl an Neoantigenen zurückgeht [46, 48, 66]. Hierfür spricht auch, dass UM mit Mutationen im *MBD4*-Gen, welche eine höhere TMB haben, häufiger ein Ansprechen auf ICB zeigten [110, 111]. Außerdem war die *Programmed cell death ligand 1* (PD-L1)-Expression der Tumorzellen bzw. PD-1-Expression der tumorinfiltrierenden Lymphozyten in UM-Metastasen im Vergleich zu KM-Metastasen geringer, was ein weiterer Grund für die schlechteren Ansprechraten auf die anti-PD-1-Immuntherapien darstellen könnte [171]. Generell scheinen Lebermetastasen von Melanomen schlechter auf ICB anzusprechen als extrahepatische Metastasen [172]. In einer retrospektiven Analyse von Koch et al. zur dualen ICB erreichten UM-Patienten mit ausschließlichen Lebermetastasen ein geringeres medianes OS als Patienten, die zusätzlich extrahepatische Metastasen hatten (6,1 vs. 18,2 Monate) [173]. Die Ansprechraten der Patienten mit ausschließlich hepatischen Metastasen waren ebenfalls tendenziell geringer (8,7 % vs. 16,7 %, $p = 0,45$), der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant [173]. Als Gründe hierfür werden von den Autoren unter anderem das spezielle immunsuppressive Milieu der Leber diskutiert [173].

Die im UM häufig vorkommenden Mutationen in *GNAQ* und *GNA11* führen zu einer konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signalweges, weshalb spekuliert wurde, dass eine zielgerichtete Therapie mit MEK-Inhibitoren (MEKi) wirksam sein könnte [46, 48, 71, 73, 76, 78]. Allerdings waren die Ansprechraten in den entsprechenden Studien, darunter auch die doppelverblindete Phase-3-Studie SUMIT mit dem MEKi Selumetinib [174], nur sehr gering und lagen zwischen 0 % und 14 %, das mediane PFS zwischen 3 und 16 Wochen und das mediane OS zwischen 9,1 und 11,8 Monaten [175]. Auch Kombinationen verschiedener MEKi mit weiteren zielgerichteten Inhibitoren wie etwa dem PKC-Inhibitor

Sotrastaurin (AEB071) [176] oder dem Akt-Inhibitor Uprosertib [177] führten zu keiner signifikanten Verbesserung des PFS und der Ansprechraten, aber teils erheblichen NW. Aufgrund der limitierten Ergebnisse der systemischen Therapien empfiehlt die Arbeitsgemeinschaft SOP zur Behandlung des UM eine frühzeitige palliativmedizinische und psychoonkologische Betreuung der Patienten [120].

Trotz der enttäuschenden Ergebnisse aus den Studien zur ICB wird an weiteren immunologischen Behandlungsansätzen gearbeitet. Einen neuen, vielversprechenden Ansatz für die systemische Therapie des UM stellt das bispezifische Molekül Tebentafusp dar [178], das seit April 2022 in der EU zur Behandlung des nicht-resezierbaren oder metastasierten UM bei Patienten mit dem HLA-Typ A*02:01 zugelassen ist [179]. Dabei handelt es sich um eine löslichen T-Zell-Rezeptor (TCR), welcher mit einem Anti-CD3-Effektor gekoppelt ist und die Peptidsequenz YLEPGPVTA des Oberflächenproteins gp100 erkennt, welches von MHC Klasse I-Molekülen auf UM-Zellen präsentiert wird [180]. Aufgrund des TCR-Anteils von Tebentafusp wirkt es aber nur bei Patienten mit dem HLA-A-Subtyp A*02:01, der als häufigster HLA-A-Subtyp bei mehr als 20 % der Europäer und etwa 28,8 % der deutschen Bevölkerung vorliegt [181, 182]. Durch Tebentafusp werden T-Zellen zu den Tumorzellen geleitet und aktiviert, wodurch eine Antitumor-Immunantwort ausgelöst wird [180, 183]. In einer Phase-3-Studie (NCT03070392) mit 378 zuvor unbehandelten metastasierten UM-Patienten lag das 1-Jahres-OS mit Tebentafusp bei 73 % (95 % CI 66 - 79) und das der Kontrollgruppe bei 59 % (95% CI 48 - 67) lag [178]. Eine kürzlich durchgeführte Phase-2-Studie mit 127 Patienten mit vortherapiertem, fortgeschrittenem UM (NCT02570308) konnte zeigen, dass Tebentafusp das OS der Patienten im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche Pembrolizumab, Ipilimumab oder Dacarbazin erhielt, auch bei therapierefraktären Patienten signifikant verlängerte [184]. Darüber hinaus werden derzeit auch Studien zur Vakzinierung dendritischer Zellen (DC) mit Tumor-RNA, um eine spezifische Antitumorantwort zu generieren sowie zum autologen T-Zell-Transfer durchgeführt. Bei der DC-Vakzinierung werden reife DC aus isolierten Monozyten des Patienten generiert und mit Tumor-RNA, entsprechenden Peptiden oder einer mRNA, die für ein tumorspezifisches Protein codiert (z.B. gp100) durch Elektroporation beladen und anschließend dem Patienten wieder i.v. verabreicht [185-187]. Die DC-Vakzinierung mit gp100-mRNA konnte in einer Fallserie mit 14 metastasierten UM-Patienten eine tumorspezifische Immunantwort bei 29 % und ein medianes OS von 19,2 Monaten erreichen, ohne dass schwere NW \geq Grad 3 auftraten [186]. Im adjuvanten Setting konnte die Vakzinierung mit DC, die mit TYR- bzw. gp100-mRNA beladen waren, bei UM-Patienten mit Monosomie 3 erfolgreich eine Metastasierung bei 39 % der Patienten verhindern; das mediane DFS lag bei 34,5 Monaten, das mediane OS bei 51,8 Monaten und das 3-Jahres-OS bei 79 % [187]. Beim autologen T-Zell-Transfer werden tumorinfiltrierende Lymphozyten aus reseziertem Metastasengewebe isoliert, *in vitro* expandiert und dem Patienten nach dem Erhalt einer lymphodepletierenden Chemotherapie wieder infundiert [188]. Die Ansprechraten liegen bei diesem Verfahren bei 35 %, Grad 3-NW traten als Folge der Chemotherapie

auf und umfassten Lympho-, Neutro- und Thrombozytopenien sowie Anämien und Infektionen [188]. Diese beiden Therapieverfahren sind jedoch sehr aufwendig und teuer, da sie die Aufbereitung der patienteneigenen Zellen in Speziallaboratorien erfordern.

1.1.6 Prognose

Das 1-Jahres-OS des UM liegt bei 95,9 % [5] und die 5-Jahres-OS bei 68,9 % in Europa [5] bzw. 81,6 % in den USA [6]. Das Überleben sinkt jedoch stark mit steigendem Tumorstadium [189]. UM-Patienten im Stadium I haben ein 10-Jahres-melanomspezifisches Überleben von 94 %, während das der Patienten in den Stadien II und III bei 85 % bzw. 61 % liegt [189]. Pro Tumorstadium vergrößert sich die HR für eine Metastasierung um den Faktor 3 [189]. Etwa 50 % der Patienten entwickeln Metastasen trotz erfolgreicher Tumorkontrolle des Primärtumors [135], was sich dramatisch auf das OS auswirkt: Das mediane OS im metastasierten Stadium beträgt nur 1,07 Jahre laut einer Metaanalyse von Rantala et al. [190]. Andere Studien berichten von kürzeren medianen OS von 3,9 Monaten bzw. einem 1-Jahres-OS von 21,2 % sowie einem 3-Jahres-OS von nur 4,3 % [191]. Zu den Risikofaktoren für eine Metastasierung zählen im Stadium I eine höhere Tumordicke und eine breitere Tumorbasis, im Stadium II zusätzlich ein höheres Alter der Patienten, die Pigmentierung des Tumors, eine pilzförmiges Tumorstadium und subretinale Flüssigkeitseinlagerungen und bei Stadium III ein pilzförmiges Tumorstadium, Pigmentierung des Tumors sowie die Lage im unteren Bereich der Choroidea [189]. Ungeachtet der kontinuierlichen Weiterentwicklung der Therapieverfahren hat sich die Dauer des Überlebens von UM-Patienten mit Metastasen in den letzten 40 Jahren kaum verändert [6, 190, 191]. Trotz alledem führt die Behandlung der Metastasen zu einer signifikanten Verbesserung der 1- und 2-Jahres-OS-Raten (mit Behandlung: 30,2 % vs. 5,6 %, ohne Behandlung: 12,2 % vs. 1,1 %, $p < 0,001$) und das mediane OS beträgt 6,3 Monate (Interquartilsabstand (IQR) 2,96- 14,41) für Patienten mit Behandlung der Metastasen vs. 1,7 Monate (IQR 0,66 – 3,5) ohne Behandlung [191]. Interessanterweise scheinen Patienten mit extrahepatischen Metastasen ein besseres Überleben zu haben als Patienten mit Lebermetastasen; nach einem Jahr lag das Überleben bei 52,8 % (extrahepatische Metastasen) gegenüber 18,4 % (hepatische Metastasen) und nach 3 Jahren bei 19,8 % gegenüber 2,9 % [191]. In einer retrospektiven Analyse von Koch et al. erreichten UM-Patienten mit ausschließlich Lebermetastasen unter dualer ICB ein geringeres medianes OS als Patienten, die zusätzlich auch extrahepatische Metastasen hatten (6,1 vs. 18,2 Monate) [173]. Die Ansprechraten der Patienten mit ausschließlich hepatischen Metastasen waren auch tendenziell geringer (8,7 % vs. 16,7 %, $p = 0,45$), der Unterschied war jedoch nicht statistisch signifikant [173].

Die Prognose des UM wird maßgeblich durch die genetischen Veränderungen des Tumors mitbeeinflusst. Die Monosomie 3 ist mit einem hohen Risiko für eine Metastasierung [24, 48], einer höheren Mortalität [75, 192] sowie einem kürzeren RFS assoziiert und ist damit einer der wichtigsten prognostischen Faktoren [46]. *BAP1*-Veränderungen sind ebenfalls mit einem höheren Metastasierungsrisiko assoziiert [24, 193]. Hierbei haben UM-Patienten mit somatischer *BAP1*-Mutation ein signifikant höheres Risiko für die

Entstehung von Metastasen als Patienten mit *BAP1*-Keimbahnmutation (HR 4,81 vs. HR 1,7, $p < 0,0001$) [193]. Laut einer Analyse von Ewens et al. entwickeln 74 % der UM-Patienten mit somatischen *BAP1*-Mutationen, 36 % mit *BAP1*-Keimbahnmutationen und 26 % ohne *BAP1*-Mutationen Metastasen [193]. Die *BAP1*-Genexpression ist in Tumoren mit hohem Metastasierungsrisiko (Klasse 2) signifikant geringer als in solchen mit niedrigerem Metastasierungsrisiko (Klasse 1) [24]. Patienten mit einer höheren mikrovaskulären Dichte zeigten in einer Studie von Brouwer et al. ebenfalls ein schlechteres OS und waren mit Monosomie 3 und einem *BAP1*-Verlust assoziiert [194]. Weitere chromosomale Aberrationen, die mit einer höheren Mortalität assoziiert sind, umfassen den Verlust von Chr. 1p und den Zugewinn von Chr. 8q [192]. Interessanterweise scheint es auch ein Zusammenhang zwischen der Irisfarbe und der Prognose des UM unabhängig von anderen genetischen Risikofaktoren zu geben [195]. UM-Patienten mit grauen oder blauen Augen haben ein signifikant schlechteres OS als Patienten mit grünen oder braunen Augen [195]. Im Gegensatz dazu haben Patienten mit Mutationen in den Genen *SF3B1* [47, 98], *EIF1AX* [48] oder einem Zugewinn von Chr. 6p [192] eine günstigere Prognose. Im Fall von *SF3B1* haben Patienten mit einer Mutation in diesem Gen auch signifikant seltener *BAP1*-Mutationen und eine Monosomie 3, werden der Klasse 2-Gensignatur zugeordnet, haben weniger undifferenzierte, epitheloide Zellen und sind jünger als Patienten mit *SF3B1*-Wildtyp-Tumoren [47, 98]. Möglicherweise könnte auch das Auftreten von immunogenen Neoantigenen, die durch aberrantes Splicing generiert werden und bei etwa 20 % der UM-Patienten mit *SF3B1*-mutierten Tumoren gefunden wurden, die Prognose dieser Patienten mit beeinflussen [99].

1.2 Melanozyten: Ursprung des Uveamelanoms

1.2.1 Allgemeines und Melanogenese

Das UM entwickelt sich wie auch das KM aus Melanozyten, den Pigmentzellen des Körpers [3]. Diese Zellen sind hauptsächlich in der Haut in den unteren Schichten der Epidermis zu finden [196], kommen aber auch in der Choroidea, dem Ziliarkörper und der Iris im Auge [197], im Gehirn in den Leptomeningen [198], dem Locus coeruleus und der Substantia nigra [199], im Innenohr in der Stria vascularis der Cochlea [200] sowie im Herz in den Klappen und im Septum vor [201]. Sowohl kutane als auch uveale Melanozyten produzieren zwei verschiedene Pigmente, das braunschwarze Eumelanin und das rötlich-gelbe Phäomelanin [202-205]. Während Eumelanin einen guten Schutz gegen die UV-Strahlung bietet, ist dieser bei Phäomelanin deutlich weniger ausgeprägt [202, 206]. Beide Pigmente werden im Rahmen der Melaninsynthese (Melanogenese) in einem mehrstufigen, enzymatisch gesteuerten Prozess ausgehend von der Aminosäure Tyrosin synthetisiert und in speziellen Organellen, den Melanosomen, gelagert [207, 208]. Uveale Melanozyten unterscheiden sich von kutanen in einigen Eigenschaften. Kutane Melanozyten geben ihre Melanosomen an die sie umgebenden Keratinozyten ab, damit diese sie sonnenschirmartig über den Zellkern lagern können, um die DNA vor der mutagenen UV-Strahlung zu schützen [202, 207]. Melanozyten der Haut besitzen

dazu mehrere als Dendriten bezeichnete Zellausläufer, die sich zwischen den umliegenden Keratinozyten ausbreiten und so die Verteilung des Melanins an diese erleichtern [207]. Uveale Melanozyten besitzen ebenfalls Dendriten [209], allerdings geben sie ihre Melanosomen nicht an ihre Nachbarzellen ab, sondern behalten diese in ihrem Zellinneren [210]. In der Haut wird die Eumelaninsynthese durch einen sorgsam koordinierten parakrinen Prozess durch UV-Exposition stimuliert [207, 208]. Durch die UV-Strahlung kommt es in den Keratinozyten der Epidermis zu DNA-Schäden und in Folge dessen zur direkten Steigerung der lokalen Proopiomelanocortin (POMC)-Synthese durch die Aktivierung und Bindung des Tumorsuppressorproteins p53 an den *POMC*-Promotor [211]. POMC ist ein Präprohormon, dass neben der Haut auch in anderen Organen wie dem Gehirn gebildet wird und das durch enzymatische Spaltung in verschiedene hormonell aktive Peptide zerlegt wird, darunter die Melanocortine α -, β - und γ -melanozytenstimulierendes Hormon (MSH) und adrenocorticotropes Hormon (ACTH) sowie β -Endorphin [212]. Das hierbei entstehende α -MSH wird von den Keratinozyten sezerniert und bindet auf den benachbarten Melanozyten an den Melanocortin-1-Rezeptor (MC1R) [213, 214]. Hierdurch wird intrazellulär eine Erhöhung der zyklischen AMP (cAMP)-Spiegel und Aktivierung der Proteinkinase A ausgelöst, was zur Phosphorylierung des CRE-bindenden Proteins (CREB) und nach dessen Bindung an das *C-responsive element* (CRE) im Promotor des Transkriptionsfaktors *MITF* dessen Transkription induziert [213, 214]. MITF wiederum stimuliert als Masterregulator der Melanogenese die Transkription zahlreicher Enzyme der Eumelaninsynthese wie *TYR*, *DCT* oder *TYRP1* [215]. Die Pigmentierungsintensität von uvealen Melanozyten variiert je nach Augenfarbe und Ethnie [204, 216, 217]. Anders als kutane Melanozyten reagieren die uvealen Melanozyten etwa in der Iris nicht mit einer verstärkten Pigmentsynthese auf eine UV-Exposition, weshalb sich die Augenfarbe trotz kontinuierlicher Sonnenexposition nicht verändert [218]. Ebenso wenig wird das Wachstum der Zellen durch Verletzungen oder Entzündungen beeinflusst [219]. In der Iris wurde einerseits kein α -MSH nachgewiesen, andererseits reagierten uveale Melanozyten auf eine α -MSH-Stimulation *in vitro* nicht mit einer verstärkten Melanogenese bzw. Proliferation, was durch die fehlende Expression des korrespondierenden Rezeptors MC1R erklärt werden könnte [218, 219]. Der Prostaglandin $F_{2\alpha}$ -Rezeptor-Agonist Latanoprost sowie andere Prostaglandinanaloga, die zur medikamentösen Senkung des Augeninnendrucks eingesetzt werden, können jedoch zu einer Veränderung der Irispigmentierung durch Erhöhung der *TYR*-Expression führen, wobei jedoch die Proliferation der Zellen nicht beeinflusst wird [220-222]. Bislang gibt es auch keine Hinweise, dass Latanoprost das UM-Risiko erhöht [223].

Die physiologische Rolle der Melanozyten im Auge ist derzeit noch nicht vollständig verstanden. Der Schutz vor UV-Strahlung kann im Gegensatz zu den kutanen Melanozyten nur eine geringe Rolle spielen, da anatomische Strukturen wie die Cornea, Linse und der Glaskörper bereits mehr als 99 % der eintreffenden UV-Strahlung absorbieren und uveale Melanozyten mit Ausnahme der Irismelanozyten somit kaum gegenüber UV-Strahlung exponiert werden [44]. Darüber hinaus kommen uveale Melanozyten aufgrund der davor liegenden Netzhaut und des retinalen Pigmentepithels (RPE) so gut wie gar nicht in Kontakt mit sichtbarem Licht [216]. Da Eumelanin nicht nur UV-protektiv, sondern

auch antioxidativ und als schwacher Radikalfänger wirkt, wird daher spekuliert, dass das Pigment die Retina vor oxidativem Stress durch die ROS-Bildung aus der stark durchbluteten Choroidea schützt [216]. Uveale Melanozyten scheinen auch für die normale Funktion der Uvea von Bedeutung zu sein, da melanozytendefiziente Mäuse eine dünnere Choroidea und abnorme choroidale Gefäße aufweisen [224]. Neben der Melaninsynthese exprimieren uveale Melanozyten auch Enzyme für die Degradierung der extrazellulären Matrix (EZM) wie *tissue plasminogen activator* (tPA) sowie Wachstumsfaktoren wie den *Vascular endothelial growth factor* (VEGF), die ebenfalls einen Beitrag zur physiologischen Rolle der Zellen im Auge leisten können [205].

1.2.2 Embryonale Entwicklung der Melanozyten in der Haut und im Auge

Bei der Melanomentstehung werden unter anderem embryonale Transkriptionsprogramme reaktiviert, die normalerweise nur während der Neuralleistenentwicklung aktiv sind [225, 226]. Der Grund hierfür liegt in der besonderen Embryonalentwicklung der Melanozyten, die die Ursprungszellen aller Melanome darstellen. Obwohl kutane Melanozyten in der Epidermis, einem ektodermalen Gewebe, lokalisiert sind, entwickeln sie sich aus einer transienten neuroektodermalen Vorläuferzellpopulation, der Neuralleiste (*neural crest*, NC) [227, 228]. Die NC-Entwicklung wird während der Entstehung des Nervensystems (Neurulation) an den Rändern der Neuralplatte etwa 20 Tage nach der Fertilisation induziert [229, 230]. Die multipotente Zellpopulation der NC-Zellen befindet sich zwischen dem Neuralrohr und dem darüberliegenden Ektoderm und stellt die Vorläuferzellen von Melanozyten aber auch anderen Gewebetypen wie peripheren Nerven, Knorpel, Knochen, Fettgewebe, glatten Muskelzellen im Herz oder Zellen der Nebennierenrinde [228, 229, 231]. Von ihrem Ursprungsort wandern die trunkalen NC-Zellen schließlich dorsal oder ventral der mesodermalen Somiten an ihre jeweiligen Zielorte [227, 232]. Die als Melanoblasten bezeichneten Vorläuferzellen der kutanen Melanozyten nehmen von der NC aus die dorsolaterale Route zwischen Ektoderm und Somiten, wandern aktiv in die Dermis und schließlich durch die Basalmembran in die unteren Schichten der Epidermis ein, wo sie letztlich zu reifen Melanozyten differenzieren [227, 228, 232]. Die Faltung des Neuralrohrs, Spezifikation und Delamination der NC-Zellen sowie die Migration und Differenzierung der Vorläuferzellen zu den verschiedenen Geweben werden durch die zeitliche und örtlich begrenzte Expression verschiedener Transkriptionsfaktoren genau gesteuert (Abb. 2) [228, 229, 232, 233]. Bei der Melanozytenentwicklung spielen hierbei vor allem die Transkriptionsfaktoren *SRY-Box transcription factor 10* (SOX10) und MITF eine entscheidende Rolle. Bereits vor der Migration wird SOX10 in den ersten multipotenten Vorläuferzellen exprimiert, die sich sowohl zu Melanozyten als auch Gliazellen differenzieren können [227, 234, 235]. Während ihrer Migration in Richtung Dermis und Epidermis ist das Überleben der melanozytären Vorläuferzellen (Melanoblasten) essenziell von der Expression von SOX10 abhängig [236]. *MITF* ist eines der ersten melanozytenspezifischen Gene, das während der Embryonalentwicklung exprimiert wird und ist ebenfalls essenziell für das Überleben der Melanoblasten während ihrer Migration sowie für ihre Weiterentwicklung zu reifen Melanozyten und die folgende Melanogenese [228, 237].

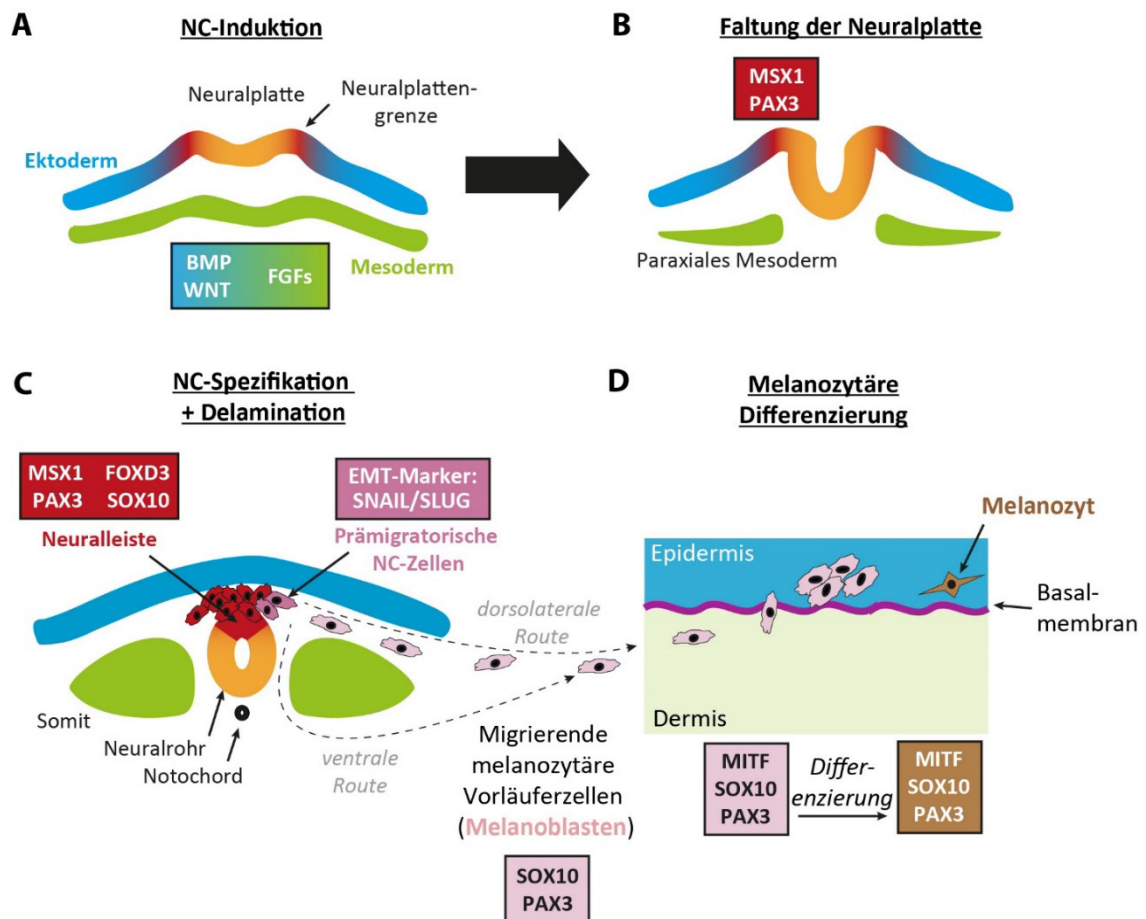


Abb. 2: Embryonale Entwicklung der kutanen Melanozyten des Körperstamms und beteiligte Transkriptions- und Wachstumsfaktoren

(A) Die Induktion und (B) Faltung der Neuralplatte während der Frühphase der Embryogenese wird durch ektodermal sezernierte Faktoren (*bone morphogenetic proteins* (BMP) und *Wnt family members* (WNT)) sowie mesodermal sezernierte Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGF) stimuliert. Diese induzieren die Expression der Transkriptionsfaktoren *Msh homeobox 1* (MSX1) und *Paired box 3* (PAX3) in der Neuralplattengrenze. (C) Aus den Zellen der Neuralplattengrenze bildet sich nach der Faltung der Neuralplatte und der Delamination die transiente Zellpopulation der Neuralleisten- (*neural crest*, NC)- Zellen, in der Faktoren wie MSX1, PAX3, *Forkhead box D3* (FOXD3) und SOX10 sowie die EMT-Marker SNAIL und SLUG exprimiert werden. (D) Nachdem die Zellen eine epitheliale-mesenchymale Transition (EMT) durchlaufen haben, migrieren die Vorläuferzellen der Melanozyten, die Melanoblasten, aus der NC in die Epidermis, wo sie zu reifen, pigmentbildenden Melanozyten differenzieren. Während der Migration sind die Zellen für ihr Überleben auf die Expression von SOX10 angewiesen. Abbildung modifiziert nach Wessely et al. 2021 [233].

Uveale Melanozyten gehen aus kranialen NC-Zellen hervor, die entscheidend am Aufbau des Gesichts sowie der Augenentwicklung beteiligt sind und im Auge Teile der Cornea, des Ziliarkörpers, der Iris und sowie der Tränengänge bilden [231]. Die Entwicklung der NC-Zellen im Kopfbereich, aus denen sich außerdem auch Knochen und Bindegewebe des Gesichts entwickeln, unterscheidet sich in einigen Punkten, ist aber insbesondere, was die Spezifikation der okulären NC-Zellen betrifft, noch deutlich weniger gut

erforscht [231, 238]. Nachdem das Neuralrohr geschlossen ist, bilden sich im späteren Kopfbereich noch während der Delamination der NC-Zellen die Augenbläschen durch Ausstülpungen des ersten Hirnbläschens (Prosencephalon) zwischen dem Telencephalon und dem Diencephalon des Embryos aus, welche sich nach dem Kontakt mit dem oberflächlichen Ektoderm zum Augenbecher einstülpen (Abb. 3, siehe Seite 51) [231, 239]. Nach der epithelialen-mesenchymalen Transition (EMT) wandern NC-Zellen aus dem Bereich des Diencephalons und des anterioren Mesencephalons in die Augenanlagen ein [231], wo die kranialen NC-Zellen als lose Zellpopulation das periokuläre Mesenchym im posterioren Teil des Augenbechers bilden [240]. Bei Menschen erfolgt die Wanderung der NC-Zellen in die sich entwickelnden Augen dabei in drei Wellen [240]. Die NC-Zellen der ersten Migrationswelle bilden zwischen dem Ektoderm (späteres Corneaepithel) und der anterioren Oberfläche der Linse das spätere Corneaendothel, die der zweiten Welle differenzieren zwischen Corneaendothel und –epithel zu Corneakeratinozyten und die der dritten Welle bilden Teile des Ziliarkörpers und des Irisstromas [240]. In der Maus sind die ersten Melanoblasten bereits an Tag 15,5 der Embryonalentwicklung in der Choroidea nachweisbar, was etwa der 8. bis 9. Woche der Embryonalentwicklung beim Menschen entspricht [238]. Beim Menschen wurden reife uveale Melanozyten in der Embryonalentwicklung erst ab der 28. Woche nachgewiesen [241].

Neben den uvealen Melanozyten gibt es im Auge mit dem RPE noch eine weitere anatomische Struktur aus pigmentierten Zellen, die als einzellige Schicht aus kubischen Epithelzellen zwischen der Choroidea und der Retina liegt [242]. Diese Zellen stammen entwicklungsgeschichtlich jedoch von Zellen des Neuroektoderms des Augenbechers ab und nicht von kranialen NC-Zellen [243]. Ihre Aufgaben umfassen die Aufnahme von abgestoßenen Spitzen der Außensegmente der angrenzenden Photorezeptoren der Retina durch Phagozytose sowie den Transport von Nährstoffen, Wasser und Ionen zu den Photorezeptoren, wodurch sie maßgeblich zum Erhalt der Sehfunktion beitragen [244]. In der Fovea interagiert dabei eine Pigmentzelle mit etwa 23 Zapfen und bildet mit diesen eine funktionelle Einheit [244]. Das RPE ist intensiv pigmentiert unabhängig von der Augenfarbe oder der Ethnie und enthält vor allem Eumelanin [216]. Durch die Absorption des in das Auge fallenden Lichtes erhitzen sich die Zellen des RPE auf mehr als 40°C; diese Wärme wird über die starke Durchblutung in die darunterliegenden Choroidea abgeführt [245]. Darüber hinaus ist das RPE am Aufbau der Blut-Retina-Schranke beteiligt, die für die normale Sehfunktion und die Stellung des Auges als immunprivilegiertes Organ essenziell ist [246].

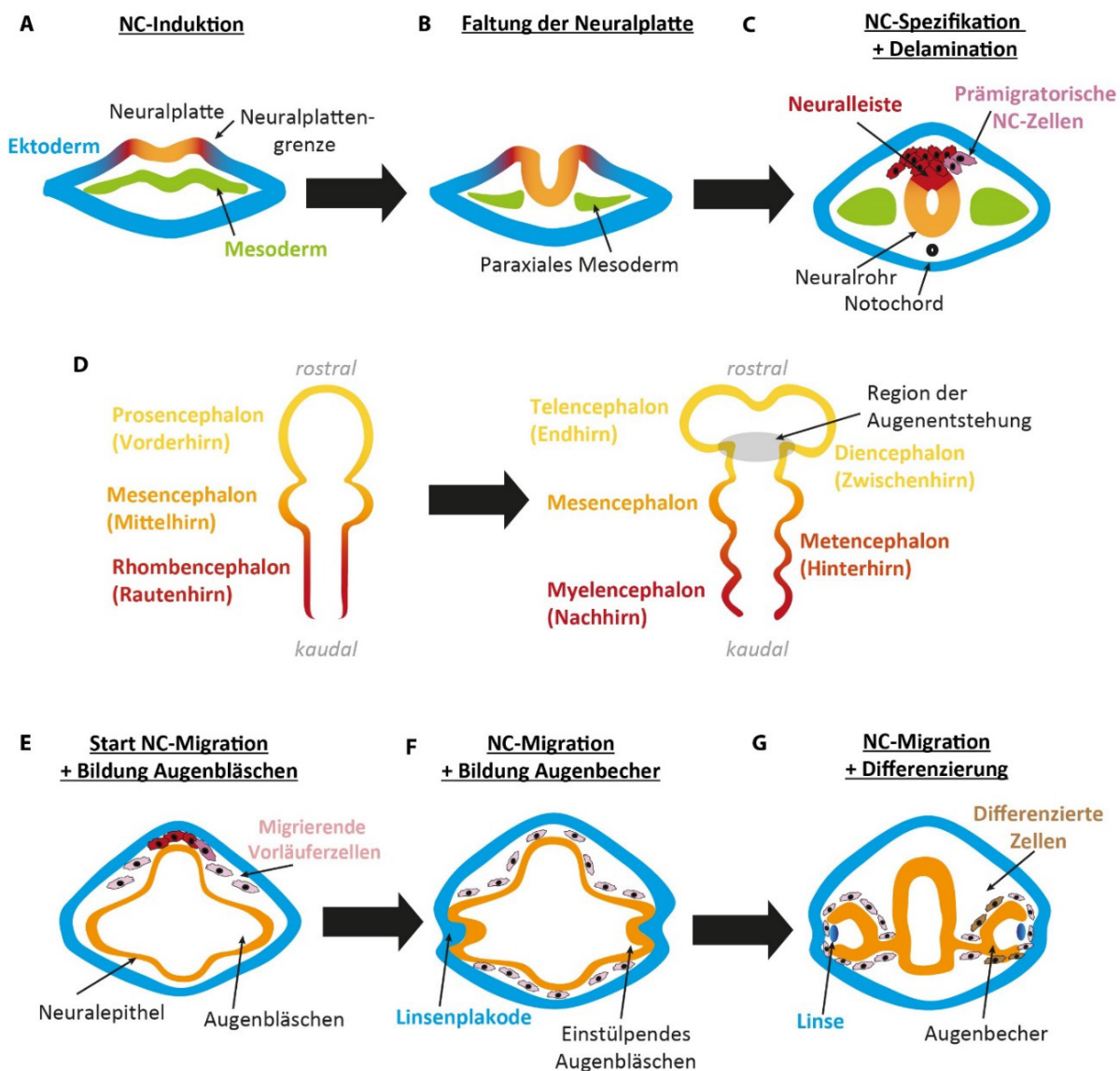


Abb. 3: Embryonale Entwicklung der uvealen Melanozyten aus kranialen NC-Zellen

Nach der (A) Induktion, (B) Faltung der Neuralplatte, (C) Verschluss des Neuralrohrs und Bildung der Neuralleiste (NC) bilden sich (D) aus dem kranialen Anteil des Neuralrohrs die drei primären Hirnbläschen (Pros-, Mes- und Rhombencephalon; Sicht von oben auf das Neuralrohr). Durch weitere Ausstülpungen bilden sich das rostral gelegene Telencephalon und kaudal gelegene Diencephalon aus dem Prosencephalon; zwischen diesen beiden Strukturen entwickeln sich später die Augen. (E) Aus den Ausstülpungen des Prosencephalons bilden sich zwei Augenbläschen und die kranialen NC-Zellen beginnen mit der Migration. (F) Das Neuralleiste der Augenbläschen beginnt sich nach dem Kontakt mit dem Ektoderm, der Linsenplakode, aus der später die Linse entsteht, zum Augenbecher einzustülpen. NC-Zellen aus dem Di- und anterioren Mesencephalon wandern dann in drei Migrationswellen in die Augenanlagen ein und (G) differenzieren dort zu Zellen des Corneaendothels, den Corneakeratinozyten, des Ziliarkörpers, Irisstromas und zu reifen uvealen Melanozyten. Letztere können ab der 28. Schwangerschaftswoche beim Menschen nachgewiesen werden. Abbildung modifiziert nach [231, 233, 239, 240, 247].

1.3 Der Neuralleisten-Transkriptionsfaktor SOX10

1.3.1 Physiologische und pathophysiologische Rolle

SOX10 (SR \bar{Y} -Box transcription factor 10) gehört zu den Sry (*sex determining region of Y*)-HMG-Box (SOX)-Transkriptionsfaktoren [235, 248] und wurde 1993 erstmals beschrieben, als es zusammen mit sechs weiteren SOX-Proteinen in der Maus entdeckt wurde [249]. Innerhalb der mehr als 20 Mitglieder umfassenden SOX-Proteinfamilie wird SOX10 zusammen mit SOX9 und SOX8 der SoxE-Gruppe zugeordnet [249]. Das SOX10-Gen liegt auf Chr. 22q13.1 [250] und enthält fünf Exons [251]. Das hierdurch codierte SOX10-Protein besteht aus 466 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von etwa 50 kDa [250, 252]. Alle SOX-Transkriptionsfaktoren besitzen eine *high mobility group* (HMG)-Domäne, über die sie einerseits an die kleine Furche der DNA binden und diese dadurch stark verbiegen und über dessen C-terminalen Teil andererseits andere Transkriptionsfaktoren binden können [248, 253, 254]. Die Mitglieder der SoxE-Familie besitzen zusätzlich zur HMG-Domäne eine C-terminale und eine zentrale Transaktivierungs-Domäne [248, 250, 252]. SOX10 weist mit einer Sequenzübereinstimmung von 59 % eine hohe Homologie mit SOX9 auf [250]. Die größten Übereinstimmungen befinden sich im N-terminalen Teil der HMG-Domäne, im zentralen Teil der Aminosäuresequenz und am C-Terminus des Proteins [250]. Die SOX-Proteine binden an das 7 Basenpaare (bp) kurze Konsensusmotiv 5'-(A/T)(A/T)CAA(A/T)G-3', das jedoch sehr häufig im Genom vorkommt [248]. SOX10 kann an die DNA sowohl als Monomer als auch Homodimer oder Heterodimer mit anderen SoxE-Proteinen und Cofaktoren binden [248, 254]. Die Aktivität von SOX10 kann posttranslational durch Phosphorylierung [255] und SUMOylierung [256, 257] moduliert werden. Die SUMOylierung von SOX10 verringert die transkriptionelle Aktivität seiner Zielgene, allerdings nicht die Bindung des Transkriptionsfaktors an die DNA [256]. Zudem moduliert die SUMOylierung die Funktion von Sox10 und Sox9 bei der NC-Entwicklung im Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) [257]. Im KM konnte speziell die SUMOylierung der Aminosäure Lysin (Lys) 55 als wichtige Modifikation für die Veränderung der transkriptionellen Aktivität des Proteins identifiziert werden [258]. SOX10 kann an acht Positionen phosphoryliert werden, die sich in Proteinmotiven befinden, die durch MAP-Kinasen und Cyclin-abhängige Kinasen (CDK) phosphoryliert werden [255]. Die Phosphorylierung an der Aminosäureposition S24 verringert beispielsweise die transkriptionelle Aktivität am *MITF*-Promotor, jedoch scheint die transkriptionelle Aktivität nicht pauschal durch Phosphorylierungen an bestimmten Stellen gesteuert zu werden, sondern auch vom zellulären Kontext abhängig zu sein [255]. Ähnlich kann die Stabilität des Proteins durch Phosphorylierung je nach Zellkontext moduliert und möglicherweise über zusätzliche Feedback-Mechanismen beeinflusst werden [255]. Obwohl SOX10 als Transkriptionsfaktor seine Funktion im Zellkern ausübt und vor allem dort nachgewiesen werden kann, kommt das Protein auch im Zytoplasma vor und kann zwischen diesen subzellulären Kompartimenten hin- und herwechseln [259]. Han et al. konnten zeigen, dass SOX10 durch die Kinase ERK2 an den Aminosäurepositionen

Threonin (Thr) 240 und Thr244 phosphoryliert wird und dies die SUMOylierung des Proteins an Position Lys55 verhindert [258]. Diese ERK2-vermittelte Phosphorylierung vermindert die transkriptionelle Aktivität von SOX10 und kann zu einer geringeren Expression seiner Zielgene wie *MITF* und *TYR* führen [258]. Weder die Phosphorylierung noch die SUMOylierung scheinen jedoch die subzelluläre Lokalisation von SOX10 zu beeinflussen [255, 256].

SOX10 wird bereits während der Embryonalentwicklung in den frühen Phasen der NC-Entwicklung exprimiert und beeinflusst maßgeblich die weitere Entwicklung der daraus entstehenden Zelltypen [260]. Konkret ist SOX10 essenziell an der Entwicklung der Melanozyten [261] und des peripheren Nervensystems (PNS) beteiligt [236]. In der melanozytären Linie ist SOX10 sowohl zentral in die Melanozytenentwicklung als auch in die Differenzierung und Melanogenese involviert [261-263]. SOX10 wird dabei nicht nur in NC-Zellen, sondern auch in den migrierenden unreifen melanozytären Vorläuferzellen exprimiert [236] und ist obligat für das Überleben der Zellen in dieser Phase [264]. Postnatal wird SOX10 sowohl in reifen differenzierten Melanozyten als auch in den melanozytären Stammzellen im Haarfollikel exprimiert [265-267]. Harris et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass die Expression von SOX10 dabei paradoxerweise sowohl für die Etablierung und Aufrechterhaltung der undifferenzierten melanozytären Stammzellen als auch für die differenzierten Melanozyten und die normale Pigmentierung der Zellen wichtig ist [267]. Diese eigentlich gegensätzliche Rolle von SOX10 wird durch die Modulierung der SOX10-Expressionslevel erreicht, da davon ausgegangen wird, dass die SOX10-Aktivität in melanozytären Stammzellen herabreguliert wird, um die Selbsterneuerungsfähigkeit der Zellen aufrechtzuerhalten und eine Differenzierung der Zellen zu vermeiden [267]. Neben der Haut wurde eine SOX10-Expression auch in der normalen Uvea bei 44 % der Proben in der Choroidea, 48 % im Ziliarkörper und 11 % in der Iris detektiert [268, 269]. SOX10 ist in Melanozyten entscheidend in die Melanogenese involviert, da es unmittelbar oberhalb der Bindestelle des Transkriptionsfaktors *Paired box 3* (PAX3) an den Promotor des Transkriptionsfaktors *MITF*, dem Hauptregulator der Melanogenese, bindet und somit direkt dessen Expression steigern kann [261-263]. Zudem steuert SOX10 direkt die Transkription der Gene *TYR* [270], *TYRP1* [271] und *DCT* [272, 273], die für Enzyme der Eumelanin-Synthesekaskade ausgehend von der Aminosäure L-Tyrosin codieren [274].

Außer in Melanozyten wird SOX10 auch in anderen von NC-Zellen abstammenden Gewebetypen wie den Nerven- und Gliazellen des PNS inklusive Schwannzellen, Oligodendrozyten, Axonen von Motoneuronen, Ganglien des Sympathikus und Parasympathikus sowie Zellen des enterischen Nervensystems exprimiert [252, 266, 275]. Eine SOX10-Expression im Gehirn wurde sowohl bereits bei 17- bis 25-Wochen alten Föten als auch bei Erwachsenen nachgewiesen [275]. Darüber hinaus wurde eine SOX10-Expression in der fetalen Lunge, Niere und in Brust-Stammzellen sowie bei Erwachsenen in Brustdrüsengewebe, Kolon, Dünndarm, Herz, in den abluminalen

myoepithelialen und luminalen Azinuszellen und Schaltstücken der Parotis, in den submukosalen Bronchialdrüsen sowie in geringerem Ausmaß in der Blase, Prostata, Magen und Pankreas detektiert [266, 275-277].

Heterozygote Mutationen im *SOX10*-Gen sind beim Menschen mit dem autosomal-dominant vererbten Waardenburg-Shah-Syndrom (Waardenburg-Syndrom Typ 4, WS4) assoziiert, das sich als Pigmentierungsstörungen der Haut und Haare wie einer charakteristischen weißen Stirnlocke, weißen Wimpern und Augenbrauen, Irisheterochromatie und Hauthyperpigmentierung sowie weit auseinanderstehenden Augen, kongenitaler sensorineuraler Taubheit und einem Megakolon verursacht durch eine Agangliose des Kolons (Morbus Hirschsprung) manifestiert [251, 278, 279]. Darüber hinaus wurden *SOX10*-Deletionen bei Patienten mit dem Waardenburg-Syndrom Typ 2 detektiert, das bei etwa 15 % der Patienten durch heterozygote Mutationen in *MITF* bedingt ist und dessen genetische Ursachen in den übrigen Fällen unbekannt ist [280]. Weiterhin sind *SOX10*-Deletionen bei Patienten mit peripherer demyelinisierender Neuropathie mit zentraler dysmyelinisierender Leukodystrophie, Waardenburg-Syndrom und Hirschsprung-Krankheit (PCWH) beschrieben worden [281]. Pingault et al. konnten *SOX10*-Mutationen bei Patienten mit Kallmann-Syndrom nachweisen, bei dem es zu einer Anosmie, einem hypogonadotrophen Hypogonadismus und zusätzlichem Hörverlust kommt [282]. Bisher wurden in der Literatur etwa 300 Fälle von Patienten mit krankheitsverursachenden genetischen Veränderungen im *SOX10*-Gen beschrieben [283]. Die häufigsten mit einem Krankheitsbild assoziierten Aberrationen waren Punktmutationen, die zur Ausbildung neuer Stopcodons führten; letztere wurden entlang des gesamten Gens gefunden [283]. Mutationen, die zur Expression eines trunkierten Proteins führten und durch neue Stopcodons oder eine Verschiebung des Leserahmens verursacht wurden, wurden bei etwas mehr als der Hälfte der untersuchten Fälle gefunden und bei etwa einem Drittel wurden Missense-Mutationen oder kurze Deletionen bzw. Insertionen festgestellt, die zu keiner Verschiebung des Leserahmens führten [283]. Missense-Mutationen traten dabei gehäuft in der HMG-Domäne auf, jedoch nicht unbedingt an Aminosäurepositionen, die mit posttranslationalen Modifikationen assoziiert sind [283]. Bei etwa 10 % der Fälle wurden ganze oder teilweise Variationen der Kopienzahl gefunden [283]. Eine *Sox10*-Haploinsuffizienz führt bei Mäusen zu einer veränderten Fellfärbung mit charakteristischem weißen Fleck am Bauch („*white belly spot*“) und einem Megakolon durch Agangliose des Kolons („*Dom* Hirschsprung mouse model“) [236, 284]. Ein kompletter Funktionsverlust von *SOX10* während der Embryonalentwicklung ist nicht mit dem Leben vereinbar [236, 284-286]. Bisher wurden nur zwei Fälle von *SOX10*-Alterationen, die beide Allele betrafen und bereits *in utero* zum Tod der betroffenen Föten führten, in der Literatur berichtet [285, 286]. LeBel et al. berichteten den weltweit ersten dokumentierten Fall eines in der 31. Schwangerschaftswoche totgeborenen Fötus mit einer homozygoten *SOX10-loss-of-function*-Mutation [286]. Bei dieser Mutation handelte es sich um eine 392 kb große Deletion auf Chr. 22q13.1, die das gesamte *SOX10*-Gen sowie up- und downstream liegende Gene auf einem Allel umfasste sowie um eine 7 kb große Deletion auf dem anderen Allel, die zu einem Verlust des Exons 3 und Teilen des Exons 2 führte [286]. Der Fötus wies eine Wachstumsretention, weiße Haare, kleine, niedrig sitzende

Ohren, einen breiten Nasenrücken, erhöhten Augenabstand, eine Mikrognathie, Arthrogrypose, Fußdeformitäten, Kontrakturen der Extremitäten, eine Atrophie der Skelettmuskulatur und eine Fallot-Tetralogie auf [286]. Bei dem zweiten von Stevenson et al. berichteten Fall handelte es sich um einen in der 32. Schwangerschaftswoche totgeborenen Fötus, bei dem ebenfalls Deletionen beider *SOX10*-Allele vorlagen und der weiße Haare sowie eine kurze Lidspalte, Dystopia canthorum und eine Arthrogrypose aufwies [285]. Im Mausmodell ist ein kompletter Funktionsverlust von *Sox10* ebenfalls letal, da die Mäuse bereits *in utero* sterben [236, 284].

1.3.2 Expression im Melanom und anderen Tumorarten

1.3.2.1 Expression und Funktion im kutanen Melanom

SOX10 wird nicht nur in Melanozyten, benignen Nävi sowie kongenitalen Riesennävi, sondern auch im KM exprimiert [265, 266, 287, 288]. *SOX10* kann als Marker für melanozytäre Zellen in der histologischen Diagnostik beispielsweise zur Detektion von Melanomzellen im Wächterlymphknoten eingesetzt werden, da *SOX10* eine ähnliche Spezifität und Sensitivität wie eine Kombination der häufig in der Diagnostik eingesetzten Marker S100, Melan-A oder HMB-45 aufweist [287]. Die Höhe der *SOX10*-Expression in Nävi wurde je nach Studie sowohl als höher [265] als auch niedriger [289, 290] im Vergleich zu den untersuchten Melanomproben beschrieben. Da *SOX10* auch in benignen Nävi exprimiert wird, ist es als Marker zur Unterscheidung von benignen und malignen Zellen nicht geeignet [287]. Im Melanom wurde in verschiedenen Studien eine *SOX10*-Expression bei 43 % [291] bis 100 % [265, 288] der untersuchten Primärtumoren detektiert. Mehr als 80 % der *SOX10*-positiven Proben enthielten dabei mindestens 75 % *SOX10*-positive Zellen [265, 288]. Übereinstimmend damit zeigen Einzelzell-RNA-Sequenzierungsanalysen und immunhistochemische (IHC)-Färbungen eine inter- und intratumoral heterogene *SOX10*-Expression in Melanomproben, dabei wurden im gleichen Tumor sowohl Zellen mit als auch ohne *SOX10*-Expression gefunden [292]. *SOX10* wird vor allem von Melanomzellen, aber kaum von anderen Zellen im Tumor oder seiner Umgebung wie Keratinozyten, Fibroblasten oder Makrophagen exprimiert [290].

Die Daten zu *SOX10* als prognostischen Marker sind uneindeutig. In der Studie von Agnarsdottir et al. korrelierte eine starke nukleäre *SOX10*-Färbeintensität mit einem besseren OS und einem längeren RFS [265]. Gambichler et al. konnten in ihrer Analyse jedoch eine signifikante positive Korrelation zwischen der *SOX10*-Expression und dem Alter, der Tumordicke, nodulären Melanomen, einem höheren Tumorstadium, Rezidiven und dem krankheitsspezifischen Tod finden [289]. Eine weitere Arbeit stellte ebenfalls eine Korrelation zwischen einer höheren *SOX10*-Genexpression und einem kürzeren OS fest [290]. *SOX10* kann nicht nur im Tumorgewebe selbst, sondern auch im Serum nachgewiesen werden und erhöhte Serumspiegel wurden bei Melanom- sowie Vitiligopatienten festgestellt [293].

SOX10 ist nicht nur ein diagnostischer Marker, sondern spielt auch eine tragende funktionelle Rolle im Melanom, da es essenziell für die Proliferation und das Überleben von

KM-Zellen ist. Die Hemmung von SOX10 durch RNA-Interferenz führt *in vitro* zu einer verringerten Expression des Transkriptionsfaktors E2F1, dem Tumorsuppressorprotein Retinoblastom-Protein (Rb) und MITF sowie einer erhöhten Expression der CDK-Inhibitoren p21 und p27 und resultiert letztlich in einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase sowie je nach Zelllinie zur Seneszenzinduktion oder Apoptose der Zellen [288, 290, 294, 295]. Die Effekte werden dabei unabhängig vom Tumorsuppressor p53 vermittelt [294]. Ein wichtiger Faktor in diesem Zusammenhang ist SOX9 [296]. Die Expressionshöhe von SOX9 im KM schwankt und wurde sowohl als gering wie auch als stark beschrieben [291, 296]. Durch die Herabregulation von SOX10 kommt es im KM zu einer erhöhten SOX9-Expression und umgekehrt verringert eine hohe SOX9-Expression die SOX10-Expression durch direkte Bindung von SOX9 an den SOX10-Promotor, sodass hier eine gegenseitige Beeinflussung der beiden strukturell nah verwandten Transkriptionsfaktoren stattfindet [296]. Die ektope Expression von SOX9 führt zur Ausbildung eines Genexpressionsprofils, das dem nach SOX10-Herabregulierung stark ähnelt und Gene betrifft, die an der Regulierung der melanozytären und mesoektodermalen Differenzierung sowie der Apoptose und des Zellzyklusprogresses beteiligt sind [296]. Interessanterweise bewahrt die Herabregulierung von SOX9 die Zellen nach SOX10-Hemmung vor Apoptose [296]. Neben dem Einfluss auf das Überleben und die Zellzyklusregulation fördert SOX10 auch die Invasion durch direkte transkriptionelle Regulation von *Melanoma inhibitory activity (MIA)* [295] und *peripheral myelin protein 2 (PMP2)* [297]. Durch RNA-Sequenzierungsanalysen nach SOX10-Knockdown wurde zudem eine Herabregulation von Genen des Notch-Signalweges, der DNA-Replikation und des Zellzyklus sowie eine Hochregulierung von Genen unter anderem des Tumornekrosefaktor (TNF)- und NF- κ B-Signalweges beobachtet [290]. SOX10-Knockout-Zelllinien zeigen eine Gen-signatur, die mit einem invasiven, aber wenig proliferativen Phänotyp assoziiert ist [292]. *In vitro* kann durch eine transiente SOX10-Hemmung ein Phänotyp-Switch von einem proliferativen hin zu einem invasiven und ruhenden Phänotyp (*quiescent cells*) induziert werden [292].

Die Rolle von SOX10 bei der Tumorentstehung konnte im Tiermodell gut demonstriert werden. Im *Nras*^{Q61K}-Melanom-Mausmodell beeinträchtigt eine *Sox10*-Haploinsuffizienz die Entstehung von Melanomen, indem es der *Nras*^{Q61K}-induzierte Hyperproliferation entgegenwirkt [288]. Weitere Untersuchungen am Tiermodell konnten zeigen, dass *Sox10* nicht nur für die Entstehung, sondern auch für die Aufrechterhaltung der Melanome essenziell ist [288]. Im *Grm1*^{Tg}-Mausmodell führte die *Sox10*-Haploinsuffizienz dazu, dass weniger Tumoren zu einem späteren Zeitpunkt gebildet wurden im Vergleich zu den Kontrolltieren, was die entscheidende Rolle von SOX10 bei der Melanomentstehung unterstreicht [294]. Darüber hinaus beschleunigte die ektope Überexpression von *sox10* die Entwicklung von Melanomen im transgenen p53/BRAF-Zebrafischmodell [225]. Die protumorigenen Effekte von SOX10 werden dabei auch im Zusammenspiel mit dem Immunsystem vermittelt. Rosenbaum et al. konnten kürzlich zeigen, dass *Sox10* die Expression der immunassoziierten Proteine *Herpes virus entry mediator* (HVEM) und *CEA cell adhesion molecule 1* (CEACAM1) positiv reguliert und die Hemmung von *Sox10 in vivo* in immunkompetenten C57BL/6-Mäusen zu einem geringeren Tumorwachstum

führt als in immundefizienten NSG-Mäusen [298]. Der Effekt war laut den Analysen zumindest teilweise von der Präsenz von CD8⁺ T-Zellen abhängig [298]. Zudem fanden die Forscher, dass SOX10 negativ mit immunassoziierten Signalwegen in Patientenproben korreliert ist [298].

SOX10 beeinflusst im KM auch das Therapieansprechen. KM mit *BRAF*^{V600}-Mutation können durch eine zielgerichtete Therapie mit BRAFi oder einer Kombination aus BRAFi und MEKi effektiv behandelt werden [299, 300], allerdings kommt es bei einem Großteil der Patienten zur Resistenzentstehung innerhalb des ersten Jahres nach Therapiebeginn [301, 302]. Es gibt Hinweise, dass SOX10 bei der Resistenzentstehung eine wichtige Rolle spielt und insbesondere der Verlust der SOX10-Expression zur Therapieresistenz beiträgt. *In vitro* führt eine SOX10-Hemmung zur erhöhten Expression des *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- β)-Rezeptors 2 und infolge dessen zur Aktivierung des TGF- β -Signalweges mit einer vermehrten Expression von *Jun Proto-Oncogene*, *AP-1 Transcription Factor Subunit* (JUN), dem *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) und *Platelet derived growth factor receptor beta* (PDGFRB) und einer erhöhten Resistenz gegenüber dem BRAFi Vemurafenib [302]. In Tumorproben von Melanompatienten mit erworbener Resistenz gegen BRAFi oder MEKi konnte ebenfalls eine erhöhte Expression von EGFR, PDGFRB, TGF- β -Rezeptoren sowie TGF- β -Zielgenen wie JUN festgestellt werden [302]. Die Hemmung von SOX10 verhindert im KM außerdem die durch BRAFi-induzierte Expression des Transkriptionsfaktors *Forkhead box D3* (FOXD3), der eine wichtige Rolle bei der adaptiven Resistenz gegen BRAFi spielt und erhöht die Empfindlichkeit von KM-Zellen auf den BRAFi Vemurafenib *in vitro* und *in vivo* durch Modulation des *Neuregulin/Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3/AKT* (NRG1/ERBB3/AKT)-Signalweges, der bei der Umgehung der MAPK-Hemmung aktiviert wird [258]. Capparelli et al. konnten zeigen, dass die Expression von SOX10 als Antwort auf eine zielgerichtete Therapie abnimmt und MEKi- bzw. BRAFi plus MEKi-resistente Zellen kaum noch SOX10 exprimieren [292]. Neben der zielgerichteten Therapie mit MAPK-Inhibitoren stellt die ICB mit Antikörpern gegen die Checkpoint-Proteine CTLA-4 und PD-1 eine weitere zentrale Therapiesäule von Patienten mit metastasiertem KM dar [164-166]. Yokoyama et al. konnten zeigen, dass die Expression des PD-1-Liganden PD-L1 invers mit der SOX10-Expression sowohl in Patientenproben als auch in Melanomzelllinien korreliert [303]. *In vitro* führte die Hemmung von SOX10 zu einer erhöhten PD-L1-Expression sowohl mit als auch ohne Interferon-gamma (IFN- γ)-Stimulation, während die Überexpression von SOX10 die PD-L1-Expression hemmte [303]. Die Veränderungen der PD-L1-Expression scheinen dabei unabhängig vom JAK-abhängigen IFN- γ -Signalweg stattzufinden, über den die PD-L1-Expression sonst gesteigert wird, sondern über das Protein *Interferon regulatory factor 1* (IRF1) vermittelt zu werden [303]. SOX10 bindet hierzu an eine Enhancer-Region von *IRF4*, welches IRF1 hemmt und infolgedessen die PD-L1-Expression verringert [303]. Die Behandlung mit dem Histondeacetylase-Inhibitor (HDACi) Vorinostat konnte die Expression von SOX10 und IRF4 verringern und die von IRF1 und PD-L1 steigern; weitere Analysen mit spezifischeren HDACi legen dabei nahe, dass HDAC1 und HDAC3 hierbei involviert sind [303]. Dieser Befund ist span-

nend für eine mögliche therapeutische Nutzung und wird durch Daten aus dem Tiernommodell unterstrichen, die einen synergistischen Effekt von HDACi und anti-PD-1-Antikörpern im Melanom nahelegen [303].

SOX10-Mutationen sind im KM eher selten und kommen bei 0,65 % bis 8,6 % der Melanome sowohl in Primärtumoren als auch Metastasen vor [294, 304]. Aufgrund der Seltenheit von SOX10-Mutationen im Melanom wird allerdings davon ausgegangen, dass eine normale Funktion von SOX10 für die Melanomentstehung wichtig ist [294].

1.3.2.2 Expression in nicht-melanozytären Tumoren

SOX10 wird auch in einer Reihe von anderen Tumoren exprimiert und kann für diese Tumoren als diagnostischer Marker genutzt werden [266]. In benignen Nervenscheidentumoren wie dem Neurofibrom und Schwannom wird SOX10 diffus exprimiert, in malignen peripheren Nervenscheidentumoren diffus bis fokal [266]. Astrozytäre Tumoren exprimieren SOX10 in allen verschiedenen Differenzierungsstufen [305]. Darüber hinaus konnte eine SOX10-Expression im triple-negativen Mammakarzinom nachgewiesen werden, für das es auch ein sensitiver diagnostischer Marker ist [306], sowie im „*basal-like*“ Mammakarzinom, für das es ein spezifischer, aber nur moderat sensitiver Biomarker ist [307, 308]. SOX10 wurde außerdem in Tumoren der Speicheldrüse gefunden und eignet sich dort ebenfalls als Marker zur Diagnostik von Azinuszell-, adenoidzystischen, epithelial-myoepithelialen, myoepithelialen und pleomorphen Karzinomen [277]. Eine erhöhte SOX10-Expression wurde im Harnblasenkarzinom im Vergleich zu gesundem Blasengewebe detektiert und eine hohe SOX10-Expression korrelierte bei dieser Tumorentität signifikant mit einem höheren Tumorstadium, undifferenzierteren Zellen und dem Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen [309]. Weitere Analysen zeigten, dass SOX10 im Harnblasenkarzinom ein unabhängiger prognostischer Marker für das OS ist [309]. Im hepatozellulären Karzinom (HCC) wurde ebenfalls eine erhöhte SOX10-Expression gefunden [310]. In HCC-Zellen aktiviert SOX10 den Wnt/ β -Catenin-Signalweg und fördert auf diesem Weg die Proliferation der Tumorzellen [310]. SOX10 wird außerdem in Ovarialkarzinomen exprimiert und ist dort ein unabhängiger Faktor für eine schlechte Prognose; zudem ist eine SOX10-Kernfärbung mit einer Chemoresistenz von ovariellen Adenokarzinomen assoziiert [311].

1.3.3 SOX10 im Kontext des Uveamelanoms

Im Kontext des UM wurden bisher nur einzelne Arbeiten im Zusammenhang mit SOX10 publiziert. Alghamdi et al. untersuchten 38 UM-Primärtumoren mittels IHC-Färbungen und konnten eine nukleäre SOX10-Proteinexpression in 100 % der analysierten Proben feststellen [268]. Bei 94,7 % der Fälle war eine diffuse nukleäre Positivität und bei 5,3 % eine fokale Kernfärbung detektiert worden [268]. Die IHC-Färbung von anderen melanozytären Markern wie etwa gp100 ergab eine diffuse zytoplasmatische Positivität bei 94,7 % und eine fokale bei 2,6 % [268]. Im gesunden Gewebe der untersuchten Augen wurde zudem eine SOX10-Färbung in den inneren und äußeren Kernschichten der Retina bei 78 % der untersuchten Augen und bei 17 % im RPE festgestellt [268]. In der

normalen Uvea wurde eine SOX10-Expression bei 44 % der Choroidea-, 48 % der Ziliarkörper- und 11 % der Irisproben detektiert [268]. Mori et al. untersuchten die SOX10-Expression in drei Adenomen und zwei Adenokarzinomen des pigmentierten Ziliarepithels (APCE) sowie elf UM-Primärtumoren [269]. Die Autoren spekulierten, dass sich die Tumorentitäten aufgrund ihrer unterschiedlichen embryonalen Herkunft anhand der Expression von SOX10 unterscheiden lassen könnten [269]. Tatsächlich konnten die Forscher eine diffuse SOX10-Färbung in allen untersuchten UM, nicht aber in den APCE nachweisen [269]. Fodor et al. konnten beim Vergleich von drei Uveaproben und 18 UM-Primärtumoren eine erhöhte SOX10-Genexpression in den Tumorseiten finden [312]. Stålhammar et al. beobachteten in sechs untersuchten UM-Lebermetastasen eine starke SOX10-Färbung in vier Tumoren und eine schwache in zwei Proben [313]. Kalirai et al. haben eine Expression von SOX10 in den Zelllinien Mel270 und OMM2.5 beschrieben [314].

Häufig im UM mutierte Gene wie *BAP1* und *SF3B1* nehmen auch Einfluss auf die SOX10-Expression. *In vitro* führte die Hemmung von BAP1 in der UM-Zelllinie 92.1 zu einer Verringerung der SOX10-Genexpression [24]. *Sf3b1*^{b460}-Mutationen führten bei Zebrafischen zu einer verringerten Expression von *sox10* und anderen NC-Transkriptionsfaktoren wie *foxd3*, *sox9*, *crestin* und *snai1b* [315]. SOX10-Mutationen im Zusammenhang mit dem UM wurden bisher in zwei Fallberichten beschrieben. Das et al. verglichen mittels Exomsequenzierung Primärtumorgewebe eines UM-Patienten und uveales Gewebe von Kontrollpersonen ohne Tumor mit Blutproben derselben Probanden, um somatische Mutationen zu finden, die mit dem Auftreten eines UM assoziiert waren [316]. Im Tumor des UM-Patienten wurden dabei 31 somatische Mutationen gefunden, darunter 25, die zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz führten [316]. Unter den detektierten Aberrationen fanden die Autoren eine 20 bp umfassende Deletion in Exon 4 von SOX10 (H387fs), die zu einer Verschiebung des Leserahmens führte und einen Bereich des Proteins zwischen den beiden Transaktivierungsdomänen betraf [283, 316]. Die funktionellen Auswirkungen dieser SOX10-Mutation auf die Proteinfunktion wurden jedoch nicht in weiteren Analysen getestet. Bei der *whole genome*-Sequenzierung von 103 UM-Tumorseiten fanden Johansson et al. bei einer Patientin (ID MELA-0831) mit choroidalem Melanom eine missense-Mutation (SOX10^{V15M}), die zwar als „*moderate impact*“ eingestuft, jedoch nicht weiter funktionell untersucht wurde [46]. Die Mutation liegt im N-terminalen Teil des Proteins, allerdings in keiner funktionellen Domäne [46, 283]. Ob die beiden beschriebenen SOX10-Mutationen eine Rolle bei der UM-Entstehung spielten, wie Das et al. spekulierten, bleibt aufgrund der fehlenden funktionellen Untersuchungen jedoch unklar [316].

Die funktionelle Relevanz von SOX10 im UM wurde bisher kaum untersucht. Ding et al. konnten mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) zeigen, dass SOX10 die spermienspezifische Isoform der Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDHs) direkt transkriptionell reguliert [317]. GAPDHs wird im UM stark exprimiert und ist in UM-Zellen maßgeblich an der aeroben Glykolyse beteiligt, indem es die Oxidation von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat katalysiert [317].

Neben der Glykolyse ist die Expression von GAPDHS auch ein entscheidender Faktor für die Proliferation der Zellen, da dessen Hemmung zu einer Verringerung der Kolonienzahl und einem Zellzyklusarrest in der G2-Phase führt [317]. Die Hemmung von SOX10 in der Zelllinie OCM-1 führte ebenfalls zu einer geringeren Kolonienanzahl, verminderten Glukose-Aufnahme und geringeren Laktat- und Adenosintriphosphat (ATP)-Produktion [317]. Die ektope Expression von GAPDHS konnte die Effekte der SOX10-Hemmung *in vitro* und im Mausmodell aufheben, sodass die Autoren davon ausgingen, dass SOX10 das Tumorwachstum im UM über die Regulierung der GAPDHS-Expression entscheidend moduliert [317]. Die Erkenntnisse dieser Arbeit müssen jedoch mit Vorsicht betrachtet werden, da die verwendete Zelllinie OCM-1 aufgrund einer Kontamination mit der Melanomzelllinie M14 und dem Vorhandensein der UM-untypischen *BRAF*^{V600E}-Mutation als problematisch anzusehen ist [318-321].

Ma et al. konnten zeigen, dass SOX10 in der UM-Zelllinie MUM2B die Expression des Tumorsuppressors Lactamase β (LACTB) durch Bindung an dessen Promotor direkt unterdrückt, der in Melanomzellen herabreguliert ist [322]. Darüber hinaus wurden bisher noch keine weiteren Arbeiten zur funktionellen Relevanz von SOX10 im UM publiziert.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das UM ist eine seltene Melanomform, für dessen Therapie im fortgeschrittenen Stadium bisher nur eingeschränkt wirksame Optionen zur Verfügung stehen. Abgesehen vom bispezifischen Molekül Tebentafusp, das einen Überlebensvorteil in einer Subgruppe von UM-Patienten erreichen konnte [178], existiert derzeit keine wirksame systemische Therapie des UM im metastasierten Stadium. Im Vergleich zum KM liegen im UM Mutationen in anderen und weniger Genen vor und die durch sie codierten Proteine können durch niedermolekulare Inhibitoren oder Antikörper derzeit klinisch nicht wirkungsvoll gehemmt werden. Daher besteht ein hoher medizinischer Bedarf, neue Zielstrukturen zu identifizieren, die im UM eine wichtige Rolle bei der Entstehung, dem Wachstum oder der Krankheitsprogression spielen und sich daher möglicherweise als Angriffspunkte für eine medikamentöse Therapie eignen könnten.

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass Transkriptionsfaktoren wie SOX10, Brn3a oder MSX1, welche bei der Entstehung der Melanozyten während der Embryogenese eine zentrale Rolle spielen, auch wichtig für die Proliferation, Migration und Invasion des KM sind [288, 295, 297, 323, 324]. Es ist jedoch unklar, ob insbesondere der Transkriptionsfaktor SOX10 auch im UM funktionell relevant ist.

In dieser Arbeit sollen daher folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Wird der Transkriptionsfaktor SOX10 im UM exprimiert?
2. Welche funktionelle Relevanz hat SOX10 im UM und ähnelt diese Rolle dem im KM, obwohl sich das UM und KM sowohl genetisch als auch klinisch grundsätzlich voneinander unterscheiden? Wie wirkt sich die Hemmung von SOX10 auf das Wachstum und Überleben der Zellen aus?
3. Welche Signalwege oder Zielgene sind an der Vermittlung der Effekte nach SOX10-Hemmung beteiligt?
4. Welche Faktoren beeinflusst SOX10 direkt und indirekt, um seine Funktionen im UM zu vermitteln und lassen sich diese Faktoren möglicherweise pharmakologisch modulieren und so für eine Systemtherapie des UM nutzen?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verwendete primäre Zellen und Zelllinien

2.1.1.1 Primäre Zellen

Tabelle 2: Verwendete primäre humane Zellen

Bezeichnung	Ursprung	Bestell-Nr., Herkunft
HM	Humane epidermale, neonatale Melanozyten aus gesunder Haut	FC-0019, Cell Systems Biotechnologie Vertrieb GmbH, Troisdorf, DEU

Primäre HM wurden bis maximal Passage 10 kultiviert.

2.1.1.2 Zelllinien

Tabelle 3: Verwendete uveale und kutane Melanomzelllinien

Bezeichnung	Melanom-Subtyp, Lokalisation	Genetische Veränderungen [320, 325-329]
92.1	Uveamelanom, Primärtumor	GNAQ ^{Q209L} , GNA11 ^{wt} , EIF1AX ^{G6D} , SF3B1 ^{wt} , Disomie 3, Zugewinn Chr. 6p, Zugewinn Chr. 8q
Mel270	Uveamelanom, Primärtumor (Rezidiv nach Bestrahlung)	GNAQ ^{Q209P} , GNA11 ^{wt} , EIF1AX ^{wt} , SF3B1 ^{wt} , Disomie 3, Tetrasomie 6p, Disomie 8
OMM1.5 (= OMM2.5)	Uveamelanom, Lebermetastase	GNAQ ^{Q209P} , GNA11 ^{wt} , EIF1AX ^{wt} , SF3B1 ^{wt}
Mel285	Uveamelanom, Primärtumor	GNA11 ^{wt} , Disomie 3, Verlust 3p26-pter, Verlust Chr. 6q, Tetrasomie 8q, Disomie 8p
Mel202	Uveamelanom, Primärtumor	GNAQ ^{Q209L} , GNAQ ^{R210K} , Disomie 3, Zugewinn Chr. 6p, Verlust Chr. 6q, Zugewinn Chr. 8q, EIF1AX ^{wt} , SF3B1 ^{R625G}
Mel290	Uveamelanom, Primärtumor	GNAQ ^{wt} , GNA11 ^{wt} , EIF1AX ^{wt} , SF3B1 ^{wt} , Disomie 3, Verlust Chr. 3p26-pter, Disomie 6, Disomie 8, Zugewinn Chr. 8q24.1-24.2

OMM-1	Uveamelanom, subkutane Metastase	GNAQ ^{wt} , GNA11 ^{Q209L} , Translokation (1; 3), Zugewinn Chr. 8p11, Zugewinn Chr. 16p12
OMM2.3	Uveamelanom, Lebermetastase	GNAQ ^{Q209P} , GNA11 ^{wt}
1205Lu	Kutanes Melanom, Lungenmetastase (Xenograft-Modell)	BRAF ^{V600E} , NRAS ^{wt} , c-KIT ^{wt} , CDK4 ^{K22Q}

Die Zelllinien Mel270, OMM1.5 und OMM2.3 stammen von verschiedenen Tumoren desselben Patienten und wurden aus einem Rezidiv des Primärtumors (Mel270) bzw. Lebermetastasen (OMM1.5, OMM2.3) generiert [330]. Die Zelllinie 1205Lu wurde aus einer Lungenmetastase generiert, die nach einer subkutanen Injektion der KM-Zelllinie WM793 in einem Xenograft-Mausmodell gewachsen war [331]. Die UM-Zelllinien 92.1, Mel270, OMM1.5 und Mel285 wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Klaus Griewank (Universitätsklinikum Essen), die UM-Zelllinien Mel202, Mel290, OMM-1, OMM2.3 und OMM2.5 von Prof. Dr. Martine Jager (Universitätsklinikum Leiden, Niederlande) und die KM-Zelllinie 1205Lu von Prof. Dr. Meenhard Herlyn (Wistar Institute, Philadelphia, USA) zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Reagenzien

Tabelle 4: Verwendete Reagenzien

Reagenz	Hersteller, Ort
Amersham™ ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont, GBR
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Antibiotic-Antimycotic (100x; Penicillin 10.000 U/ml, Streptomycin 10.000 µg/ml, Fungizone® (Amphotericin B) 25 µg/ml)	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Aqua ad iniectabilia	B. Braun, Melsungen, DEU
Aqua bidest für Laborzwecke	H. Kerndl GmbH, Weissenfeld, DEU
Bluing Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim, DEU
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ * 2H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
cOmplete™ Mini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche, Penzberg, DEU

Dako REAL Antibody Diluent	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
DermaLife® Basal Medium	LifeLine Cell Technology, Frederick, Maryland, USA
DermaLife® M LifeFactors Kit (für neonatale Melanozyten)	LifeLine Cell Technology, Frederick, Maryland, USA
Desoxynukleotid-Triphosphat-Set	Roche, Penzberg, DEU
Diethylcarbonat (DEPC)-H ₂ O	Merck, Darmstadt, DEU
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Ethanol	Merck, Darmstadt, DEU
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 0,5 M, pH 8,0	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Fötales bovines Serum (FBS) Superior	Millipore/Merck, Darmstadt, DEU
Glycerol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Hämatoxylin	Roche Diagnostics, Mannheim, DEU
Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, ohne Mg ²⁺ , Ca ²⁺)	Gibco® by Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Hematoxylin II	Roche Diagnostics, Mannheim, DEU
HLM006474	Selleck Chemicals LLC, Houston, Texas, USA
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure (HEPES), 1 M, pH 7,4	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
innuMIX qPCR DSGreen Standard	AJ Innuscreen GmbH, Berlin, DEU
Insulin solution human, 10 µg/µl	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Isopropanol	Merck, Darmstadt, DEU
jetPRIME® DNA & siRNA Transfection Reagent	Polyplus-transfection S.A., Illkirch, FRA
Kanamycin	Gibco® by Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Leibovitz's L-15 Medium	Gibco® by Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Lipofectamine® RNAiMAX	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Lipofectamine™ 3000 Reagent (inkl. P3000™ Reagent)	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Luria Broth (LB) Pulver	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
MCDB 153-Medium, Pulver	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Methanol	Merck, Darmstadt, DEU
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃), 7,5 %	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich Taufkirchen, DEU
NuPAGE™ Antioxidant	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X)	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (20X)	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X)	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
NuPAGE™ Transfer Buffer (20X)	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Opti-MEM™ serumreduziertes Medium	Gibco® by Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PCR-grade H ₂ O	Roche, Penzberg, DEU
Phosphate Buffered Saline (PBS), ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Klinikumsapotheke Großhadern, Klinikum der Universität München
Phosphate Buffered Saline (PBS), ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , steril	Gibco® by Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
PhosSTOP™ Phosphatase Inhibitor Tabletten	Roche, Penzberg, DEU
Propidiumjodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU

RNase A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega, Madison, Wisconsin, USA
RPMI1640 Medium (mit 2 mM Glutamin, ohne HEPES)	Gibco® by Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
S.O.C. Medium	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standard	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Select Agar™	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tazemetostat	Selleck Chemicals LLC, Houston, Texas, USA
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris), 1,0 M, pH 7,4	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Trypsin Neutralization Solution	LifeLine Cell Technology, Frederick, Maryland, USA
Trypsin-EDTA 0,5 %	Gibco® by Life Technologies/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Tween®-20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU
Western Blocking Reagent, 10x	Roche, Penzberg, DEU
Z-DEVD-FMK	Selleck Chemicals LLC, Houston, Texas, USA

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Tabelle 5: Verwendetes Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller, Ort
µltraAmp PCR-Reaktionsgefäße, 0,2 ml	Sorenson BioScience, Salt Lake City, Utah, USA
Aluminiumfolie	CeDo GmbH, Mönchengladbach, DEU
Amersham™ Hyperfilm™ ECL Röntgenfilme	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont, GBR
Einmalreaktionsgefäße, 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
FACS Tube, Polystyrene, 5 ml Round Bottom Tube	Falcon/Corning, New York, USA
Filtropur BT50, 500 ml, 0,2 µm Sterilfilter	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
Glaskapillare für LightCycler® 2.0	Roche, Penzberg, DEU
Halbmikro-Küvetten aus PMMA, 1,5 ml	BRAND, Wertheim, DEU
Invitrolon™ PVDF/Filter Paper Sandwiches, 0,45 µm, 8,3 x 7,3 cm (for mini gels)	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Kanüle Microlance™ 3, 20 G	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Kryoröhrchen, 2 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
NuPAGE™ 4- 12 %, Bis-Tris, 1,0 mm, Mini Protein Gel, 10-well	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA,
Optically Clear Adhesive Seal Sheets Klebefolien für qPCR-Platten	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
Parafilm M	Bemis, Soignies, BEL
Pasteurpipetten aus Glas	Hirschmann, Eberstadt, DEU
PCR-Platten, 96-Well, Halbrand, weiß, ABI-Typ	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA
PCR-Reaktionsgefäße, 0,6 ml	Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA
Petrischalen, 10 cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
Prospekthülle, glasklar	Vleveka, St. Deurne, NLD
Rotilabo® Spritzenfilter, 0,22 µm	Carl Roth, Karlsruhe, DEU

Rundbodenröhrchen, 12 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
Safe Seal Einmalreaktionsgefäße, 1,5 ml und 2,0 ml	Sarstedt, Nümbrecht, DEU
SafeSeal-Tips® premium, Volumina 100 – 1250 µl, 10 – 100 µl, 0,1 – 10 µl	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf, DEU
Spritze Discardit™ II, 10 ml und 20 ml	Becton-Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA
Stripette™ serologische Einmalpipetten, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning, New York, USA
Zellkulturflaschen, 25 cm ² (T25) und 75 cm ² (T75) mit Filterkappenverschluss	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
Zellkulturplatten, 12-, 24-, 48- und 96-Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, DEU
Zellkulturschalen, 10 cm	TPP, Trasadingen, CHE
Zellschaber, 24 cm	TPP, Trasadingen, CHE

2.1.4 Zellkulturmedien

2.1.4.1 Kultur primärer humaner Melanozyten

Tabelle 6: HM-Medium, 500 ml

Komponente	Menge	Endkonzentration
DermaLife® Basal Medium	485 ml	
rh-Insulin LifeFactor [5 mg/ml]	500 µl	5 µg/ml
Ascorbic Acid LifeFactor [50 mg/ml]	500 µl	50 µg/ml
L-Glutamine LifeFactor [200 mM]	15 ml	6 mM
Epinephrine LifeFactor [1 mM]	500 µl	1 µM
StiMel8™ LifeFactor	5 ml	
Calcium Chloride LifeFactor [2 mM]	500 µl	200 µM
Σ 500 ml		

Alle Komponenten mit Ausnahme des DermaLife® Basal Mediums sind Bestandteile des DermaLife® M LifeFactors Kits. Die Komponente StiMel8™ LifeFactor enthält FBS, humanes rekombinantes FGF-b, humanen rekombinanten epithelialen Wachstumsfaktor (EGF), Endothelin-1, Apo-Transferrin, Hydrocortison-Hemisuccinat und bovinen

Hypophysenextrakt; der Hersteller stellt jedoch keine weiteren Informationen zur Zusammensetzung bereit. Nach dem Mischen der Komponenten wurde das HM-Medium über einen Filtropur BT50-Filter sterilfiltriert und aliquotiert in mit Aluminiumfolie umwickelten 50 ml-Röhrchen lichtgeschützt kurzzeitig bei 4°C und längerfristig bei -20°C gelagert.

2.1.4.2 Kultur uvealer Melanomzelllinien

Medium zur Kultivierung der UM-Zelllinien 92.1, Mel270, OMM1.5, Mel285, Mel202, Mel290, OMM-1, OMM2.3 und OMM2.5.

Tabelle 7: Uvea-Medium, 500 ml

Komponente	Menge	Endkonzentration
RPMI1640-Medium (mit 2 mM Glutamin und Phenolrot, ohne HEPES)	450 ml	
FBS Superior	50 ml	10 %
Σ 500 ml		

Nach dem Mischen der Komponenten wurde das Uvea-Medium sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

2.1.4.3 Kultur der kutanen Melanomzelllinie 1205Lu

Das TU2%-Medium wurde für die Kultivierung der KM-Zelllinie 1205Lu verwendet.

Tabelle 8: TU2%-Medium, 500 ml

Komponente	Menge	Endkonzentration
MCDB 153-Medium	400 ml	80 %
Leibovitz's L-15 Medium	100 ml	20 %
FBS Superior	10 ml	2 %
Insulin solution human [10 µg/µl]	250 µl	5 µg/ml
CaCl ₂ -Lösung [2 M]	420 µl	1,68 mM
Σ 500 ml		

Für die Herstellung des MCDB 153-Mediums wurde 17,6 g MCDB-Mediumpulver (Sigma-Aldrich) in 900 ml Aqua ad iniectabilia aufgelöst, 15,7 ml NaHCO₃ (7,5 %) zugegeben und die Lösung mittels 3 N NaOH-Lösung unter Rühren auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Anschließend wurde Aqua ad iniectabilia bis zu einem Endvolumen von 1 Liter hinzugefügt, das Medium über einen Filtropur BT50-Filter sterilfiltriert und bei 4°C gelagert. Für die Herstellung des TU2%-Mediums wurden allen Komponenten gemischt, ebenfalls sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

2.1.4.4 Einfriermedium

Tabelle 9: Einfriermedium, 10 ml

Komponente	Menge	Endkonzentration
DMSO	1 ml	10 %
FBS Superior	9 ml	
Σ 10 ml		

Das Einfriermedium zur Kryokonservierung von Zellen in flüssigem Stickstoff wurde unmittelbar vor dem Einfrieren der Zellen hergestellt, mithilfe eines Spritzenfilters und einer 20 ml-Spritze sterilfiltriert und bis zur Verwendung bei 4°C vorgekühlt.

2.1.5 Puffer und Lösungen

2.1.5.1 Zellkultur

Tabelle 10: CaCl₂-Lösung, 2 M, 10 ml, für TU2%-Medium und Inkubationspuffer (Apoptose-FACS)

Komponente	Menge	Endkonzentration
Calciumchlorid Dihydrat (CaCl ₂ * 2H ₂ O)	2,94 g	2 M
H ₂ O (Aqua ad iniectionabilia)	Ad. 10 ml	

Die Lösung wurde mithilfe eines Spritzenfilters und einer 20 ml-Spritze sterilfiltriert und anschließend bei 4°C gelagert.

Tabelle 11: 1x Trypsin/EDTA-Lösung, 0,05 %, 50 ml

Komponente	Menge	Endkonzentration
Trypsin-EDTA 0,5 %	5 ml	1x (0,05 %)
HBSS	45 ml	
Σ 50 ml		

Die 1x Trypsin-EDTA-Lösung wurde kurzzeitig bei 4°C und für längere Zeit bei -20°C gelagert.

2.1.5.2 Transformation

Tabelle 12: Luria Broth (LB), 1 l

Komponente	Menge
Luria Broth Pulver*	25 g
H ₂ O (Aqua ad iniectabilia)	Ad. 1 l

* 25 g Luria Broth enthalten 10 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl

Das Luria Broth-Pulver wurde mithilfe eines Magnetrührers in H₂O gelöst, durch Autoklavieren sterilisiert und anschließend bei 4°C gelagert.

Tabelle 13: LB-Agar, 1 l

Komponente	Menge
Luria Broth Pulver*	25 g
Select Agar™	15 g
H ₂ O (Aqua ad iniectabilia)	Ad. 1 l

* 25 g Luria Broth enthalten 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g NaCl

Alle Komponenten wurden in H₂O mithilfe eines Magnetrührers gelöst, durch Autoklavieren sterilisiert und anschließend bei 4°C gelagert.

2.1.5.3 Genexpressionsanalysen

Tabelle 14: dNTP-Mix für qPCR, 10 mM, 200 µl

Komponente	Menge	Endkonzentration
dATP [100 mM]	20 µl	10 mM
dCTP [100 mM]	20 µl	10 mM
dGTP [100 mM]	20 µl	10 mM
dTTP [100 mM]	20 µl	10 mM
DEPC-H ₂ O	120 µl	
Σ 200 µl		

Alle Komponenten sind Bestandteile des Desoxynukleotidtriphosphat-(dNTP)-Sets (Roche) und wurden wie der dNTP-Mix bei -20°C gelagert.

2.1.5.4 Western Blot

Tabelle 15: 11 mM EDTA/PBS, 50 ml

Komponente	Menge	Endkonzentration
EDTA pH 8,0 [0,5 M]	1100 µl	11 mM
PBS (ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺)	48,9 ml	
Σ 50 ml		

Die Lösung wurde mithilfe eines Spritzenfilters und einer Spritze sterilfiltriert und bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

Tabelle 16: 5x CSH-Stock, 20 ml

Komponente	Menge	Endkonzentration
Tris, pH 7.4 [1 M]	5 ml	250 mM
NaCl [5 M]	5 ml	1,25 M
EDTA, pH 8,0 [0,5 M]	200 µl	5 mM
H ₂ O (Aqua ad iniectionabilia)	9,8 ml	
Σ 20 ml		

Die fertige Lösung wurde bei 4°C gelagert.

Tabelle 17: 1x CSH-Lysepuffer, 5 ml

Komponente	Menge
5x CSH-Stock	1 ml
Triton X-100 [10 %]	50 µl
7x cOmplete™ Mini Stock (1 Tablette in 1,5 ml H ₂ O gelöst, Lagerung bei -20°C)	750 µl
10x PhosSTOP™ Stock (1 Tablette in 1 ml H ₂ O gelöst, Lagerung bei -20°C)	500 µl
H ₂ O (Aqua ad iniectionabilia)	2,7 ml
Σ 5 ml	

Der 1x CSH-Lysepuffer wurde in 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Tabelle 18: 1x Laufpuffer, 1000 ml

Komponente	Menge
NuPAGE™ MES SDS Running Buffer (20X)	50 ml
ddH ₂ O (Aqua bidest für Laborzwecke)	950 ml
	Σ 1000 ml

Tabelle 19: 1x Transferpuffer, 500 ml

Komponente	Menge
NuPAGE™ Transfer Buffer (20X)	25 ml
NuPAGE™ Antioxidant*	500 µl
Methanol	50 ml (1 Gel) bzw. 100 ml (2 Gele)**
ddH ₂ O (Aqua bidest für Laborzwecke)	424,5 ml (1 Gel) bzw. 374,5 ml (2 Gele)**
	Σ 500 ml

*: maximal 30 min vor dem Transfer hinzugeben.

** : Beim Transfer von 2 Gelen wird der Methanol-Anteil im 1x Transferpuffer von 10 % auf 20 % erhöht und entsprechend das Volumen an ddH₂O verringert.

Tabelle 20: 1x Waschpuffer, 500 ml

Komponente	Menge	Endkonzentration
PBS	499,5 ml	
Tween®-20	500 µl	0,1 %
	Σ 500 ml	

Tabelle 21: 1x Blocking-Lösung, 550 ml

Komponente	Menge	Endkonzentration
PBS	450 ml	
Western Blocking Reagent, 10x	50 ml	
NaF [0,5 M]	50 ml	45,5 mM
	Σ 550 ml	

2.1.5.5 Durchflusszytometrie (FACS)

Tabelle 22: Inkubationspuffer, 50 ml, für Apoptose-FACS

Komponente	Menge	Endkonzentration
HEPES [1 M, pH 7,4]	500 µl	10 mM
NaCl [5 M]	1,4 ml	140 mM
CaCl ₂ [2 M]	125 µl	5 mM
H ₂ O (Aqua ad iniectabilia)	47,975 ml	
Σ 50 ml		

Die Lösung wurde sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Tabelle 23: Annexin-V-Färbelösung für Apoptose-FACS, Ansatz für 1 Probe

Komponente	Menge
Annexin-V-FLUOS	1 µl
Inkubationspuffer	50 µl
Σ 51 µl	

Tabelle 24: Propidiumjodid-Vorverdünnung für Apoptose-FACS, 100 µl

Komponente	Menge	Endkonzentration
Propidiumjodid [50 µg/ml]	10 µl	5 µg/ml
PBS	90 µl	
Σ 100 µl		

Die Vorverdünnung wurde lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Tabelle 25: Propidiumjodid-Färbelösung für Apoptose-FACS, Ansatz für 1 Probe

Komponente	Menge
Propidiumjodid-Vorverdünnung [5 µg/ml in PBS]	10 µl
Inkubationspuffer	50 µl
Σ 60 µl	

Tabelle 26: FACS-Waschpuffer, 50 ml, für Zellzyklus-FACS

Komponente	Menge	Endkonzentration
BSA	250 mg	0,5%
PBS	Ad. 50 ml	

Die Lösung wurde sterilfiltriert und anschließend bei 4°C gelagert.

Tabelle 27: Propidiumjodid-Stocklösung, 5 mg/ml, für Zellzyklus-FACS

Komponente	Menge	Endkonzentration
Propidiumjodid	50 mg	5 mg/ml
PBS	Ad. 10 ml	

Die Lösung wurde lichtgeschützt bei 4°C gelagert.

Tabelle 28: RNase A-Lösung, 10 mg/ml, für Zellzyklus-FACS

Komponente	Menge	Endkonzentration
RNase A	100 mg	10 mg/ml
PBS	Ad. 10 ml	

Die Lösung wurde aliquotiert bei -20°C gelagert.

Tabelle 29: Propidiumjodid-Färbelösung für Zellzyklus-FACS, Ansatz für 1 Probe

Komponente	Menge
Propidiumjodid-Stocklösung [5 mg/ml in PBS]	0,2 µl
RNase A-Lösung [10 mg/ml in PBS]	0,8 µl
FACS-Waschpuffer	300 µl
	Σ 301 µl

2.1.6 Kommerzielle Kits

Tabelle 30: Verwendete Kits

Kit	Hersteller	Verwendung
Annexin-V-FLUOS Staining Kit	Roche, Penzberg, DEU	Annexin-V-Färbung für Apoptosebestimmung (Durchflusszytometrie)
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega, Madison, Wisconsin, USA	Zellviabilitätsbestimmung
Expand™ Reverse Transcriptase	Roche, Penzberg, DEU	cDNA-Synthese
LightCycler® TaqMan® Master Kit	Roche, Penzberg, DEU	Quantitative Realtime-PCR
NucleoSpin® Plasmid (NoLid)	Macherey & Nagel, Düren, DEU	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific Waltham, Massachusetts, USA	Proteinkonzentrationsbestimmung
Proteome Profiler™ Array Human Phospho-Kinase-Array Kit	R & D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA	Semiquantitative Analyse der Phosphorylierung ausgewählter Proteine
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, DEU	DNase-Verdau während RNA-Isolierung
RNeasy® Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, DEU	RNA-Isolierung
ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit	Roche Diagnostics, Mannheim, DEU	Antikörper für Nachweis von immunhistochemischen Färbungen
Universal ProbeLibrary Set Human	Roche, Penzberg, DEU	Fluorescein (FAM)-markierte Hydrolyse-Sonden für quantitative Realtime-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
Venor®GeM Classic Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR	Minerva Biolabs, Berlin, DEU	Mykoplasmen-Detektion

2.1.7 Oligonukleotide

2.1.7.1 Primer für die quantitative Realtime-PCR (qPCR)

Alle qPCR-Primer wurden von der Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, DEU) in lyophilisierter Form bezogen und anhand der Herstellerangaben auf eine Stockkonzentration von 100 µM durch Zugabe von PCR-grade H₂O (Roche) gelöst. Für die Verwendung in den qPCR-Ansätzen wurde die Stockkonzentration mit PCR-grade H₂O auf eine Arbeitskonzentration von 10 µM verdünnt. Das Primerdesign der forward- (fw) und reverse (rev)-Primer und die Auswahl einer zum Primerpaar passenden Sonde wurde mithilfe des Assay Design Centers von Roche (https://lifescience.roche.com/en_de/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center) durchgeführt. Die Sonden stammten aus dem Universal ProbeLibrary Set Human (Roche).

Tabelle 31: Verwendete Primer für sondenbasierte qPCR

Zielgen	Primer-orientierung	Sequenz (5' → 3')	Sonde
<i>GAPDH</i>	Fw	AGCCACATCGCTCAGACAC	60
	Rev	GCCCAATACGACCAAATCC	
<i>MIA</i>	Fw	GGGCAAGTGGTGTATGTCT	16
	Rev	CAGATCTCCATAGTAATCTCCCTGA	
<i>MITF</i>	Fw	AGAGTCTGAAGCAAGAGCACTG	34
	Rev	TGCGGTCATTTATGTTAAATCTTC	
<i>PMP2</i>	Fw	TTGACGATTACATGAAAGCTCTG	48
	Rev	GCTGATGATCACAGTGGGTTT	
<i>SOX9</i>	Fw	GTACCCGCACTTGACACAAC	61
	Rev	TCGCTCTCGTTCAGAAGTCTC	
<i>SOX10</i>	Fw	GACCAGTACCCGCACCTG	61
	Rev	CGCTTGTCACCTTCGTTTCAG	

Nach der Produkteinstellung der Universal Probe Library und des Assay Design Centers Ende 2020 wurden die qPCR-Experimente mit dem interkalierenden DNA-Farbstoff dsGreen durchgeführt und für das Primerdesign neuer qPCR-Primer das Programm Primer-BLAST des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>) verwendet.

Tabelle 32: Verwendete Primer für qPCR mit interkalierendem Farbstoff dsGreen

Zielgen (Protein)	Primerorientierung	Sequenz (5' → 3')
<i>E2F1</i>	Fw	CCGTGGACTCTTCGGAGAACTT
	Rev	GGCTGATCCCACCTACGGTC
<i>EZH2</i>	Fw	ACTCAGAAGGCAGTGGAGCC
	Rev	GTCTGGCCCATGATTATTCTTCGT
<i>FGF9</i>	Fw	ACCACCTGGGTCAGTCCG
	Rev	GATAAATTCCAGAATGCCAAATCGG
<i>TFRC</i> (CD71)	Fw	GGAGGACGCGCTAGTGTCT
	Rev	GCCATCTACTTGCCGAGCCA

2.1.7.2 *Small interfering*-Ribonukleinsäuren (siRNAs)

Alle siRNAs wurden in lyophilisierter Form bezogen, anhand der Herstellerangaben auf eine Stockkonzentration von 100 µM gelöst und bei -20°C gelagert. Für die Arbeitskonzentration von 20 µM wurden Aliquots der Stocklösung im Verhältnis 1:5 mit DEPC-H₂O verdünnt und diese Verdünnungen ebenfalls bei -20°C gelagert.

Tabelle 33: Verwendete siRNAs

Name	Zielgen	Hersteller	Sequenz (5' → 3') oder Assay-ID
NT-siRNA	- (Kontroll-siRNA)	Eurofins Genomics	GCGCAUUC CAGCUUACGUATT
<i>Silencer® Select</i> MITF-siRNA	<i>MITF</i>	Thermo Fisher Scientific	s8792
SOX10-A-siRNA	<i>SOX10</i>	Eurofins Genomics	CCGUAUGCAGCACAAGAAATT
SOX10-B-siRNA	<i>SOX10</i>	Eurofins Genomics	GUAUGCAGCACAAGAAAGATT

2.1.8 Expressionsplasmide

Tabelle 34: Verwendete Expressionsplasmide

Name	Vektor-Backbone	Hersteller, Ort, Bestellnummer	Beschreibung
pCMV6-Entry	- (Leervektor)	OriGene, Rockville, Maryland, USA, PS100001	Leervektor mit C-terminalem Myc und FLAG®-Tag (Myc-DDK-Tag) Resistenz: Kanamycin 25 µg/ml
pCMV6-MITF-Myc-DDK	pCMV6-Entry	OriGene, RC209561	Expressionsvektor für konstitutive Expression von M-MITF (Transkriptvariante 4, melanozytäre Isoform) mit C-terminalem Myc und FLAG®-Tag (Myc-DDK-Tag) Resistenz: Kanamycin 25 µg/ml
pCMV6-XL5	- (Leervektor)	-	Leervektor generiert aus pCMV6-XL5-SOX10 (OriGene) durch Schneiden mit Enzym NotI und Religation des Vektor-Backbone Resistenz: Ampicillin 100 µg/ml
pCMV6-XL5-SOX10	pCMV6-XL5	OriGene, SC123774	Expressionsvektor für konstitutive Expression von SOX10 Resistenz: Ampicillin 100 µg/ml

2.1.9 Antikörper

2.1.9.1 Primäre Antikörper

Tabelle 35: Verwendete Primärantikörper für Proteinexpressionsanalysen

Bezeichnung	Spezies	Bestell-Nr.	Hersteller, Ort	Verdünnung
anti-β-Aktin	mouse	A1978	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, DEU	1:5.000
anti-Akt	rabbit	9272	Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA	1:1.000

anti-phospho-Akt Ser473	rabbit	9271	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-Bak	rabbit	3814	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-Bax	mouse	sc-20067	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA	1:1.000
anti-Bcl-2	mouse	OP60	Calbiochem/Merck, Darmstadt, DEU	1:100
anti-Bcl-2	rabbit	4223	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-Bcl-X _L	rabbit	2762	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-Bcl-w	rabbit	2724	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-Caspase 3	rabbit	9662	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-Caspase 9	rabbit	9502	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-CD71	rabbit	13113	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-CDK2	rabbit	2546	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-Cyclin A2	rabbit	67955	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-Cyclin D1	mouse	33-3500	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	1:1.000
anti-Cyclin E1	mouse	4129	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-Cytochrom C	mouse	556433	BD Pharmingen, Franklin Lakes, New Jersey, USA	1:500
anti-E2F1	mouse	ab4070	Abcam, Cambridge, GBR	1:500
anti-ERK1/2 (p44/42 MAP Kinase)	rabbit	9102	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-phospho-ERK1/2 Thr202/Tyr204	mouse	9106	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-EZH2	mouse	3147	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-FGF9/GAF	rabbit	ab206408	Abcam	1:1.000
anti-FLAG®	rabbit	14793	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-phospho H2A.X (gamma = γ-H2A.X)	rabbit	9718	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-MITF	rabbit	12590	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-Myc-Tag	mouse	2276	Cell Signaling Technology	1:1.000

anti-p21	rabbit	2947	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-p27	mouse	sc-1641	Santa Cruz	1:200
anti-p38	rabbit	9212	Cell Signaling Technology	1:1000
anti-phospho-p38 MAP Kinase Thr180/Tyr182	rabbit	9211	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-p53	mouse	OP43	Calbiochem	1:1.000
anti-PARP	rabbit	9542	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-Rb	rabbit	9309	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-phospho-Rb Ser780	rabbit	8180	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-phospho-Rb Ser795	rabbit	9301	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-phospho-Rb Ser807/811	rabbit	8516	Cell Signaling Technology	1:1.000
anti-SOX10	mouse	sc- 365692	Santa Cruz	1:500

2.1.9.2 Sekundäre Antikörper

Tabelle 36: Verwendete HRP-gekoppelte Sekundärantikörper für Proteinexpressionsanalysen

Reaktivität	Spezies	Bestell-Nr.	Hersteller	Verdünnung
anti-mouse	horse	7076	Cell Signaling Technology	1:5.000
anti-rabbit	goat	7074	Cell Signaling Technology	1:2.000

2.1.9.3 Neutralisierende und blockierende Antikörper

Tabelle 37: Neutralisierende und blockierende Antikörper gegen FGF9 und Transferrin-Rezeptor (CD71)

Bezeichnung	Spezies	Bestell-Nr.	Hersteller, Ort
anti-FGF9	mouse	MAB273-100	R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA
anti-TfR (Transferrin-Rezeptor, CD71)	goat	AF2474	R&D Systems

2.1.9.4 Primärer Antikörper für immunhistochemischen SOX10-Nachweis

Tabelle 38: Primärer Antikörper für immunhistochemischen SOX10-Nachweis

Bezeichnung	Spezies	Bestell-Nr.	Hersteller, Ort	Verdünnung
SOX-10 (EP268)	rabbit	383R-16	Cell Marque, Rocklin, Kalifornien, USA	1:100

2.1.10 Geräte

Tabelle 39: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller, Ort	Verwendung
800 Series-150	Jutta Ohst german-cryo GmbH, Jüchen, DEU	Kryotank zur Lagerung von Zellen in flüssigem Stickstoff
Analysenwaage BP210D	Sartorius Lab Instruments GmbH, Göttingen, DEU	Abwiegen von Reagenzien
Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena, DEU	Fluoreszenzmikroskop mit Kamera
BZ-X800	Keyence Deutschland, Neu- Isenburg, DEU	Fluoreszenzmikroskop mit Kamera
Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, DEU	Tischzentrifuge für 1,5 ml- und 2 ml-Reaktionsgefäße
Centrifuge 5415 R	Eppendorf, Hamburg, DEU	Kühlzentrifuge für 1,5 ml- und 2 ml-Reaktionsgefäße
Cryo Cooler® Einfrier- box	VWR International, Radnor, Pennsylvania, USA	Einfrieren von Zellen
CytoFluor™ 2350	Millipore/Merck, Darmstadt, DEU	Plattenphotometer
Eismaschine	ZIEGRA-Eismaschinen, Isernhagen, DEU	Eisproduktion
FACScan	Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA	Durchflusszytometrie
FACSCanto II	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA	Durchflusszytometrie
GeneExplorer	Bioer Technology, Hangzhou, CHN	Thermocycler, cDNA-Synthese

GloMax® Explorer	Promega, Madison, Wisconsin, USA	Plattenphotometer
Heracell CO ₂ Incubator	Heraeus, Hanau, DEU	Brutschrank zur Kultivierung von HM und Melanomzellen
ImageQuant LAS4000	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont, GBR	Detektionsgerät für Chemilumineszenz (Western Blot)
Infinite 200 PRO	Tecan, Grödig, AUT	Plattenphotometer
LightCycler® 2.0	Roche, Mannheim, DEU	Quantitative Realtime-PCR
MicroAmp® Adhesive Film Applicator	Applied Biosystems/ Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA	Applikator zum Aufdrücken von Klebefolien auf qPCR-Platten
Microfuge® 22R Centrifuge	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA	Kühlzentrifuge für 1,5 ml- und 2 ml-Reaktionsgefäße
Mini BlotBoy™	Benchmark Scientific, Edison, New Jersey, USA	Schüttler für Western Blot
Nanodrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Delaware, USA	Spektrophotometer
pH-Meter HI 2211-02	Hanna Instruments Deutschland, Vöhringen, DEU	pH-Wert-Einstellung von Lösungen und Puffern
Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH, Kelheim, DEU	Schüttler für Western Blot
PowerPac Basic™	Bio-Rad, München, DEU	Stromquelle für SDS-PAGE und Tank Blot (Western Blot)
qTower ³	Analytik Jena, Jena, DEU	Quantitative Realtime-PCR
RoboCycler® Gradient 96	Stratagene, La Jolla, Kalifornien, USA	Thermocycler, cDNA-Synthese
RP X-OMAT	Kodak, Stuttgart, DEU	Röntgenfilm-Entwicklung
Schüttelinkubator CH-4103	Infors HAT, Einsbach, DEU	Schüttelinkubator für Bakterienkultivierung
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus, Hanau, DEU	Steriles Arbeiten, Zellkultur
Sicherheitswerkbank Klasse II Typ A/B3	NuAire, Plymouth, Massachusetts, USA	Steriles Arbeiten, Zellkultur

SmartSpec 3000	Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA	Photometer zur RNA-, DNA- und Protein-Konzentrationsbestimmung
Swip KL-2 Schüttler	Edmund Bühler, Hechingen, DEU	Schüttler zum Schwenken von Western Blot-Membranen
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, DEU	Proteindenaturierung
Tischzentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau, DEU	Zentrifugieren von 15 ml- und 50 ml-Röhrchen
Tischzentrifuge Rotixa 50 RS	Hettich, Baech, CHE	Zentrifugieren von 15 ml- und 50 ml-Röhrchen
Ultra-Low Temperature Freezer	New Brunswick/Eppendorf, Hamburg, DEU	-80°C Kühltruhe, Probenaufbewahrung
VARIOKLAV® Dampfsterilisator 500 E	H&P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, DEU	Autoklavieren von Glas- und Plastikwaren
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA	Mixen
Wasserbad U3	Bachofen Laboratoriumsgeräte, Reutlingen, DEU	cDNA-Synthese
XCell II™ Blot Module	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Tank Blot (Western Blot)
XCell SureLock® Mini-Cell Electrophoresis System	Invitrogen/Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Natriumlaurylsulfat – Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) (Western Blot)
Zählkammer Neubauer <i>improved</i>	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, DEU	Zellzahlbestimmung

2.1.11 Software

Tabelle 40: Verwendete Programme

Programm	Unternehmen, Ort	Verwendung
Assay Design Center	Roche, (https://lifescience.roche.com/en_de/brands/universal-probe-library.html#assay-design-center)	Primerdesign für quantitative Realtime-PCR

AxioVision, Version 4.7.2	Carl Zeiss, Jena, DEU	Mikroskopsteuerung
CellQuest	Becton-Dickinson, Heidelberg, DEU	Durchflusszytometrie (Apoptose-/ Zellzyklus-FACS)
FACSDiva	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA	Durchflusszytometrie (Apoptose-/ Zellzyklus-FACS)
FlowJo, Version 10.8.1	BD Biosciences, San Jose, Kalifornien, USA	Durchflusszytometrie (Apoptose-/ Zellzyklus-FACS)
GraphPad Prism, Version 5	GraphPad Software (https://www.graphpad.com , San Diego, Kalifornien, USA)	Statistische Berechnungen
i-control 1.8, Version 3.1.10.0	Tecan, Grödig, AUT	Plattenphotometer
Illustrator, Versionen CS5 und CC 2018	Adobe Systems Inc., San Jose, Kalifornien, USA	Grafikerstellung
Image J	Fiji (https://Fiji.sc)	Densitometrische Ana- lysen
ImageQuant LAS4000, Version 1.3	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont, GBR	Chemilumineszenzde- tektion
Microsoft Office 2016	Microsoft, Redmont, Washington, USA	Auswertung, Dokumen- tation
Nanodrop 2000c, Ver- sion 1.4.2	Thermo Fisher Scientific, Wilmington, Dela- ware, USA	RNA-, DNA- und Pro- teinkonzentrationsbe- stimmung
Photoshop, Versionen CS2 und CC 2018	Adobe Systems Inc., San Jose, Kalifornien, USA	Bildbearbeitung

Primer-BLAST	National Center for Biotechnology Information (NCBI) (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi)	Primerdesign für quantitative Realtime-PCR
qPCRsoft, Version 4.1.3.0	Analytik Jena, Jena, DEU	Quantitative Realtime-PCR
QuPath, Version 0.3.2	QuPath (https://qupath.github.io)	Bildanalyse-Software
R Studio	Posit PBC, Boston, Massachusetts, USA	Bioinformatische Analysen (RNA-Sequenzierung, Netzwerkerstellung)
SPSS Statistics, Version 28.0.0.0	IBM, Armonk, New York, USA	Statistische Berechnungen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Kultivierung von kutanen bzw. Uveamelanom-Zelllinien

Alle Zelllinien wurden bei einer Konfluenz von 80 bis 90 % 2x pro Woche passagiert. Dafür wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen mit HBSS (13 ml für T75-Zellkulturfläche, 5 ml für T25-Zellkulturflasche) gewaschen, 2 ml 1x Trypsin/EDTA-Lösung 0,05 % zugegeben und durch Schwenken gleichmäßig verteilt. Nach einer Inkubationszeit von etwa 2 bis 5 min bei RT wurden die abgelösten Zellen mit 8 ml Medium (TU2% für KM-Zelllinie 1205Lu, Uvea-Medium für UM-Zelllinien) abgespült, um den enzymatischen Verdau abzustoppen und in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden dann in einer großen Tischzentrifuge zentrifugiert (1.000 Umdrehungen pro min (rpm), 3 min, RT), der Überstand abgenommen und das Pellet im jeweiligen Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann im gewünschten Verhältnis (zwischen 1:3 und 1:6) in einem Gesamtvolumen von 13 ml Medium (T75) bzw. 5 ml (T25) in einer neuen Zellkulturflasche ausgesät. Nach der Zugabe von Antibiotic-Antimycotic (100x) im Verhältnis 1:100 wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden regelmäßig mithilfe des Venor®GeM Classic Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR (Minerva Biolabs, Berlin, DEU) nach Herstellerangaben auf eine Kontamination mit Mykoplasmen kontrolliert.

2.2.1.2 Kultivierung von humanen Melanozyten

Die Kultivierung und Passagierung der HM erfolgte analog zu Punkt 2.2.1.1 mit wenigen Änderungen. Da das HM-Medium kein FBS enthält, wurde der enzymatische Verdau durch Trypsin nach dem Ablösen der Zellen durch Zugabe von 2 ml Trypsin Neutralization Solution neutralisiert, bevor die Zellen mit 6 ml HM-Medium abgespült, in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und dann zentrifugiert wurden. Die Aussaat und Kultivierung der Zellen erfolgte in HM-Medium und Zusatz von 1x Antibiotic-Antimycotic. Da es sich bei den HM um primäre Zellen handelt, wurden diese nur bis Passage 10 kultiviert.

2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden in einer T75-Zellkulturflasche wachsende Zellen mit einer Konfluenz von 80 bis 90 % wie oben beschrieben mittels Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und das Zellpellet in 3 ml kaltem Einfriermedium resuspendiert. Anschließend wurde je 1 ml dieser Zellsuspension in vorgekühlte Kryoröhrchen überführt. Diese wurden unmittelbar danach in eine mit Isopropanol gefüllte Cryo Cooler® Einfrierbox gestellt, die Zellen darin über Nacht bei -80°C eingefroren, anschließend in einen Kryotank mit flüssigem Stickstoff überführt und dort bei -180°C gelagert. Zum Auftauen der Zellen wurden die gefrorenen Kryoröhrchen kurz bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert, bis die Zellsuspension aufgetaut war. Diese wurde unmittelbar danach in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt, in dem 20 ml Medium vorgelegt waren, zentrifugiert (1.000 rpm, 3 min, RT) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in einer T75-Flasche in 13 ml Medium oder T25-Flasche in 5 ml Medium jeweils mit 1x Antibiotic-Antimycotic-Zusatz ausgesät und bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Das Medium wurde am Folgetag ausgetauscht, um verbliebenes DMSO aus dem Einfriermedium sowie tote Zellen zu entfernen.

2.2.2 Transfektionen

2.2.2.1 Transfektion von siRNAs

Die RNA-Interferenz ist eine Variante der post-transkriptionellen Regulation, um die Expression eines bestimmten Genes durch die Degradierung seiner mRNA zu verringern [332]. Bei diesem Prozess wird zuerst eine doppelsträngige RNA (dsRNA) durch die Ribonuclease Dicer in kurze, 21 bis 23 bp lange dsRNA-Moleküle, die siRNAs, gespalten, die an ihrem 3'-Ende einen 2 Nukleotide umfassenden Überhang aufweisen [333]. Das noch doppelsträngige RNA-Molekül wird dann entwunden und ein Strang in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) integriert, wodurch der RISC an die entsprechende Ziel-mRNA geleitet wird, dort bindet und gebundene mRNA schneiden kann [333]. Die siRNA muss dabei nicht exakt komplementär zur Ziel-mRNA sein, um deren Degradierung zu erreichen [334]. Die RNA-Interferenz kann man nutzen, um spezifisch einzelne Gene *in vitro* auszuschalten, indem man kurze, 21 Nukleotide umfassende dsRNA für eine spezifische mRNA designt, chemisch synthetisiert und wie in dieser Arbeit durchgeführt durch Verpackung in kationische Liposomen in die Zellen einbringt, also eine Transfektion durchführt [335, 336].

Für die Transfektion von siRNAs in HM mithilfe des jetPRIME® DNA & siRNA Transfection Reagent wurden zuerst 100.000 Zellen pro Well in eine 6-Well-Platte ausgesät und diese über Nacht bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Am Tag der Transfektion wurden pro Well 200 µl jetPRIME® Buffer und 2,2 µl siRNA (Konzentration 20 µM) gemischt und dann 4 µl jetPRIME®-Transfektionsreagenz zugegeben. Der Ansatz wurde 10 s durch Vortexen gemischt und 10 bis 15 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der am Vortag ausgesäten Zellen durch 2 ml neues HM-Medium ohne Antibiotika- und Antimykotikazusatz ersetzt. Nach abgeschlossener Inkubation wurden pro Well 206 µl des Transfektionsansatzes tropfenweise auf die Zellen pipettiert und die Platten bei 37°C und 5 % CO₂ für 24h bis 96h inkubiert.

Für die siRNA-Transfektionen der KM- und UM-Zelllinien wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine® RNAiMAX verwendet. Am Tag vor der Transfektion wurden in eine 6-Well-Platte je nach Zellart und Inkubationsdauer 80.000 bis 150.000 Zellen pro Well in TU2% bzw. Uvea-Medium ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden zunächst die siRNAs (Tabelle 41) bzw. das Transfektionsreagenz (Tabelle 42) in zwei getrennten Reaktionsgefäßen vorverdünnt.

Tabelle 41: siRNA-Vorverdünnung, Ansatz für 1 Well einer 6-Well-Platte

Komponente	1x
1,5 µl siRNA [20 µM]	1,5 µl
Opti-MEM™ Medium	125 µl

Tabelle 42: RNAiMAX- Vorverdünnung, Ansatz für 1 Well einer 6-Well-Platte

Komponente	1x
Lipofectamine® RNAiMAX	1,25 µl
Opti-MEM™ Medium	125 µl

Anschließend wurde die RNAiMAX-Verdünnung zur siRNA-Verdünnung gegeben, vorsichtig gemischt und der Ansatz für 10 bis max. 20 min bei RT für die Ausbildung der siRNA-Liposomkomplexe inkubiert. Vor der tropfenweisen Zugabe von 250 µl Transfektionsansatz pro Well wurde das Medium vom Vortag durch 1250 µl neues Medium (je nach Zellart TU2% oder Uvea-Medium) ohne Antibiotics/Antimycotics ersetzt. Die Zellen wurden anschließend bei 37°C und 5 % CO₂ für 24h bis 96h inkubiert. Die finale siRNA-Konzentration im Well betrug 20 nM in beiden hier beschriebenen Protokollen.

2.2.2.2 Transfektion von Expressionsplasmiden

Für die Transfektion der Expressionsplasmide wurden die Zellen am Vortag wie oben beschrieben in 6-Well-Platten ausgesät. Am Tag der Transfektion wurden dann zunächst

der Plasmid-DNA-Ansatz (Tabelle 43) und der Lipofectamine™ 3000-Ansatz (Tabelle 44) in zwei 1,5 ml-Reaktionsgefäßen angesetzt und durch kurzes Vortexen gemischt.

Tabelle 43: Ansatz für Plasmid-DNA-Transfektion, Ansatz für 1 Well einer 6-Well-Platte

Komponente	1x
Plasmid-DNA	2,5 µg
P3000™ Reagent	2 µl
Opti-MEM™ Medium	125 µl

Tabelle 44: Lipofectamine™ 3000-Ansatz, Ansatz für 1 Well einer 6-Well-Platte

Komponente	1x
Lipofectamine™ 3000 Reagent	3,75 µl
Opti-MEM™ Medium	125 µl

Dann wurde der Lipofectamine™ 3000-Ansatz zum Plasmid-DNA-Ansatz hinzugefügt und durch Pipettieren vorsichtig miteinander vermischt. Anschließend wurde der Ansatz für die Ausbildung der Liposomkomplexe für 10 bis 15 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium von den Zellen abgenommen und durch 2 ml neues Kulturmedium ohne Antibiotika- und Antimykotikazusätze ersetzt, bevor 250 µl Transfektionsansatz pro Well tropfenweise auf die Zellen pipettiert wurden. Die Zellen wurden dann bei 37°C, 5 % CO₂ für 12h bis 72h inkubiert.

2.2.2.3 Sequenzielle Transfektion von Expressionsplasmiden und siRNAs

Im Rahmen von Rescue-Experimenten wurden Transfektionen von Expressionsplasmiden und siRNAs in kurzem zeitlichen Abstand durchgeführt, um gleichzeitig eine ektopische Expression von MITF und Hemmung von SOX10 zu erzielen. Da für die Transfektionen unterschiedliche Transfektionsreagenzien verwendet werden mussten, die beide die Zellviabilität *per se* bereits verringern können, wurden die Transfektionen mit zeitlichem Abstand zueinander durchgeführt. Zuerst wurden an Tag 1 225.000 Zellen/Well in 6 Well-Platten ausgesät. An Tag 2 erfolgte dann die Plasmid-Transfektion mit 2,5 µg MITF-Myc-DDK-Plasmid, dem Kontrollvektor pCMV6-Entry oder einem Transfektions-Ansatz ohne Plasmid-DNA wie in Abschnitt 2.2.2.2 beschrieben. Nach 16h wurden die Zellen 2x mit Medium gewaschen und dann mit SOX10-B-siRNA, Kontroll-siRNA oder dem siRNA-Transfektionsreagenz ohne siRNA transfiziert (siehe Abschnitt 2.2.2.1). Nach 24h und 48h wurde die Zellviabilität bestimmt und die Zellen für Proteinexpressionsanalysen wie in Abschnitt 2.2.5.1 beschrieben geerntet.

2.2.3 Transformation, Kultivierung, Lagerung und Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*

2.2.3.1 Herstellung von LB-Agar-Platten mit Selektionsantibiotikum

Die LB-Agar-Platten mit Selektionsantibiotikum wurden hergestellt, indem der bei 4°C gelagerte LB-Agar in einer Mikrowelle bei 180 Watt für 5 bis 10 min verflüssigt wurde. Anschließend wurden 50 ml in ein 50 ml-Reaktionsgefäß abgefüllt, die Lösung bis auf etwa 40°C abgekühlt und das jeweilige Selektionsantibiotikum in der gewünschten Konzentration (Kanamycin: 25 µg/ml bzw. Ampicillin: 100 µg/ml) der flüssigen LB-Agar-Lösung zugesetzt. Anschließend wurden in einer Sicherheitswerkbank je 15 ml der warmen LB-Agar-Lösung in eine Petrischale (Ø 10 cm) abgefüllt und die Schalen ohne Deckel für einige Stunden stehen gelassen, bis eine feste Agarschicht entstanden war. Nach dem Aufsetzen der Deckel wurden die Platten mit Parafilm M abgedichtet und mit der Agarseite nach oben für maximal 4 Wochen bei 4°C aufbewahrt.

2.2.3.2 Transformation von *E. coli* DH5α

Für die Übertragung von Plasmid-DNA in kompetente Bakterien (Transformation) wurden zuerst 200 µl chemisch kompetente, bei -80°C gelagerte *E. coli*-Bakterien des Laborstammes DH5α auf Eis aufgetaut und in 12 ml-Rundbodenröhrchen überführt. Zu den Bakterien wurde dann 1 bis 10 ng Plasmid-DNA hinzugefügt und das Röhrchen auf Eis für 40 min inkubiert. Der Ansatz wurde danach für 90 s im Wasserbad bei 42°C inkubiert, um die Aufnahme des Plasmids mittels Hitzeschockmethode zu induzieren und dann für 2 min auf Eis wieder abgekühlt. Anschließend wurden 800 µl S.O.C. Medium hinzugefügt, die Bakteriensuspension in einem Schüttelinkubator (Infors) bei 37°C, 300 rpm für 1h inkubiert und schließlich 100 µl des Ansatzes auf eine LB-Agar-Platte mit Selektionsantibiotikum ausplattiert. Die Platte wurde dann über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden entweder direkt einzelne gewachsene Kolonien gepickt, um Übernachtskulturen anzulegen (siehe 2.2.3.3), oder die Platte wurde mit Parafilm M abgedichtet und mit der Agarseite nach oben bis zur weiteren Verwendung bei 4°C aufbewahrt.

2.2.3.3 Kultivierung und Lagerung von transformierten *E. coli*

Um einzelne Kolonien transformierter *E. coli* DH5α für verschiedene weitere Anwendungen zu expandieren, wurden Übernachtskulturen angelegt. Dazu wurde jeweils 1 Kolonie gepickt und damit 5 ml LB-Medium inklusive Selektionsantibiotikum in einem 50 ml-Reaktionsgefäß angeimpft. Die Reaktionsgefäße wurden dann für 12h bis maximal 16h in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 300 rpm inkubiert. Für die längerfristige Lagerung der transformierten *E. coli* wurden 800 µl der Übernachtskultur mit 200 µl sterilautoklaviertem 87 % Glycerol vermischt und bei -80°C gelagert.

2.2.3.4 Isolierung und Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus den transformierten *E. coli*-Bakterien wurden zuerst Übernachtskulturen angelegt (siehe Abschnitt 2.2.3.3). Aus dieser wurden 2 ml

Bakteriensuspension in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, in einer kleinen Tischzentrifuge mit 11.000 g für 30 s zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und anschließend die Plasmid-DNA aus dem Bakterienpellet nach Angaben des Herstellers mit dem NucleoSpin® Plasmid (NoLid) Kit (Macherey & Nagel) isoliert. Für die Konzentrationsbestimmung wurden 4 µl DNA in 76 µl DEPC-H₂O im Verhältnis 1:20 verdünnt, in eine Quartz-Küvette überführt, die optische Dichte bei 260 nm (A₂₆₀), 280 nm und 320 nm in einem SmartSpec 3000 Photometer (Bio-Rad) bestimmt und die DNA-Konzentration berechnet:

$$c(DNA)[\mu g/\mu l] = A_{260} * 20 \text{ (Verdünnungsfaktor)} * 50 \mu g/\mu l \text{ (Umrechnungsfaktor)}$$

Für den Referenzwert ($c = 0 \mu g/\mu l$) wurde die Küvette mit 4 µl Elutionspuffer in 76 µl DEPC-H₂O befüllt und vermessen. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei -20°C.

2.2.4 Genexpressionsanalysen

2.2.4.1 RNA-Isolierung und Konzentrationsbestimmung

Für die RNA-Isolierung wurde zuerst das Medium von den in 6-Well-Platten kultivierten Zellen abgesaugt und diese 2x mit je 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde die RNA mithilfe des RNeasy® Mini Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert. Die aufgereinigte RNA wurde durch Zugabe von 30 µl RNase-freiem H₂O von der Säule eluiert. Die Konzentrationsbestimmung wurde an einem SmartSpec 3000 Photometer in einer Quartz-Küvette bzw. an einem Nanodrop 2000c Spektrophotometer (Thermo) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80°C.

2.2.4.2 cDNA-Synthese

Die *complementary DNA* (cDNA)-Synthese wurde mit dem Expand™ Reverse Transcriptase-Kit (Roche) und Oligo-(dT)₁₅-Primern durchgeführt. Dabei wird nur die mRNA aus dem Pool der Gesamt-RNA mithilfe des Enzymes Reverse Transkriptase und Oligo-(dT)₁₅-Primern, die selektiv an den poly-(A)-Schwanz von mRNAs binden, in einen komplementären DNA-Strang (= cDNA) umgeschrieben, der anschließend mittels PCR vervielfältigt werden kann [337]. Zuerst wurden 1000 ng RNA in einem PCR-Reaktionsgefäß mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 8,5 µl verdünnt, 2 µl Oligo-(dT)₁₅-Primer (250 ng/µl, Eurofins Genomics, Ebersberg, DEU) zugegeben und der Ansatz in einem RoboCycler® Gradient 96 (Stratagene) bzw. GeneExplorer Thermocycler (Bioer) bei 65°C für 10 min inkubiert, um die RNA zu denaturieren. Danach wurde der Ansatz auf Eis gestellt, 9,5 µl Reverse Transkriptase-Mix (Tabelle 45) hinzupipettiert und für 1h bei 42°C inkubiert.

Tabelle 45: Reverse Transkriptase-Mix

Komponente	Menge
5x Expand™ Reverse Transcriptase Buffer *	4 µl
Dithiothreitol (DTT) [0,1 M] *	2 µl
dNTPs [je 10 mM]	2 µl
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	0,5 µl
Expand™ Reverse Transcriptase *	1 µl
	Σ 9,5 µl

*: Komponenten des Expand™ Reverse Transcriptase-Kits (Roche)

Die fertig transkribierte cDNA wurde anschließend durch Zugabe von DEPC-H₂O im Verhältnis 1:3 verdünnt und bei -80°C gelagert.

2.2.4.3 Quantitative Realtime-PCR (qPCR)

Die Analyse der Genexpression wurde mittels qPCR bestimmt. Das Verfahren beruht auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), bestehend aus Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer („Annealing“) und Elongation des DNA-Strangs durch eine DNA-Polymerase; allerdings wird die Menge des entstehenden PCR-Amplikons nicht erst am Ende der PCR, sondern bereits während des PCR-Vorgangs nach jedem Amplifikationszyklus und somit in Echtzeit mithilfe von Fluoreszenzfarbstoffen bestimmt [338]. Diese können entweder interkalierende Farbstoffe sein, die an doppelsträngige DNA (dsDNA) binden, oder Fluoreszenzfarbstoffe, die an komplementär bindende Sonden (z.B. TaqMan®) gekoppelt sind [338]. Für diese Arbeit wurde beide Detektionsvarianten verwendet. Farbstoffe wie SYBR® Green I oder das Analogon dsGreen fluoreszieren nur, wenn sie an dsDNA binden; dadurch ist die Fluoreszenzintensität im PCR-Ansatz proportional zur entstehenden Menge an dsDNA [338]. Allerdings binden die Farbstoffe auch an Primer-Dimere oder unspezifische Amplifikationsprodukte, weshalb die Methode weniger sensitiv als die sondenbasierten Methoden sind. [338]. Für den sondenbasierten Ansatz wurden Hydrolyse-Sonden aus der 165 Sonden umfassenden Universal Probe Library (Roche) verwendet [339]. Die Sonden bestehen aus 8 bis 9 bp langen Oligonukleotiden und enthalten modifizierte DNA-Analoga (*locked nucleic acids*), die stärker als normale DNA-Nukleotide binden und dadurch die Schmelztemperatur und Thermostabilität der Sonde erhöhen [339]. An das 5' Ende der Sonde ist der Fluoreszenzfarbstoff FAM und an das 3' Ende ein sogenannter Quencher gekoppelt, welcher die FAM-Fluoreszenzintensität stark verringert [338, 339]. Die Sonde analog zu den Primern während des Annealingschrittes komplementär an das DNA-Amplikon und wird während des Elongationsschrittes durch die 5'-Endonuklease-Fähigkeit der DNA-Polymerase abgebaut [338]. Dabei wird der Fluoreszenzfarbstoff vom Quencher getrennt, sodass die Hemmung der Fluoreszenz wegfällt und ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann [338].

Die sondenbasierte qPCR wurde mithilfe des Glaskapillarsystems von Roche durchgeführt. Dafür wurde zuerst ein Mastermix-Ansatz (Tabelle 46) erstellt, 7 µl davon in die Öffnung einer Glaskapillare pipettiert, 3 µl der zuvor mit DEPC-H₂O im Verhältnis 1:3 verdünnten cDNA (sowohl Proben als auch Standards) zugegeben, die Glaskapillare verschlossen und mithilfe eines vorgekühlten Kapillarenadapters in einer kleinen Tischzentrifuge (Eppendorf) abzentrifugiert (1.000 rpm, 30 s, 4°C). Die Kapillaren wurden dann in das Karussellsystem des PCR-Geräts überführt und die Reaktion in einem LightCycler® 2.0 (Roche) mit dem in Tabelle 47 aufgeführten Programm durchgeführt.

Tabelle 46: qPCR-Mastermix für sondenbasierte qPCR, Ansatz für 1 Probe

Komponente	Menge	Endkonzentration
PCR-grade H ₂ O	4,5 µl	
Sonde (passend zum Primerpaar, aus Universal Probe Library) [10 µM]	0,1 µl	100 nM
Primer forward [10 µM]	0,2 µl	200 nM
Primer reverse [10 µM]	0,2 µl	200 nM
5x Mastermix*	2 µl	
Σ 7 µl		

* aus LightCycler® TaqMan® Master Kit: 10 µl aus Vial 1a (Enzym) zu Vial 1b (Puffer) pipettieren, vorsichtig mischen; Lagerung bei -20°C

Tabelle 47: Programm zur Durchführung der sondenbasierten qPCR

Programmschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Präinkubation	95°C	10 min	1
Denaturierung	95°C	10 s	40
Annealing	60°C	30 s	
Elongation	72°C	1 s	
Abkühlen	4°C	30s	1

Für die qPCRs mit dem interkalierenden Farbstoff dsGreen wurde ein Mastermix erstellt (Tabelle 48), je 7 µl pro Well in eine 96-Well-PCR-Platte pipettiert, 3 µl der zuvor im Verhältnis 1:3 mit DEPC-H₂O verdünnten cDNA (Proben oder Standard) zugegeben und die Platte mit einer durchsichtigen Versiegelungsfolie verschlossen. Die Platte wurde dann in einer Tischzentrifuge (Eppendorf) abzentrifugiert (500 rpm, 1 min, RT) und die Reaktion in einem qTower³ (Analytik Jena) mit dem in Tabelle 49 beschriebenen Programm durchgeführt. Um das Vorhandensein unspezifischer Amplifikationsprodukte

auszuschließen, wurde im Anschluss an die qPCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Tabelle 48: qPCR-Mastermix für qPCR mit interkalierendem Farbstoff dsGreen, Ansatz für 1 Probe

Komponente	Menge	Endkonzentration
2x innuMIX qPCR DSGreen Standard	5 µl	
Primer forward [10 µM]	0,2 µl	200 nM
Primer reverse [10 µM]	0,2 µl	200 nM
PCR-grade H ₂ O	1,6 µl	
	Σ 7 µl	

Tabelle 49: qPCR-Programm zur Durchführung der qPCR mit interkalierendem Farbstoff dsGreen

Programmschritt	Temperatur	Dauer	Zyklenzahl
Präinkubation	95°C	2 min	1
Denaturierung	95°C	10 s	40
Annealing & Elongation	60°C	30 s	
Schmelzkurve	65° - 95°C ΔT 1°C/10 s)	30s	1

Die Genexpression wurde mittels relativer Quantifizierung bestimmt, weshalb eine Standardkurve mit 3 Verdünnungsstufen in die Experimente inkludiert wurde. Hierfür wurde 1000 µg RNA unbehandelter 1205Lu-Zellen in cDNA umgeschrieben, der Ansatz analog zu den Proben 1:3 mit DEPC-H₂O verdünnt und dann ohne weitere Verdünnung (100 % Genexpression), in einer 1:2 (50 %) und 1:10 (10 %) Verdünnung in der qPCR eingesetzt. Die Genexpression der Proben wurde dann in Relation zur Expression in den 1205Lu-Zellen gesetzt und auf die Expression eines Haushaltsgens, in diesem Fall *GAPDH*, normalisiert. Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte anhand der ermittelten Werte im Programm *Microsoft Excel*.

2.2.4.4 RNA-Sequenzierung und differenzielle Genexpressionsanalyse

Die UM-Zelllinien 92.1 und Mel270 wurden in vier biologischen Replikaten ausgesät, wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben mit einer Kontroll-siRNA oder SOX10-B-siRNA transfiziert und nach 24h geerntet. Anschließend wurde eine RNA-Isolierung mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) inklusive DNase-Verdau mithilfe des RNase-Free DNase Sets (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Library-Präparation und RNA-Sequenzierung

der insgesamt 16 Proben wurde von der Firma CeGaT GmbH (Tübingen, DEU) ausgeführt. Für die Library-Präparation wurde die RNA-Konzentration fluoreszenzbasiert zunächst mithilfe eines Qubit® Fluorometers (Thermo Scientific) gemessen und die RNA-Qualität mithilfe eines Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) überprüft. Dann wurden je 100 ng RNA und das KAPA RNA HyperPrep Kit with RiboErase (Roche) verwendet, um die Sequenzierlibraries zu erstellen. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Gerät NovaSeq™ 6000 (Illumina, San Diego, Kalifornien, USA) mit einer Leselänge von 2 x 100 bp. Die Software *Illumina bcl2fastq* (2.20) wurde verwendet, um die sequenzierten Reads zu demultiplexen und die Software *Skewer* (Version 0.2.2) [340] für das Adaptertrimming. Die FASTQ-Dateiangaben wurden mit dem Programm *FastQC* (Version 0.11.5-cegat) ausgelesen. Die weitere bioinformatische Analyse erfolgte durch Christopher Lischer, M.Sc. (AG Systems Tumor Immunology, Hautklinik des Uniklinikums Erlangen) mithilfe der statistischen Programmiersprache R in der Entwicklungsumgebung R Studio und den Software Packages „*DESeq2*“, „*AnnotationDbi*“, „*pheatmap*“ und „*ggplot2*“ [341, 342]. Zuerst wurde ein Alignment der Reads an das humane Referenzgenom in der Assembly GRCh38.p2 (hg38)) mit der Gencode Annotation Version 22 [343] und dem Short Read Aligner „*STAR*“ [344] in der Version 2.0201 durchgeführt. Unkorrigierte Read-Zahlen pro Gen wurden erfasst durch das Paket „*Subread*“ und dessen Funktion „*featureCount*“ [345]. Als erste vorläufige Analyse wurde eine *Principal Component* (PC)-Analyse durchgeführt, um eine erwartungsfreie Gruppierung der Proben durchzuführen. Um Gene zu identifizieren, welche nach SOX10-Inhibition differenziell exprimiert waren, wurden alle Gene mit einer signifikant veränderten Genexpression bei einer *family-wise error rate* (FWER) von 0,05 identifiziert. Danach wurden alle Gene mit einer \log_2 fold change $<|1|$ der Genexpression ausgeschlossen, um so Gene zu identifizieren, die sowohl eine statistische Signifikanz als auch mindestens eine Verdopplung bzw. Halbierung als Effektgröße zeigten. Diese wurden dann mit bereits publizierten ChIP-DNA-Sequenzierungs (ChIP-Seq)-Daten Daten zur Bindung von SOX10 im Bereich 10.000 bp *upstream* bis 5.000 bp *downstream* um Transkriptionsstartstellen (TSS) in murinen Melanozyten [346] abgeglichen, um Gene zu identifizieren, die eventuell direkt durch SOX10 transkriptionell reguliert werden. Die so generierte Liste an differenziell exprimierten Genen wurde dann weiter in *Gene Ontology* (GO) *Term*-Analysen untersucht, um die am stärksten veränderten Signalwege sowie Gene herauszufiltern, die einen Bezug zu den Prozessen Apoptose und Zellzyklusregulierung haben.

2.2.4.5 Grafische Darstellung von UM-Genexpressionsdaten aus der TCGA-Datenbank

Die grafische Darstellung der Daten zur Genexpression der Transkriptionsfaktoren *SOX10*, *SOX9*, *POU class 4 homeobox 1* (*POU4F1*) und *MSX1* in 80 UM-Primärtumoren erfolgte als Heatmap. Die Daten stammen aus dem *TCGA Ocular Melanomas (UVM)*-Datensatz des TCGA [75, 347] und wurden über den *Xena Functional Genomics Explorer* (<https://xenabrowser.net/>) [348, 349] heruntergeladen und anschließend mithilfe des Programms *Heatmapper* (<http://www.heatmapper.ca>) [350] visualisiert.

2.2.5 Proteinbiochemie

2.2.5.1 Proteinisolierung

Für die Isolierung von Protein aus HM und verschiedenen Zelllinien wurde zuerst das Medium von den in 6-Well-Platten kultivierten Zellen abgenommen, in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesammelt, dieses in einer kleinen Tischzentrifuge zentrifugiert (2.000 rpm, 2 min, 4°C) und anschließend der Überstand abgesaugt. Währenddessen wurden die Zellen 2x mit je 1 ml PBS gewaschen, 500 µl 11 mM EDTA/PBS auf die Zellen gegeben und für 5 bis 10 min bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden ablösten. Die Zellsuspension wurde anschließend zum Pellet des Mediumüberstandes hinzugefügt, erneut zentrifugiert (2.000 rpm, 2 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden dann 2x mit je 1 ml PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert (2.000 rpm, 2 min, 4°C). Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand vollständig abgenommen und das trockene Pellet entweder bei -80°C aufbewahrt oder die Proteinextraktion direkt fortgeführt. Um die Zellen zu lysieren und die Proteine zu extrahieren, wurde das Zellpellet in 50 bis 60 µl 1x CSH-Lysepuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat in einer kleinen Tischzentrifuge (13.000 rpm, 20 min, 4°C) zentrifugiert, um ungelöste Bestandteile wie Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand wurde dann in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

2.2.5.2 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay

Die Proteinkonzentrationsbestimmung der Lysate erfolgte mithilfe des Pierce™ BCA Protein Assay Kits (Thermo Scientific). Bei dieser kolorimetrischen Messmethode werden zwei chemische Reaktionen kombiniert. Im alkalischen Milieu werden bei der Biuret-Reaktion Cu²⁺-Ionen durch Proteine zu Cu⁺-Ionen reduziert [351, 352]. Ein Cu⁺-Ion bildet dann mit 2 Bicinchoninsäure (BCA-) Molekülen einen lilafarbenen Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm [351, 352]. Bei dieser Wellenlänge wird die Absorption des Komplexes photometrisch bestimmt, die sich im Bereich von 20 bis 2000 µg Protein/ml linear zur Proteinkonzentration verhält [351, 352]. Um eine absolute Quantifizierung der Proteinkonzentration in den Proben durchzuführen, wurde eine Standardkurve aus BSA mit bekannten Proteinkonzentrationen erstellt. Dafür wurden aus einer BSA-Stocklösung mit einer Konzentration von 10 µg/µl und 1x CSH-Lysepuffer eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 8, 4, 2, 1 und 0,5 µg/µl BSA angesetzt. Zur Durchführung des BCA-Assays wurde zunächst eine Arbeitslösung durch Mischen von 50 Teilen des Reagenz A (BCA) mit 1 Teil des Reagenz B (Kupfersulfat) aus dem Pierce™ BCA Protein Assay Kit in einem 50 ml-Reaktionsgefäß hergestellt und je 1 ml davon in 1,0 cm-Halbmikro-Küvetten aus PMMA pipettiert. Dann wurden pro Küvette entweder 10 µl Proteinlysate, BSA-Standard oder 1x CSH-Lysepuffer (für Ermittlung des Referenzwerts) hinzupipettiert, diese mit Parafilm M verschlossen, durch Invertieren gemischt und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der optischen Dichte der Referenzküvette (mit 1x CSH-Puffer), der 5 Küvetten mit den BSA-Standards und der Küvetten mit den Proteinproben bei einer Wellenlänge von 562 nm in einem

SmartSpec 3000 Photometer (Bio-Rad) bzw. einem Nanodrop 2000c Spektrophotometer (Thermo Scientific) mit dem Programm „*Protein BCA*“. Die Berechnung der Proteinkonzentrationen in den Proben wurden mithilfe der erstellten BSA-Standardkurve im Programm *Microsoft Excel* bzw. durch das Programm *Nanodrop* durchgeführt.

2.2.5.3 Proteinexpressionsanalyse mittels Western Blot

Die Analyse der Proteinexpression erfolgte mittels Western Blot-Verfahren. Dabei werden Proteine unter denaturierenden Bedingungen zuerst in einem Sodiumdodecyl-Polyacrylamid-Gel (SDS-PAGE) der Größe nach elektrophoretisch aufgetrennt und dann mithilfe von Strom auf eine Membran übertragen („*geblottet*“), auf der die gesuchten Proteine über die Bindung von spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden [353, 354]. Die Membran wird nach dem Blotten in einem Blockingpuffer, der Milchpulver oder BSA enthält, inkubiert, um unspezifische Bindungen der Antikörper zu vermeiden [353, 355]. Die geblockte Membran wird anschließend zunächst mit spezifischen Primärantikörpern inkubiert, die an die immobilisierten und aufgetrennten Proteine binden, dann gewaschen und mit Sekundärantikörpern inkubiert, die an die primären Antikörper binden und mit dem Enzym HRP (*horseradish peroxidase*, Meerrettich-Peroxidase) gekoppelt sind [355]. Nach Zugabe eines Chemilumineszenzreagenzes setzt die HRP das darin enthaltene Luminol in Anwesenheit von H_2O_2 zu 3-Aminophthalat um, wobei Licht mit einer Wellenlänge von 425 nm emittiert wird, welches mittels Röntgenfilm oder einer Digitalkamera detektiert werden kann [355].

Zuerst wurden die Proteinlysate für die SDS-PAGE unter denaturierenden Bedingungen in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen vorbereitet (Tabelle 50).

Tabelle 50: Probenvorbereitung für SDS-PAGE, Ansatz für 1 Probe

Komponente	Menge
Proteinlysat	10 oder 15 μg
NuPAGE™ LDS Sample Buffer (4X)	6 μl
NuPAGE™ Sample Reducing Agent (10X)	2,4 μl
H_2O	Ad. 24 μl

Die Ansätze wurden dann bei 70°C für 10 min in einem Thermomixer (Eppendorf) inkubiert und bis zur Beladung des Gels bei RT aufbewahrt. Die SDS-PAGE wurde mit vorgefertigten NuPAGE™ 4 - 12% Bis-Tris-Gradienten-Gelen nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierfür wurden die Gele in die Elektrophoresekammer eingespannt, 200 ml vom 1x Laufpuffer mit 500 μl NuPAGE™ Antioxidant versetzt, damit die innere Kammer zwischen den beiden Gelen bis zum Rand befüllt und 600 ml des übrigen 1x Laufpuffers in die äußere Kammer gefüllt. Nach dem Entfernen der Kämme aus den Gelen wurden die Geldaschen 2-3x mit 1x Laufpuffer mithilfe einer BD Discardit II-Spritze mit Microlance™ 3 20G-Kanüle gespült, um Gelreste aus den Taschen zu entfernen. Die Gele wurden anschließend mit 10 μl des SeeBlue™ Plus2 Pre-stained Protein Standards

als Größenmarker in der ersten Tasche und mit jeweils 24 µl denaturierter Proteinlösung in den weiteren Taschen beladen. Anschließend wurde die Elektrophoresekammer geschlossen und die Proteine durch Anlegen einer konstanten Spannung von 150 V für 50 min (PowerPac Basic, Bio-Rad) elektrophoretisch aufgetrennt. Um die Proteine vom Gel auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)- Membran (Invitrolon™ PVDF/Filter Paper Sandwich) zu übertragen, wurde die PVDF-Membran zuerst durch Inkubation in 100 % Methanol für 30 s, gefolgt von 2 min in H₂O und 15 min in 1x Transferpuffer auf den Blotvorgang vorbereitet. Das Gel mit den aufgetrennten Proteinproben wurde mithilfe eines Spatels aus der umgebenden Plastikkassette gelöst und auf ein mit 1x Transferpuffer getränktes Filterpapier (ebenfalls Bestandteil des Invitrolon™ PVDF/Filter Paper Sandwiches) gelegt. Danach erfolgte der Aufbau des „Blotting-Sandwich“, die Filterpapiere und Blotting Pads (Schwämme) wurden zuvor ebenfalls in 1x Transferpuffer getränkt: Auf 2 Blotting Pads wurde erst ein Filterpapier gefolgt von dem Gel, der PVDF-Membran, einem weiteren Filterpapier und 2 Blotting Pads gelegt. Dieser Stapel wurde dann in die Blotting-Apparatur eingespannt (beschriebene Anordnung entspricht der späteren Orientierung des Stromflusses von der Kathode zur Anode) und die innere Kammer mit 1x Transferpuffer befüllt, bis dieser das Blotting-Sandwich knapp überdeckte. In die äußere Kammer wurden 600 ml H₂O zur Kühlung der Apparatur gefüllt. Der Transfer der Proteine erfolgte dann bei einer konstanten Spannung von 30 V für 70 min. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran kurz in 1x Waschpuffer gewaschen und dann 1h in 20 ml 1x Blocking-Lösung bei RT unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde die Membran in 15 ml Primärantikörperlösung (verdünnt nach Angaben des Herstellers in 1x Blocking Lösung oder 3 – 5% BSA/PBS (Tabelle 35) sowie mit Zugabe von 0,02 % NaN₃) unter Schwenken über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zuerst dreimal für je 10 min in 1x Waschpuffer bei RT unter Schwenken gewaschen und dann die Membran unter Schwenken in 15 ml Blocking-Puffer mit einem passenden Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung (Tabelle 36) für 1h bei RT inkubiert. Anschließend folgten erneut drei Waschschrte à 10 min mit 1x Waschpuffer bei RT unter Schwenken. Für die Detektion mittels Chemilumineszenz wurden 1,5 ml Detektionsreagenz durch Mischen von 750 µl Reagent A und 750 µl Reagent B des Amersham™ ECL Prime Western Blotting Detection Reagent hergestellt und dieses gleichmäßig auf die abgetropfte PVDF-Membran pipettiert, die Membran in eine Klarsichtfolie gelegt und für 5 min bei RT inkubiert. Überschüssiges Detektionsreagenz wurde dann mit einem Papierhandtuch vorsichtig aus der Folie gestrichen und die Folie mit der darin eingepackten PVDF-Membran in eine Röntgenfilm-Kassette mit Tesa-Film geklebt. In der Dunkelkammer wurde dann ein Röntgenfilm (Amersham™ Hyperfilm™ ECL) in die Kassette gelegt und der Film nach der gewünschten Belichtungszeit (1 s bis maximal 10 min) im RP X-OMAT Entwickler (Kodak) entwickelt. Die Detektion des Chemilumineszenzsignals aller Western Blots ab Kapitel 3.4 wurde mithilfe einer Digitalkamera in einem ImageQuant LAS4000-Detektionsgerät (GE Healthcare) nach der gleichen Vorgehensweise (aber Platzierung in der ohne Röntgenkassette) vorgenommen. Nach der Detektion des Chemilumineszenzsignales wurde die PVDF-Membran aus der Folie genommen und in 20 ml 1x Blocking-Lösung mit 0,02 % NaN₃ für 1h bei RT unter Schütteln inkubiert, um dann

entweder mit einem weiteren Primärantikörper rehybridisiert (weiteres Verfahren dann wie oben beschrieben ab der Zugabe des Primärantikörpers) oder bei 4°C aufbewahrt zu werden.

2.2.5.4 Phospho-Kinase-Array

Um die Aktivierung verschiedener Signalwege nach SOX10-Hemmung durch Phosphorylierung der beteiligten Kinasen in einem einzigen Experiment simultan zu untersuchen, wurden die Proteinlysate mit einem Proteome Profiler™ Array Human Phospho-Kinase-Array Kit (R&D Systems) analysiert. Dabei wird eine Nitrozellulosemembran, auf der Antikörper gegen 43 Phosphorylierungsstellen humaner Kinasen und 2 weiteren Proteinen aufgebracht sind, zuerst mit einem Zelllysate inkubiert (Abb. 4 und Tabelle 51), wobei die Proteine durch die Antikörper auf der Membran immobilisiert werden [356]. Danach werden die immobilisierten Proteine durch Zugabe von biotinylierten Antikörpern mittels Chemilumineszenz-Nachweis detektiert [356].

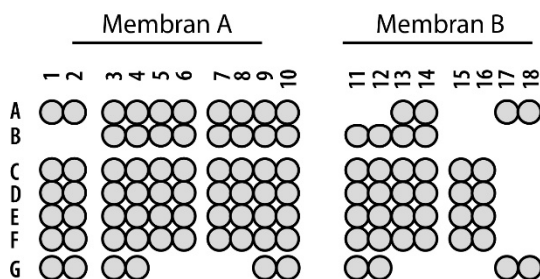


Abb. 4: Membranbelegung Phospho-Kinase-Array

Tabelle 51: Membranbelegung Phospho-Kinase-Array

Membran A			Membran B		
Koor-dina-ten	Target/Kontrolle	Phosphorylie-rung	Koor-dina-ten	Target/Kontrolle	Phosphorylie-rung
A1, A2	Referenzspot	-	A13, A14	p53	S392
A3, A4	p38α	T180/Y182	A17, A18	Referenzspot	-
A5, A6	ERK1/2	T202/Y204, T185/Y187			
A7, A8	JNK 1/2/3	T183/Y185, T221/Y223			
A9, A10	GSK-3α/β	S21/S9			
B3, B4	EGF R	Y1086	B11, B12	Akt 1/2/3	T308
B5, B6	MSK1/2	S376/S360	B13, B14	p53	S46
B7, B8	AMPKα1	T183			

B9, B10	Akt 1/2/3	S473			
C1, C2	TOR	S2448	C11, C12	p70 S6 Kinase	T389
C3, C4	CREB	S133	C13, C14	p53	S15
C5, C6	HSP27	S78/S82	C15, C16	c-Jun	S63
C7, C8	AMPK α 2	T172			
C9, C10	β -Catenin	-			
D1, D2	Src	Y419	D11, D12	p70 S6 Kinase	T421/S424
D3, D4	Lyn	Y397	D13, D14	RSK1/2/3	S380/S386/S377
D5, D6	Lck	Y394	D15, D16	eNOS	S1177
D7, D8	STAT2	Y689			
D9, D10	STAT5a	Y694			
E1, E2	Fyn	Y420	E11, E12	STAT3	Y705
E3, E4	Yes	Y426	E13, E14	p27	T198
E5, E6	Fgr	Y412	E15, E16	PLC- γ 1	Y783
E7, E8	STAT6	Y641			
E9, E10	STAT5b	Y699			
F1, F2	Hck	Y411	F11, F12	STAT3	S727
F3, F4	Chk-2	T68	F13, F14	WNK1	T60
F5, F6	FAK	Y397	F15, F16	PYK2	Y402
F7, F8	PDGF R β	Y751			
F9, F10	STAT5a/b	Y694/Y699			
G1, G2	Referenz-spot	-	G11, G12	HSP60	-
G3, G4	PRAS40	T246	G17, G18	PBS (Negativ- kontrolle)	-
G9, G10	PBS (Negativ- kontrolle)	-			

Für das Experiment wurden je 1,2 Mio Zellen der Zelllinien 92.1 und Mel270 auf zwei T75-Zellkulturflaschen ausgesät und über Nacht bei 37°C, 5 % CO₂ kultiviert. Am Folgetag wurden die Zellen wie in Abschnitt 2.2.2.1 beschrieben mit Kontroll-siRNAs oder SOX10-B-siRNA und dem Transfektionsreagenz Lipofectamine® RNAiMAX transfiziert. Pro T75 wurde aufgrund der größeren Grundfläche des Kulturgefäßes die 7,8fache

Menge des dort beschriebenen Transfektionsansatz verwendet. Nach einer Inkubationszeit von 24h wurden die Zellen geernet. Dafür wurde das Medium von den in T75-Flaschen kultivierten Zellen abgenommen und die Zellen in 10 ml PBS gewaschen, jedoch Medium und PBS nicht verworfen, sondern in einem 50 ml-Reaktionsgefäß gesammelt. Anschließend wurden 5 ml 11 mM EDTA/PBS auf die Zellen gegeben und diese für etwa 10 min bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert, bis sich die Zellen vom Boden ablösten. Die Zellsuspension und die 15 ml PBS, die zum Nachspülen der Zellkulturflasche verwendet wurden, wurden ebenfalls in das 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Reaktionsgefäß wurde dann in einer großen Tischzentrifuge mit 1.000 rpm bei RT für 3 min zentrifugiert und der Überstand verworfen, das Zellpellet mit 10 ml PBS gewaschen, erneut zentrifugiert (1.000 rpm, 3 min, RT) und in 10 ml PBS resuspendiert, um die Zellzahl für die Berechnung des Puffervolumens für die Lyse mithilfe einer Neubauer-Zählkammer zu bestimmen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurde das Zellpellet in 1,5 ml PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, dieses in einer kleinen Tischzentrifuge bei 2.000 rpm, 2 min, 4°C zentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Das trockene Zellpellet wurde bis zur Durchführung des Phospho-Kinase-Assays bei -80°C gelagert. Die Lyse und Durchführung des Phospho-Kinase-Arrays wurden dann gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt. Insgesamt wurden 600 µg Protein von Lysaten aus drei unabhängigen Versuchen gesammelt und gepoolt. Die Effizienz der SOX10-Hemmung wurde zuvor durch Western Blot-Analysen für jeden Versuch separat untersucht. Die Detektion des Arrays erfolgte in der Dunkelkammer mittels Röntgenfilm, die densitometrische Auswertung wurde mit dem Programm *ImageJ* durchgeführt.

2.2.5.5 Immunhistochemischer Nachweis von SOX10 in Tumorgewebe

IHC-Färbungen von SOX10 wurden auf Schnitten von Formalin-fixiertem und in Paraffin eingebettetem Tumormaterial von 44 UM-Metastasen aus dem Bestand der Pathologie des Uniklinikums Erlangen in der Dermatopathologie der Hautklinik Erlangen in einem BenchMark XT ULTRA Färbeautomat (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, USA) durchgeführt. Hierfür wurden 5 µm dicke Gewebeschnitte entparaffiniert, hitzevorbehandelt und mit dem für die *in vitro*-Diagnostik geeigneten Antikörper SOX-10 (EP268, Cell Marque, Rocklin, Kalifornien, USA), 1:100 verdünnt in Dako REAL Antibody Diluent (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornien, USA), inkubiert. Der Nachweis der SOX10-Antikörper-Bindung erfolgte mithilfe des ultraView Universal Alkaline Phosphatase Red Detection Kit (Roche Diagnostics, Mannheim, DEU) nach Herstellerangaben. Außerdem wurde eine Gegenfärbung mit Hematoxylin II (Roche Diagnostics) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Lichtmikroskopische Einzelaufnahmen der gefärbten Schnitte wurden mit einem BZ-X800-Mikroskop mit Kamera (Keyence, Neu-Isenburg, DEU) mit einem 10x Objektiv aufgenommen, lichtmikroskopische Serienaufnahmen mit einem 20x Objektiv. Letztere wurden dann digital mithilfe der Analysesoftware des Geräts zusammengefügt und der Anteil an SOX10-positiven Zellen mithilfe des Programms *QuPath* (<https://qupath.github.io>) durch Dr. Elias Koch (Hautklinik des Uniklinikums Erlangen) bestimmt.

2.2.6 Funktionelle Analysen

2.2.6.1 Zellviabilitätsbestimmung

Die Bestimmung der Zellviabilität erfolgte mit dem CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega). Dieser Assay basiert auf dem Prinzip, dass lebende, metabolisch aktive Zellen das dunkelblaue, schwach fluoreszierende Resazurin zu pinkem, stark fluoreszierendem Resorufin umsetzen können, dessen Anregungsmaximum bei 579 nm und Emissionsmaximum bei 584 nm liegt [357]. Dabei ist die Zellviabilität proportional zur gemessenen Fluoreszenz [357]. Für die Bestimmung der Zellviabilität wurden Zellen in 6-Well-Platten ausgesät, am Folgetag transfiziert oder neues Medium mit den entsprechenden Inhibitoren bzw. blockierenden Antikörper hinzugegeben und für 24h bis 96h bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert. Am Analysetag wurde das Medium zunächst vollständig von den Zellen abgenommen und davon wieder 750 µl auf die Zellen zurückpipettiert. Danach erfolgte die Zugabe von 150 µl CellTiter-Blue®-Reagenz pro Well, das Medium und Reagenz wurden durch leichtes Schwenken der Platte vermischt und die Platte wurde anschließend je nach Zelllinie für 30 min bis maximal 2h bei 37°C, 5 % CO₂ inkubiert, bis eine Verfärbung des Mediums von tintenblau zu lila erkennbar war. Als Referenz für eine Zellviabilität von 0 % wurden in einem separaten 1,5 ml Reaktionsgefäß 750 µl Medium ohne Zellen und 150 µl CellTiter-Blue® Reagenz vermischt und dieser Ansatz auf die gleiche Weise wie die Zellkulturplatte inkubiert. Für die Messung wurden dann jeweils 100 µl des mit CellTiter-Blue® Reagenz versetzten Mediumüberstandes sowie des Referenzansatzes in eine 96-Well-Platte überführt und die Fluoreszenzintensität bei einer Anregungswellenlänge (Exzitation) von 530 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm in einem Plattenphotometer bestimmt (CytoFluor™ 2350- Plattenphotometer (Millipore), Infinite 200 PRO (Tecan) bzw. GloMax® Explorer (Promega) mit dem Programm „Cell Titer-Blue“ (Exzitation: 520 nm, Emission: 580 – 640 nm)). Die Berechnung der relativen Zellviabilität in Relation zu den jeweiligen Kontrollen erfolgte mithilfe des Programms *Microsoft Excel*.

2.2.6.2 Annexin V-Propidiumjodid-Färbung und Durchflusszytometrie

Zelltodanalysen wurden durch Färbung der Zellen mit Annexin-V-FLUOS und Propidiumjodid und anschließender durchflusszytometrischer Messung durchgeführt. Die innere und äußere Lipidschicht der Zellmembran ist in lebenden Zellen asymmetrisch aufgebaut und wird in diesem Zustand durch spezielle Membranproteine, den Flippasen, gehalten [358]. Bereits während der frühen Apoptosephase kommt es jedoch zu Störungen der Membranintegrität, sodass das normalerweise in der inneren Lipidschicht befindliche Phosphatidylserin (PS) auch auf der Außenseite präsent ist [358, 359]. Diese Änderung der Membranzusammensetzung wird bei der Annexin V-Färbung ausgenutzt. Dabei werden Zellen mit FAM-markiertem Annexin V inkubiert, einem rekombinanten Protein, das in Anwesenheit von Calcium-Ionen mit hoher Affinität an PS bindet [360]. Neben apoptotischen Zellen kann Annexin V auch nekrotische Zellen anfärben, da es bei diesen während der Nekrose zu einem Verlust der Membranintegrität kommt [358, 360]. Um daher zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen unterscheiden zu

können, wird die Annexin-V-Färbung zudem mit einer Propidiumjodid-Färbung kombiniert [358, 360]. Propidiumjodid ist ein nicht-membrangängiger DNA-Farbstoff, der jedoch die durchlässige Membran nekrotischer Zellen durchdringen kann [358, 360]. Die Analyse der Färbeintensität kann mit einem Durchflusszytometer durchgeführt werden [358].

Für die Färbung wurden in 6-Well-Platten ausgesäte Zellen 48h bis 96h nach Transfektion oder Inkubation mit Inhibitoren analysiert. Der Mediumüberstand der Zellen wurde am Analysetag in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen gesammelt, zentrifugiert (2.000 rpm, 2 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen, dann 500 µl 11 mM EDTA/PBS pro Well zugegeben und die Platte im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ für etwa 5 bis 10 min inkubiert, bis sich die Zellen abgelöst hatten. Die abgelösten Zellen wurden dann in das gleiche 1,5 ml-Reaktionsgefäß wie zuvor überführt, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend noch 2x mit PBS gewaschen und zwischendrin zentrifugiert, bevor es in 50 µl Annexin-V-Färbelösung resuspendiert und für 10 bis 15 min lichtgeschützt inkubiert wurde. Anschließend wurden in FACS-Röhrchen je 60 µl Propidiumjodid-Färbelösung vorgelegt und die Zellsuspension in diese hineinpipettiert. Die Zugaben der Färbelösungen und die anschließende Inkubation erfolgte im Dunkeln in der Sterilbank, um das Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verringern. Die FACS-Röhrchen wurden dann lichtgeschützt auf Eis gestellt und 10.000 Zellen pro Probe an einem Durchflusszytometer (FACScan (Becton-Dickinson) bzw. FACSCanto II (BD Biosciences)) gemessen. Die Analyse der Messung erfolgte mit den Programmen *CellQuest* (Becton Dickinson) bzw. *FlowJo* (BD Biosciences).

2.2.6.3 Zellzyklusanalyse mittels Propidiumjodid-Färbung und Durchflusszytometrie

Die Bestimmung der Zellzyklusphasen, in der sich eine Zelle befindet, kann mittels Durchflusszytometrie beruhend auf der Anfärbung der DNA mit Propidiumjodid erfolgen [361]. Die Fluoreszenzintensität des eingelagerten Propidiumjodids ist direkt proportional zur DNA-Menge der Zelle, wodurch bestimmt werden kann, ob sich eine Zelle gemäß ihrem DNA-Gehalt in der G1-Phase, S-Phase oder in der G2-Phase (doppelte DNA-Menge) befindet [361]. Da Propidiumjodid auch RNA anfärbt, wird diese durch einen RNase-Verdau während des Färbevorgangs entfernt [362]. Für die Zellzyklusanalyse wurden in 6-Well-Platten ausgesäte Zellen 48h und 72h nach Transfektion oder Inkubation mit Inhibitoren analysiert. Dafür wurde zuerst das Medium abgenommen und in einem 2 ml-Reaktionsgefäß gesammelt. Die Zellen wurden dann 2x mit PBS gewaschen und durch Zugabe von 500 µl 1x Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit dem zuvor gesammelten Mediumüberstand abgespült, um den Verdau durch das Enzym Trypsin abzustoppen und dann in ein 2 ml-Reaktionsgefäß überführt, welches in einer kleinen Tischzentrifuge zentrifugiert (2.000 rpm, 5 min, 4°C) wurde. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Pellet 2x in PBS gewaschen und zwischen den Waschgängen zentrifugiert (2.000 rpm, 5 min, 4°C). Die Zellen wurden dann in 100 µl PBS resuspendiert. Um die Zellen für die Färbung zu fixieren, wurde ein Vortex-

Genie 2 auf Stufe 1 eingestellt, darauf das 2 ml-Reaktionsgefäß mit der Zellsuspension platziert und dann unter langsamem, kontinuierlichen Schütteln 1,4 ml 75 % Ethanol tropfenweise hinzupipettiert. Anschließend erfolgte die Inkubation über Nacht bei 4°C. Für die Propidiumjodid-Färbung wurden die fixierten Zellen erneut zentrifugiert (2.000 rpm, 5 min, 4°C), der Überstand entfernt, das Pellet mit 500 µl FACS-Waschpuffer gewaschen, wieder zentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Waschschrift wurde einmal wiederholt und das Pellet dann in 300 µl Propidiumjodid-Färbelösung resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 min bei 37°C wurden die Ansätze in FACS-Röhrchen überführt und 5.000 Zellen pro Probe an einem Durchflusszytometer analysiert (FACScan (Becton-Dickinson) bzw. FACSCanto II (BD Biosciences)). Die Bestimmung der Zellzyklusphasen erfolgte im Anschluss mithilfe der Software *CellQuest* bzw. *FlowJo*.

2.2.7 Erstellung eines SOX10-basierten UM-Protein-Interaktionsnetzwerks zur Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen im Uveamelanom

Die im folgenden beschriebene Erstellung, grafische Darstellung und Analyse des SOX10-basierten UM-Proteininteraktionsnetzwerks sowie die Identifizierung von potenziellen Kandidatengenen für neue zielgerichtete Therapien erfolgte durch Adrian Weich, M.Sc. und Prof. Dr. Julio Vera-Gonzalez (AG Systems Tumor Immunology, Hautklinik des Uniklinikums Erlangen).

2.2.7.1 Erstellung eines UM-Proteininteraktionsnetzwerks

Um ein virtuelles Interaktionsnetzwerk von Proteinen zu erstellen, die eine wichtige Rolle im UM spielen, wurden in einer Literaturrecherche zuerst die wichtigsten Signalwege im UM identifiziert und die entsprechenden Komponenten aus der REACTOME-Datenbank (<https://reactome.org/>) [363, 364] (Tabelle 52) in das Programm *CellDesigner* (Version 4.4.2) eingefügt [365].

Tabelle 52: Wichtige intrazelluläre Signalwege im Uveamelanom und REACTOME-Identifikationsnummern

Identifikationsnummer (REACTOME-Datenbank) [363, 364]	Signalweg [Literaturreferenz]
R-HSA-5693532	DNA-Doppelstrangreparatur [46, 366, 367]
R-HSA-1234174	Hypoxieantwort [75, 366]
R-HSA-5673001, R-HSA-416476	Ras-Raf-MEK-ERK-MAPK-Signalweg [46, 71, 75, 78, 168, 366, 368]
R-HSA-9012999	Trio-Rho-Rac-Signalweg [80, 81]
R-HSA-2028269	YAP-Hippo-Signalweg [80, 81]

R-HSA-109704, R-HSA-165159, R-HSA-6807070	P13K-Akt-mTOR-Signalweg [168, 367]
R-HSA-418217	PLC-PKC-Signalweg [75, 168, 366]
R-HSA-6783783	IL-10 [369, 370]
R-HSA-170834	TGF- β [369, 370]
R-HSA-877300	IFN- γ [369, 370]
R-HSA-75157	FasL [369, 370]
R-HSA-389948	PD-1 [369, 370]
R-HSA-8950732	MIF [369, 370]
R-HSA-391160	CD47 [369, 370]
R-HSA-9619665	SOX10 [235, 346]

Darüber hinaus wurden die Gene bzw. Proteine *MITF*, *DCT*, *TYR*, *KIT*, *IRF4*, *MEF2C*, *ERBB3*, *ITPR2*, *CEBP*, *CREB3L2*, *BHLHB2*, *ETS1*, *E2F1*, *TYRP1*, *Nestin*, *EDNRB*, *PAX3*, *cRET*, *EGR2*, *POU3F1* (*OCT6*), *POU3F2* (*BRN2*), *SP1* und *MED1* [235, 346], von denen eine Interaktion mit SOX10 bekannt ist, ebenfalls hinzugefügt. Um das Netzwerk weiter auszuweiten, wurden Daten zu miRNA-mRNA-Interaktionen aus den Datenbanken *miRTarBase* (Version 6.1) [371, 372], *miRecords* (Version 4.5) [373], *Human Transcriptional Regulation Interactions database (HTRIdb)* (Version 1) [374] und *TRANSFAC* (Version 2015.1) [375] durch das Script *miRNexpander* (<https://github.com/marteber/miRNexpander>) ebenfalls implementiert. Die Information wurde nach der Transformierung in Graph Modelling Language durch *miRNexpander* im Programm *Cytoscape* (Version 3.8.0) [376] weiter prozessiert. Um weitere SOX10-basierte Interaktionen in das Netzwerk zu integrieren, wurde das neu erstellte Netzwerk mit einem früher erstellten SOX10-Interaktionsnetzwerk zur Differenzierung von Oligodendrozyten überlagert [377].

2.2.7.2 *Network Pruning* und Motiverkennung

In einem nächsten Schritt wurde eine Bereinigung des Netzwerks durch Implementierung von Expressionsdaten durchgeführt („*Network Pruning*“). Hierfür wurden Expressionsdaten aus Mikroarrays von 63 UM-Proben aus der GEO-Datenbank (GEO ID: GSE22138) [378, 379] sowie RNA-Sequenzierungsdaten von 80 UM-Primärtumoren aus der TCGA-Datenbank [75] verwendet. Alle Expressionswerte wurden in das Format „*transcripts per million*“ (TPM) konvertiert, für jedes Gen die Mittelwerte berechnet und diese separat für jeden Datensatz zu den Knotenpunkten des Netzes über die jeweiligen Ensembl Gen-IDs [380] zugeordnet. Diejenigen Knoten, die eine durchschnittliche Genexpression > 1 in einem der beiden Datensätze aufwiesen, wurden ausgewählt und mittels des Tools *Network Analyzer* im Programm *Cytoscape* einer Netzwerkanalyse und

Topologiestatistiken unterzogen. Um den regulatorischen Kern des Netzwerks zu identifizieren, wurde das UM-Netzwerk mithilfe der *Cytoscape*-Anwendung *NetMatchStar* [381] nach regulatorischen Motiven durchsucht. Dabei wurde nach den sieben regulatorischen Motivtypen (2-nodes-2-edges feedback loop, 3-nodes-3-edges feedback loop, 3-nodes-4-edges feedback loop, 3-nodes-3-edges feedforward loop, 3-nodes-4-edges feedforward loop, 4-nodes-4-edges feedforward loop, 4-nodes-4-edges feedback loop) gesucht und dann eine Motivrangliste erstellt. Für diese wurde eine gewichtete Bewertungspunktzahl berechnet, um die wichtigsten Knotenpunkte und Interaktionen zu identifizieren:

$$Score_i = w_1 \cdot E_i + w_2 \cdot BC_i + w_3 \cdot D_i$$

Jedes Motiv i wurde dabei mit den verschiedenen Gewichtungen w_1 , w_2 und w_3 berechnet, die die Wichtigkeit der drei Ranglistenfaktoren bestimmen: E_i bezeichnet den jeweiligen Expressionswert der Knoten, die das Motiv i bilden; BC_i ist die durchschnittliche Betweenness-Zentralität zwischen den Knoten, die das Motiv i bilden und D_i ist der durchschnittliche Grad der Knoten, die das Motiv i bilden. Die Gewichtungsfaktoren w_1 , w_2 und w_3 summieren sich zu 1. In diesem Fall wurde für w_1 der fixe Wert von 0,5 definiert, um die Wichtigkeit der Expression zu untermauern, während für w_2 Werte zwischen 0,05 und 0,45 in 0,05-Schritten gewählt wurden und w_3 als $0,5 - w_2$ berechnet wurde [377, 382]. Die Motiv-Scores jedes Motivs i wurden für jede Kombination von Gewichtungsfaktoren berechnet und die verschiedenen Scores der gleichen Motive wurden mit der "psel"-Methode unter Verwendung des R-Pakets *rPref* (Version 1.3) pareto-optimiert [383]. Die Expressionswerte waren bereits im Rahmen des Network Prunings implementiert worden und basierten auf den RNA-Sequenzierungsdaten des TCGA-Datensatzes publiziert von Robertson et al. [75]. Die bereits zuvor im Pruning-Schritt implementierte Betweenness-Zentralität und die Grade der Knotenpunkte wurden mithilfe der Anwendung *Network Analyzer* bestimmt. Nach Bildung einer Hierarchie wurden die 100 Motive mit der höchsten Bewertung selektiert für die Bildung des UM-Kern-Interaktionsnetzwerks.

2.2.7.3 Generierung eines Netzwerks für die Zielstrukturselektion („*Target selection network*“)

Das UM-Kern-Interaktionsnetzwerk diente als Ausgangspunkt für die Generierung eines Netzwerks für die Zielstrukturselektion („*Target selection network*“). Dafür wurden die Kern-Komponenten (Gene) des Netzwerks und ihre jeweiligen ersten Nachbarn im Netzwerk extrahiert, nach ihrer grundlegenden Funktion reannotiert und den GO-Terms „*growth factors*“ (GO:0008083), „*receptors*“ (GO:0043112), „*co-transcription factors*“ (GO:0001221) und „*transcription factors*“ (GO:0008143) zugeordnet. Das so kreierte Netzwerk wurde mittels *CerebraWeb*-Implementierung reformatiert und die Ergebnisse der differentiellen Genexpressionsanalyse nach SOX10-Knockdown in den UM-Zelllinien 92.1 und Mel270 (siehe Abschnitt 3.2.5.3) durch entsprechende Farbcodierung in

das Netzwerk integriert. Im Netzwerk wurde dann nach potenziell therapeutisch modulierbaren Zielstrukturen gesucht, die einerseits durch die SOX10-Hemmung herabreguliert wurden und deren Wirkung andererseits durch *small molecule*-Inhibitoren oder Antikörper pharmakologisch inhibiert bzw. blockiert werden kann. Für eine erste *in vitro*-Validierung des Ansatzes wurden vier Kandidaten aus dem Netzwerk für die Durchführung weiterer funktioneller Analysen ausgewählt.

2.2.8 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden in drei biologischen Replikaten durchgeführt, sofern keine anderen Angaben gemacht werden, und alle Daten werden als Mittelwerte \pm SD dargestellt. Ein zweiseitiger T-Test wurde für die Analyse von zwei Gruppen verwendet, während für die Analyse mehrerer Vergleiche eine einseitige *analysis of variance* (one-way ANOVA) mit Dunnett's Post Hoc-Test erfolgte. Die Korrelation zwischen der SOX10- und MITF-Expression in UM-Zelllinien wurde nach Pearson berechnet. Ein zweiseitiger p-Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angesehen. Statistische Berechnungen wurden entweder mit den Programmen *GraphPad Prism* (<https://www.graphpad.com>, GraphPad Software, San Diego, Kalifornien, USA) oder *SPSS Statistics* (IBM, Armonk, New York, USA) ausgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Analyse der basalen SOX10-Expression im Uveamelanom

Der Transkriptionsfaktor SOX10 wurde im Kontext des UM in der Literatur bislang kaum beschrieben. Daher wurde zunächst die basale SOX10-Expression in einer Auswahl an UM-Zelllinien, in öffentlich zugänglichen RNA-Sequenzierungsdaten des *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) [347] und in Patientenproben analysiert. Für die Analyse der Expression in den Zelllinien wurde zunächst RNA bzw. Protein aus den UM-Zelllinien 92.1, Mel270, OMM1.5, Mel285, Mel202, Mel290, OMM-1, OMM2.3 und OMM2.5 sowie als Kontrolle aus HM und der KM-Zelllinie 1205Lu isoliert. Die SOX10-Expression der zuletzt genannten Zelllinie war bereits in früheren Projekten der Arbeitsgruppe untersucht worden [295]. Anschließend erfolgte die Bestimmung der relativen Genexpression mittels qPCR und die Analyse der Proteinexpression mittels Western Blot. Die Analysen zeigten, dass SOX10 mit Ausnahme der beiden Zelllinien Mel285 und Mel290 in allen untersuchten UM-Zelllinien sowohl auf Gen- als auch Proteinebene stark exprimiert wurde, auch im Vergleich zur KM-Zelllinie 1205Lu (Abb. 5).

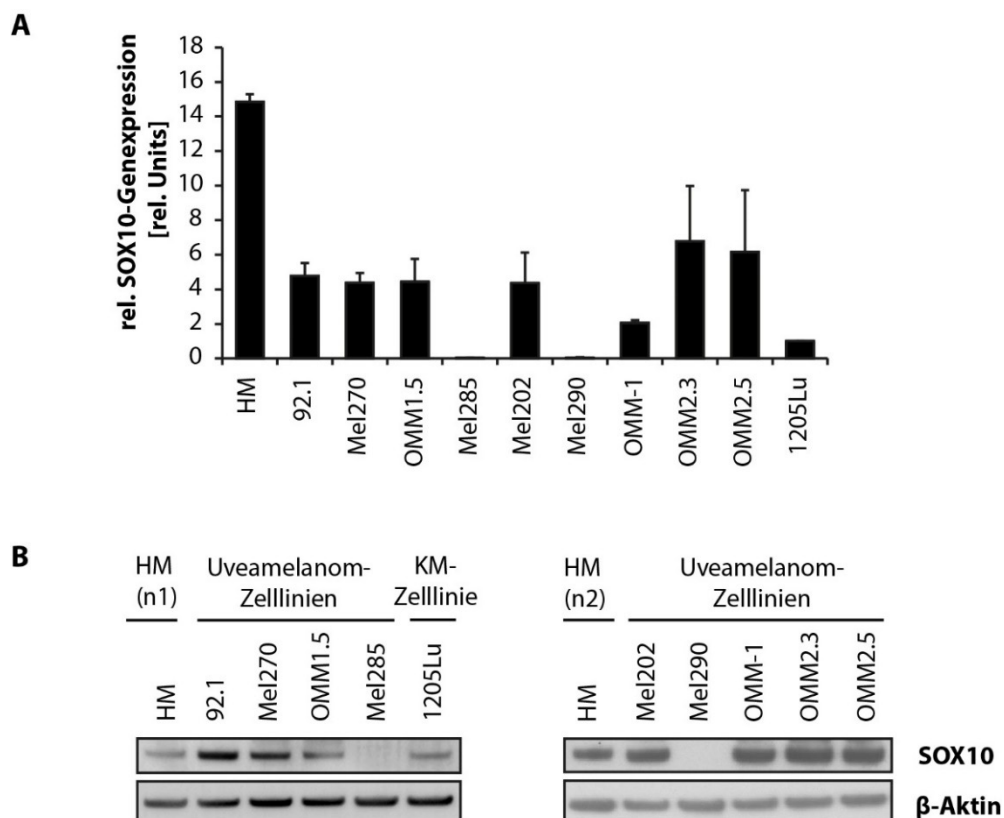


Abb. 5: Basale SOX10-Expression in UM-Zelllinien

(A) Relative Genexpression von SOX10, normalisiert auf GAPDH-Expression, in humanen Melanozyten (HM), den UM-Zelllinien 92.1, Mel270, OMM1.5, Mel285, Mel202, Mel290, OMM-1, OMM2.3 und OMM2.5 sowie der KM-Zelllinie 1205Lu, Mittelwerte \pm SD, $n = 3$. (B) Proteinexpression von SOX10 und β -Aktin (Ladekontrolle) in HM (zwei Spender), den UM-Zelllinien 92.1, Mel270, OMM1.5, Mel285, Mel202, Mel290, OMM-1, OMM2.3 und OMM2.5 sowie der KM-Zelllinie 1205Lu.

Die Analyse des *TCGA Ocular Melanomas (UVM)*-Datensatz, der RNA-Sequenzierungsdaten von 80 UM-Primärtumoren enthält [75, 347], ergab eine hohe *SOX10*-Genexpression in allen untersuchten Tumoren, während der nahverwandte Transkriptionsfaktor *SOX9* geringer und die beiden neuronalen Transkriptionsfaktoren *POU4F1* (codiert für Brn3a) und *MSX1*, die ebenfalls eine Rolle bei der Progression und dem Überleben der Tumorzellen im KM spielen [323, 324], kaum exprimiert wurden (Abb. 6).

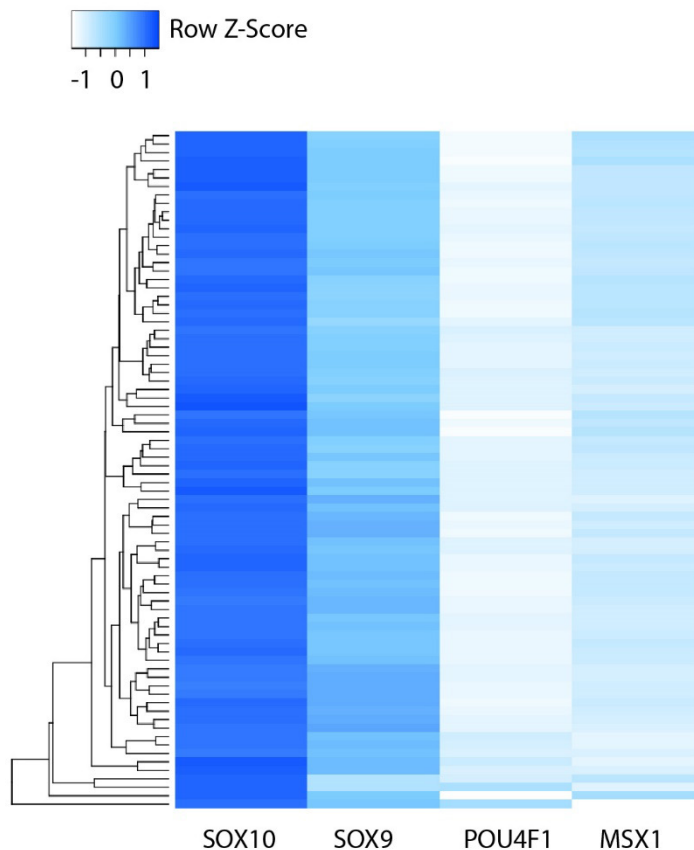


Abb. 6: Genexpression von neuronalen Transkriptionsfaktoren in UM-Primärtumoren

Grafische Darstellung der Genexpression von *SOX10*, *SOX9*, *POU4F1* (codiert für Brn3a) und *MSX1* in 80 UM-Primärtumoren, Daten aus dem *TCGA Ocular Melanomas (UVM)*-Datensatz.

Darüber hinaus wurde die *SOX10*-Expression an Schnitten von fixiertem, in Paraffin eingebettetem Tumormaterial von 44 UM-Metastasen aus der Leber ($n = 30$), Weichgewebe ($n = 5$), der Orbita ($n = 2$) und anderen Lokalisationen (Omentum majus, Ohrhelix, axilläre Lymphknoten, Mamma, Nebenniere, Niere, präsakral, je $n = 1$) durch IHC-Färbungen untersucht. Bei zwei aus der Leber entnommenen Geweben konnten jedoch keine Tumorzellen festgestellt werden, daher wurden sie aus der weiteren Analyse ausgeschlossen. Insgesamt waren bei 37 der 42 eingeschlossenen UM-Metastasen (88,1 %) mehr als 1 % *SOX10*-positive Zellen im Tumorgewebe nachweisbar (Abb. 7A) und bei 26 Proben (61,9 %) sogar mehr als 10 % *SOX10*-positive Zellen vorhanden (Abb. 7B bis F). Somit war eine *SOX10*-Expression bei der Mehrheit der untersuchten Patientenproben detektierbar.

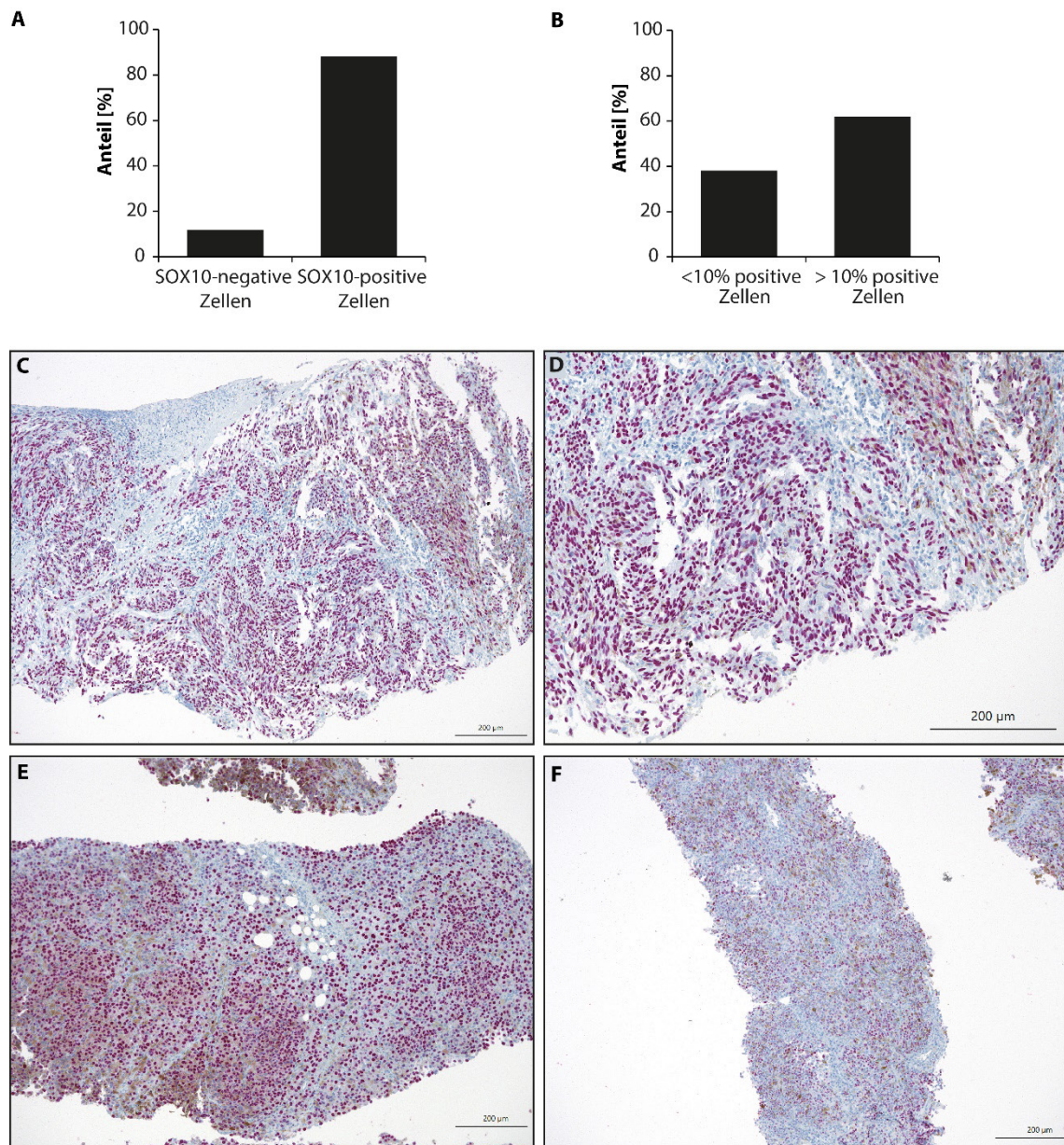


Abb. 7: Immunhistochemischer Nachweis der SOX10-Expression in UM-Metastasen

(A) Grafische Darstellung des Anteils an SOX10-negativen (< 1 % SOX10-positive Zellen im Tumor) und SOX10-positiven Tumoren bei 42 analysierten UM-Metastasen. (B) Grafische Darstellung des Anteils an Patientenproben mit < 10 % vs. > 10 % SOX10-positiven Zellen im Tumorgeewebe. Repräsentative Aufnahmen von IHC-Färbungen auf SOX10 in UM-Metastasen aus der Leber (C, D: Ausschnitt vergrößert aus C), dem Omentum majus (E) und der Niere (F), 10x Vergrößerung. Balken: 200 µm.

3.2 Funktionelle Charakterisierung durch Hemmung der SOX10-Expression mittels RNA-Interferenz

Da SOX10 in der Mehrheit der untersuchten UM-Patientenproben sowie UM-Zelllinien im Gegensatz zu den anderen NC-Transkriptionsfaktoren stark exprimiert wurde, wurde

die Funktion von SOX10 im UM durch RNA-Interferenz gehemmt und experimentell weiter untersucht.

3.2.1 Verringerung der Zellviabilität nach SOX10-Inhibition

SOX10 ist ein essenzieller Transkriptionsfaktor für das Überleben der melanozytären Vorläuferzellen während ihrer Migration aus der NC in die Epidermis [236]. Darüber hinaus konnte im KM gezeigt werden, dass die Hemmung von SOX10 Zelltod induziert [294, 295]. Bisher war jedoch unklar, ob SOX10 eine ähnliche funktionelle Bedeutung für das Überleben von UM-Zellen ausübt. Um dies zu untersuchen, wurden die UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5, die eine hohe basale SOX10-Expression aufwiesen, sowie die KM-Zelllinie 1205Lu und HM mit SOX10-siRNAs, einer Kontroll-siRNA oder nur mit dem Transfektionsreagenz transfiziert. Nach 24h, 48h, 72h und 96h wurde dann die Zellviabilität mithilfe des CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega) bestimmt. Die KM-Zelllinie 1205Lu wurde ausgewählt, da mit dieser bereits in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe Untersuchungen zur Zellviabilität nach SOX10-Inhibition durchgeführt wurden und sie sich daher für einen Vergleich der SOX10-Funktion in KM- und UM-Zelllinien anbot [295]. Die SOX10-Inhibition führte zu einer massiven Abnahme der Zellviabilität der UM-Zelllinien, welcher besonders ausgeprägt in den Zelllinien 92.1 und Mel270 war (Abb. 8). Die Verringerung der Zellviabilität von OMM1.5 nach SOX10-Knockdown ähnelte dem Verhalten der 1205Lu-Zellen.

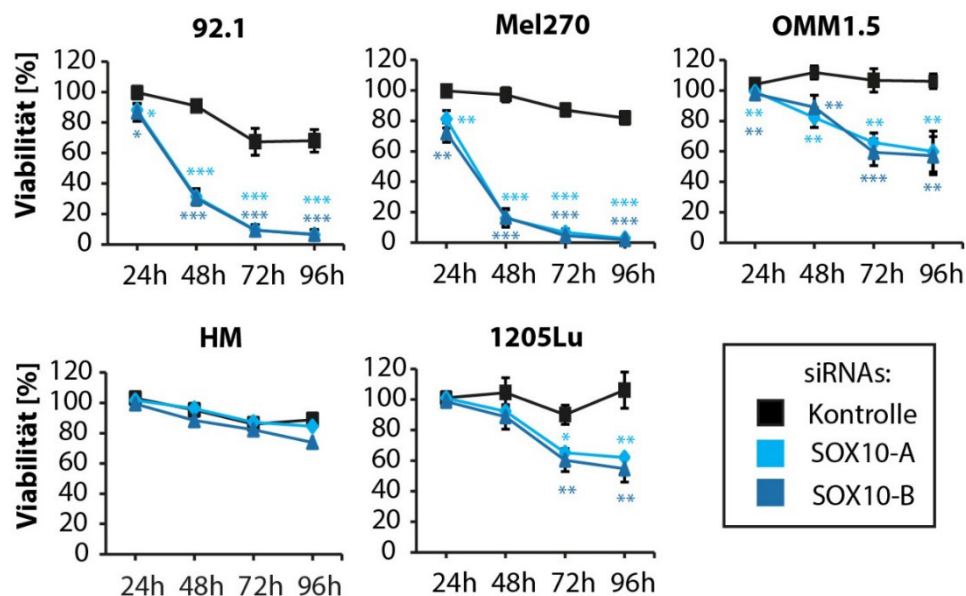


Abb. 8: Zellviabilität nach SOX10-Hemmung

Humane Melanozyten (HM), die KM-Zelllinie 1205Lu sowie die drei SOX10-exprimierenden UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 wurden mit SOX10-A-, SOX10-B- oder einer Kontroll-siRNA transfiziert und die Zellviabilität nach 24h, 48h, 72h und 96h mithilfe des CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega) bestimmt. 100%: Zellen nur mit Transfektionsreagenz ohne siRNAs inkubiert. Mittelwerte \pm SD, n = 3. *: p < 0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,001 vs. Kontroll-siRNA.

Erstaunlicherweise führte die Transfektion von HM mit SOX10-spezifischen siRNAs trotz erfolgreicher Hemmung der SOX10-Expression weder zu einer Veränderung der Morphologie noch zu einer Abnahme der Zellviabilität (Abb. 8 und Abb. 9A). Die KM-Zelllinie 1205Lu zeigte ähnliche Veränderungen nach SOX10-Hemmung wie die UM-Zelllinien, die so bereits von Graf et al. beschrieben worden waren [295] (Abb. 9B). Morphologisch waren nach 96h eindeutige Unterschiede zwischen den mit SOX10-siRNAs und Kontroll-siRNA transfizierten UM-Zelllinien sichtbar (Abb. 10). Die mit SOX10-siRNAs transfizierten Zellen zeigten eine deutlich geringere Konfluenz sowie deutlich mehr abgerundete und abgelöste Zellen, was ein Hinweis auf einen vermehrten Zelltod nach SOX10-Hemmung sein kann.

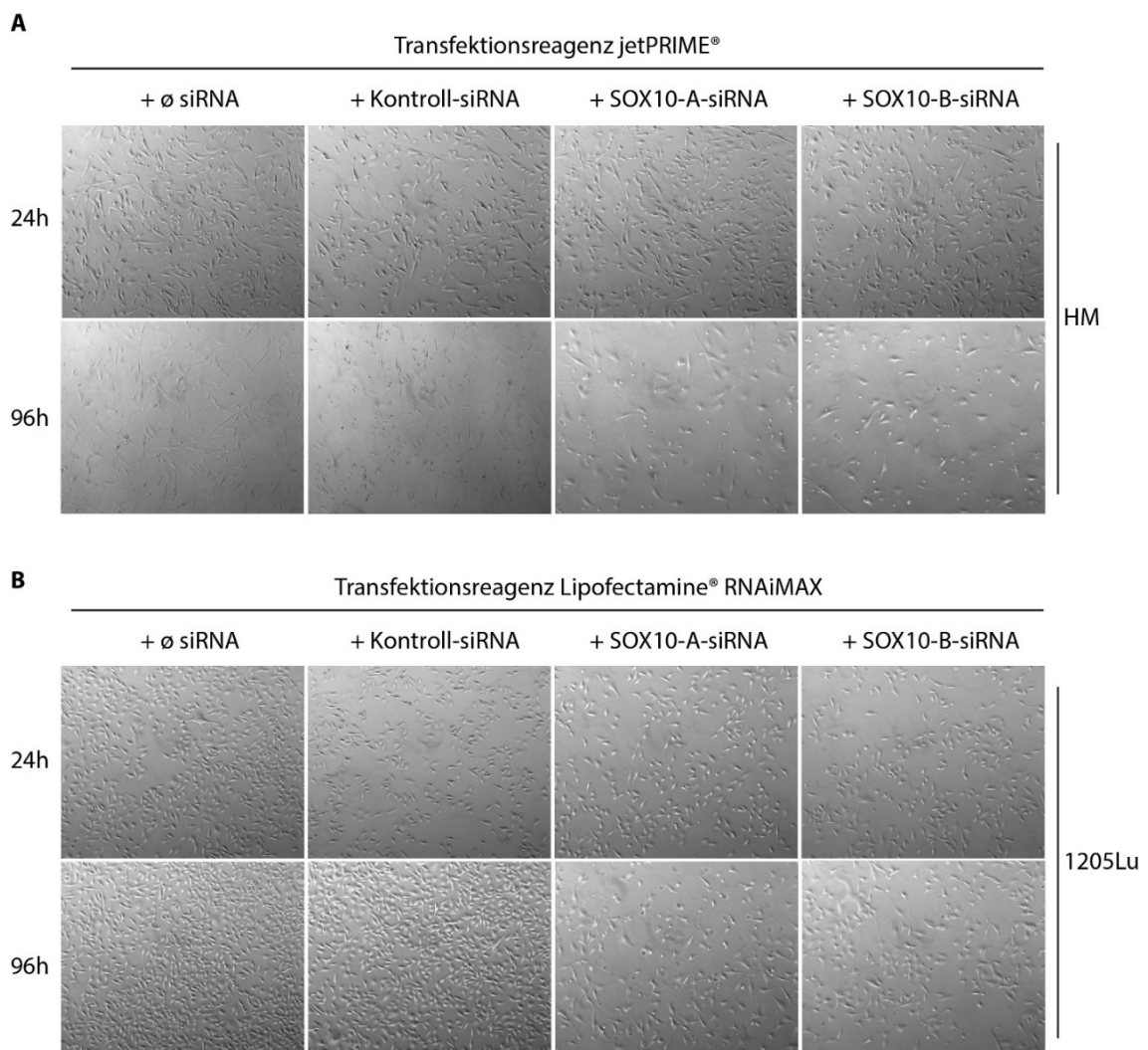


Abb. 9: Morphologische Veränderungen von humanen Melanozyten (HM) und der KM-Zelllinie 1205Lu nach SOX10-Hemmung

Lichtmikroskopische Aufnahmen von (A) HM sowie (B) der KM-Zelllinie 1205Lu 24h und 96h nach Behandlung mit dem Transfektionsreagenz jetPRIME® (HM) bzw. Lipofectamine® RNAiMAX (1205Lu) sowie Transfektion mit Kontroll-, SOX10-A-siRNA oder SOX10-B-siRNA, 50x Vergrößerung.

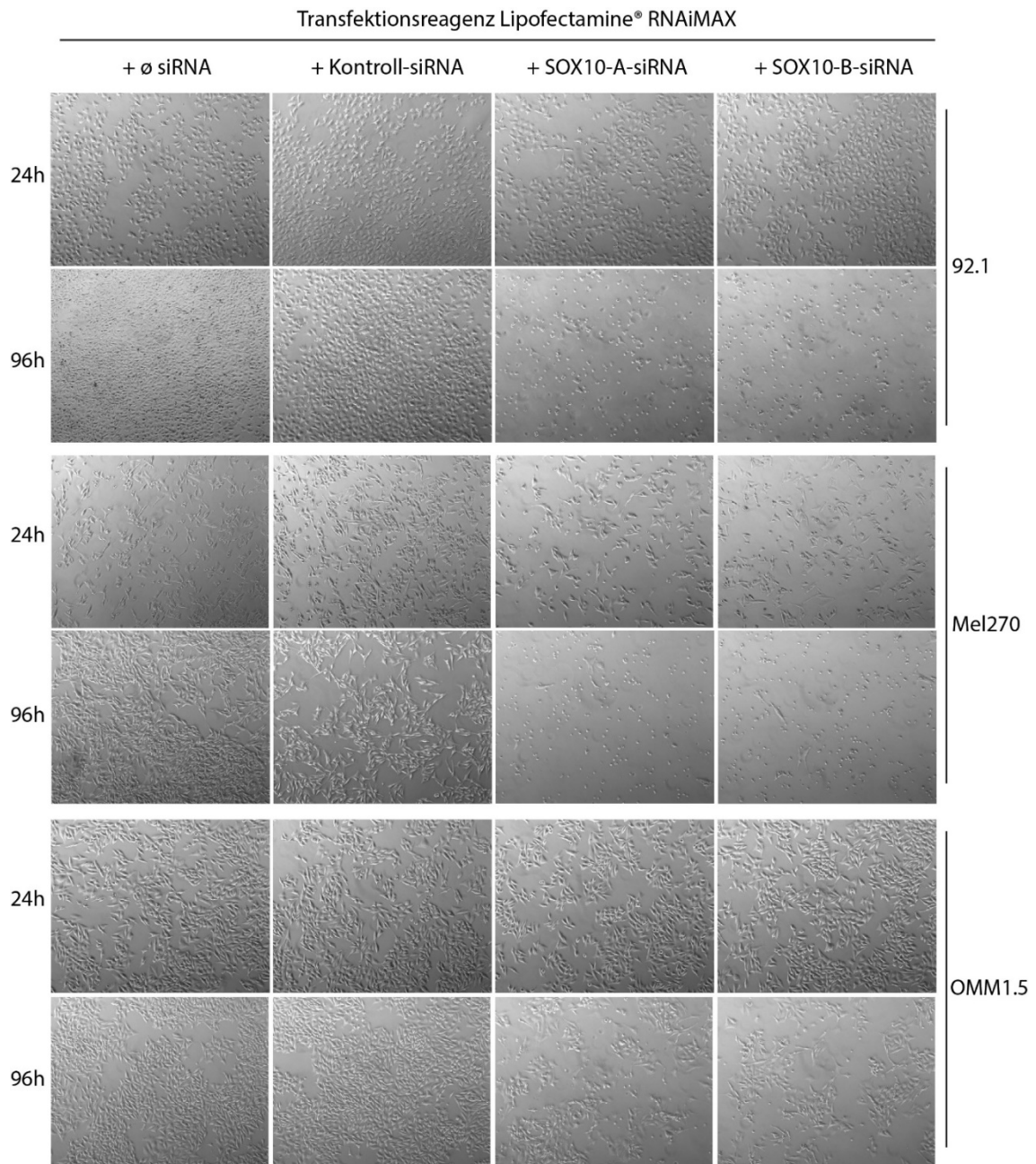


Abb. 10: Morphologische Veränderungen von UM-Zelllinien nach SOX10-Hemmung

Lichtmikroskopische Aufnahmen der UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 24h und 96h nach Behandlung mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine® RNAiMAX (+ Ø siRNA, Kontrolle) bzw. Transfektion mit Kontroll-, SOX10-A-siRNA oder SOX10-B-siRNA, 50x Vergrößerung.

3.2.2 Induktion eines Zellzyklus-Arrests in der G1-Phase

Der Begriff „Zellzyklus“ beschreibt den streng kontrollierten Prozess, bei dem eine Zelle unterschiedliche Phasen auf dem Weg zur Zellteilung (Mitose) durchläuft [384]. Während der Interphase, die aus der G1- („gap“), S- („Synthese“) und G2-Phase besteht, wird die DNA auf die bevorstehende Zellteilung in der M-Phase vorbereitet, indem die DNA repariert und in der S-Phase verdoppelt wird [384]. Der Eintritt in die jeweilige nächste

Phase des Zellzyklus wird dabei durch verschiedene Proteine und Checkpoints kontrolliert, an denen überprüft wird, ob die notwendigen Vorbereitungen der Zelle und der DNA für die Mitose erfolgreich abgeschlossen wurden [385]. Sollte dies nicht der Fall sein, kann ein Stop der Zellzyklusprogression in Form eines Zellzyklusarrests induziert werden, um die Zelle in einem Wartezustand zu halten, bis sich die Umweltbedingungen für eine Zellteilung gebessert haben, die DNA vollständig repariert bzw. repliziert ist oder bis genügend Wachstumsfaktoren, Nährstoffe oder Hormone vorhanden sind [385]. Die beobachtete Verringerung der Zellviabilität nach SOX10-Hemmung kann darauf hindeuten, dass in den Zellen ein Zellzyklusarrest induziert wurde.

Um zu untersuchen, ob die Hemmung von SOX10 den Zellzyklusprogress beeinflusst, wurden die UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5, die KM-Zelllinie 1205Lu sowie HM mit SOX10-siRNAs, Kontroll-siRNA transfiziert oder nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt. Nach 48h wurden die Zellen geerntet und einer Propidiumjodid-Färbung mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse unterzogen. Außerdem wurde die Expression verschiedener zellzyklusassoziierter Proteine mittels Western Blot bestimmt. Die durchflusszytometrischen Analysen ergaben eine Verschiebung der Zellzyklusphasen hin zu einem höheren Anteil an Zellen, die sich in der G1-Phase des Zellzyklus befanden (Abb. 11). Der Effekt war am deutlichsten in der Zelllinie 92.1 zu beobachten, wohingegen die SOX10-Hemmung in HM analog zu den Ergebnissen der Zellviabilitätsanalysen keine Veränderungen bewirkte.

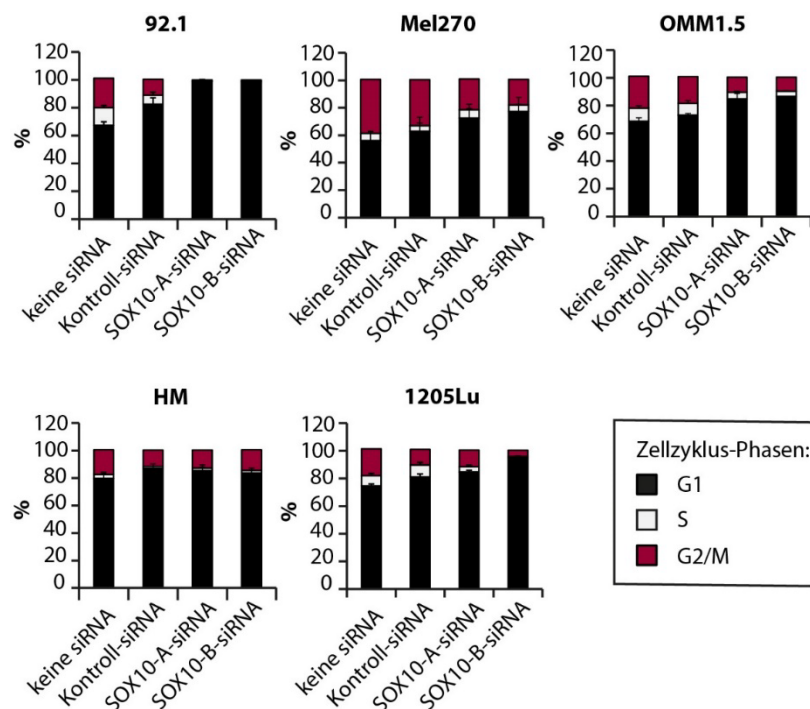


Abb. 11: Analyse der Zellzyklusprogression nach SOX10-Hemmung

Anteil der in den Zellzyklusphasen G1, S und G2/M befindlichen Zellen nach Transfektion mit SOX10-A-, SOX10-B- oder einer Kontroll-siRNA für 48h, Mittelwerte \pm SD, $n = 3$. Keine siRNA: Zellen nur mit Transfektionsreagenz behandelt. Analyse durch Propidiumjodid-Färbung und anschließende durchflusszytometrische Messung.

Der Übergang von der G1-Phase in die S-Phase, in der die DNA verdoppelt wird, wird durch Cycline, CDKs und CDK-Inhibitoren gesteuert und streng kontrolliert [384, 385]. Damit eine Zelle von der G1-Phase in die S-Phase übertreten kann, kommt es zuerst durch die Phosphorylierung von Cyclin D1 über die CDK4 und CDK6 zur Aktivierung dieses Cyclin-CDK-Komplexes [385]. Das Retinoblastom-Protein (Rb) ist einer der Hauptregulatoren des Zellzyklus und bildet Komplexe mit den Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie, darunter E2F1 [386]. Durch die zuvor aktivierten Komplexe aus Cyclin D1-CDK4/6 und Cyclin E-CDK2 kommt es zur Hyperphosphorylierung von Rb an mehreren Aminosäuren des Proteins, wodurch die Bindung von Rb und E2F1 abnimmt und nun das ungebundene E2F1 die Transkription seiner Zielgene stimulieren kann, die für den Übergang in die S-Phase benötigt werden [384-386]. Die Western Blot-Analysen zeigten eine deutliche Hypophosphorylierung und eine leichte Abnahme der Rb-Expression in den UM-Zelllinien bereits 24h nach der Transfektion mit SOX10-spezifischen siRNAs, wie an der im Vergleich zu den Kontrollen geringeren Phosphorylierung des Rb-Proteins an Ser780, Ser795 sowie Ser807 und 811 zu erkennen ist (Abb. 12).

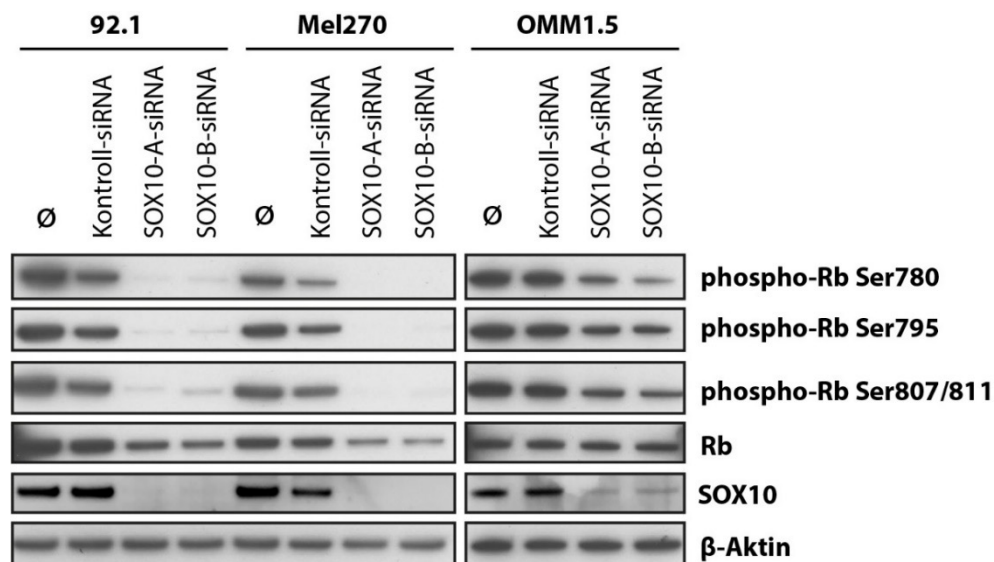


Abb. 12: Analyse der Retinoblastom-Protein-Phosphorylierung nach SOX10-Hemmung

Proteinexpression des Retinoblastom-Proteins (Rb), phosphoryliertem Rb (phospho-Rb; Phosphorylierung an Ser780, Ser795 bzw. Ser807 und Ser811) und SOX10 24h nach Transfektion mit SOX10-A-, SOX10-B- oder einer Kontroll-siRNA. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Ø: Zellen nur mit Transfektionsreagenz behandelt.

Das Tumorsuppressorprotein p53 wird oft als "Wächter des Genoms" bezeichnet, dessen Hauptaufgaben die Induktion des Zellzyklusarrests und der Apoptose, die Kontrolle metabolischer Signalwege, der DNA-Reparatur und die Überführung der Zellen in den Zustand der Seneszenz sind [386, 387]. Das Protein wird vom Gen *TP53* codiert, welches das am häufigsten in Tumoren mutierte Gen ist [386, 387]. DNA-Schäden wie dsDNA-Brüche führen zur Blockierung der ubiquitinabhängigen Degradierung von p53, wodurch p53 akkumuliert und die Transkription seiner Zielgene wie etwa das für p21 codierende *CDKN1A* stimuliert, welches wiederum die Funktion der CDKs hemmt [385,

386, 388, 389]. Dies wiederum kann zu einer Hypophosphorylierung von Rb führen, wodurch der Transkriptionsfaktor E2F1 an dieses gebunden bleibt, der Übergang in die S-Phase verhindert wird und somit einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase ausgelöst wird [385]. In der G1-Phase ist p21 der entscheidende Mediator des p53-induzierten Zellzyklusarrests [389-391]. Abgesehen von p21 kann p53 auch die Expression von proapoptotischen Proteinen induzieren [387, 392, 393]. Das Protein p27 wird vom Gen *CDKN1B* codiert und ist ebenfalls ein CDK-Inhibitor, der die Aktivität von Komplexen aus CDKs und verschiedenen Cyclinen inhibieren kann [394]. Für die Transition von der G1- in die S-Phase ist eine fortschreitende Abnahme von p27 und dadurch die Aufhebung der Inhibierung der Komplexe Cyclin E-CDK2 und Cyclin-A-CDK2 nötig [394].

48h nach SOX10-Hemmung kam es zu keiner Veränderung der p53-Expression in den drei untersuchten UM-Zelllinien (Abb. 13). Die Analyse der p21-Expression ergab ein uneindeutiges Bild. Bei der Zelllinie 92.1 zeigten die mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen die geringste Expression, während die mit Transfektionsreagenz bzw. SOX10-siRNAs transfizierten Zellen p21 deutlich exprimierten. In Mel270 war p21 nach der Transfektion mit der Kontroll-siRNA nachweisbar, jedoch nicht nach Transfektion mit den SOX10-spezifischen siRNAs. Dagegen war p21 in der Zelllinie OMM1.5 sowohl in den Kontrollzellen als auch nach der Transfektion mit siRNAs (Kontrolle oder SOX10-spezifisch) detektierbar. Die Hemmung von SOX10 führte dort aber tendenziell zu einer leichten Abnahme der p21-Expression verglichen mit den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen. Eine eindeutige Induktion von p27 konnte nur in der Zelllinie 92.1 nach SOX10-Hemmung nachgewiesen werden, in Mel270 war kein p27 nachweisbar und in OMM1.5 nur nach Transfektion mit SOX10-B-siRNA.

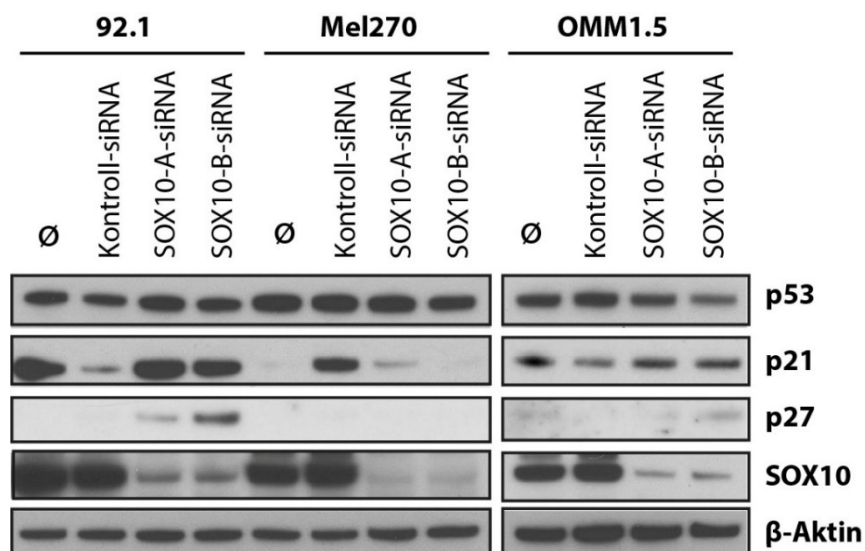


Abb. 13: Proteinexpression von p53, p21 und p27 nach SOX10-Hemmung

Proteinexpression von p53, p21, p27 und SOX10 48h nach Transfektion mit SOX10-A-, SOX10-B- oder einer Kontroll-siRNA. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Ø: Zellen nur mit Transfektionsreagenz behandelt.

Zusammengefasst deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die Hemmung von SOX10 zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase des Zellzyklus führt. Darüber hinaus spricht die fehlende Akkumulation von p53 nach SOX10-Hemmung dafür, dass der Zellzyklusarrest weitgehend p53-unabhängig induziert wird.

3.2.3 Induktion der intrinsischen Apoptose

Die Apoptose ist eine spezielle Form des programmierten Zelltodes, die erstmals von Kerr et al. in dieser Form beschrieben wurde [395]. Bei der Apoptose kommt es im Rahmen eines genau kontrollierten, energieabhängigen Prozesses zum Schrumpfen der Zellen und zur Kondensierung des Chromatins im Zellkern (Pyknose), gefolgt von der blasenförmigen Ausbuchtung der Zellmembran, Fragmentierung der DNA (Karyorrhexis) und letztlich der Aufteilung der Zellfragmente in membranumhüllte Zellteile (Apoptosekörper) [395, 396]. Apoptose kann durch eine Vielzahl an endogenen und exogenen Stimuli während der Embryonalentwicklung, des Alterns oder zur Aufrechterhaltung der Gewebshomöostase als Folge von Immunreaktionen, nach Beschädigungen und der Exposition gegenüber schädlichen Noxen sowie durch die Bindung von Liganden an Todesrezeptoren ausgelöst werden [396]. Falls ein DNA-Schaden während eines Zellzyklusarrests nicht ausreichend repariert werden kann, kann das Checkpoint-Signaling auch zur Apoptoseinduktion führen [385]. Die Inhibition von SOX10 führte zur Verringerung der Zellviabilität und morphologischen Veränderungen in Form von abgerundeten und abgelösten, zum Teil blasenartig veränderten Zellen, so dass die Vermutung nahelag, dass in den Zellen Apoptose ausgelöst wurde. Veränderungen der Zellmembranzusammensetzung wie die Exposition von PS an der Zelloberfläche, wie sie im Rahmen der Apoptose auftreten, können mittels Annexin V-Färbung nachgewiesen werden und kombiniert mit einer Propidiumjodid-Färbung für eine Zelltodanalyse mittels Durchflussszytometrie genutzt werden [358, 359]. Für diese Analysen wurden HM, 1205Lu sowie den UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 mit SOX10-spezifischen siRNAs, Kontroll-siRNA oder nur Transfektionsreagenz für 48h behandelt, dann die Zellen geerntet, mit Annexin V und Propidiumjodid gefärbt und durchflussszytometrisch untersucht.

Die Analysen zeigten 48h nach der Transfektion mit SOX10-spezifischen siRNAs einen starken Anstieg der apoptotischen und toten Zellen in den Zelllinien 92.1 und Mel270, während in 1205Lu, OMM1.5 sowie HM kaum Veränderungen beobachtbar waren (Abb. 14). Bei den zuletzt genannten Zellen traten jedoch auch in den zuvor durchgeführten Analysen der Zellviabilität und der Zellzyklusprogression kaum Veränderungen nach SOX10-Hemmung zu diesem Analysezeitpunkt auf.

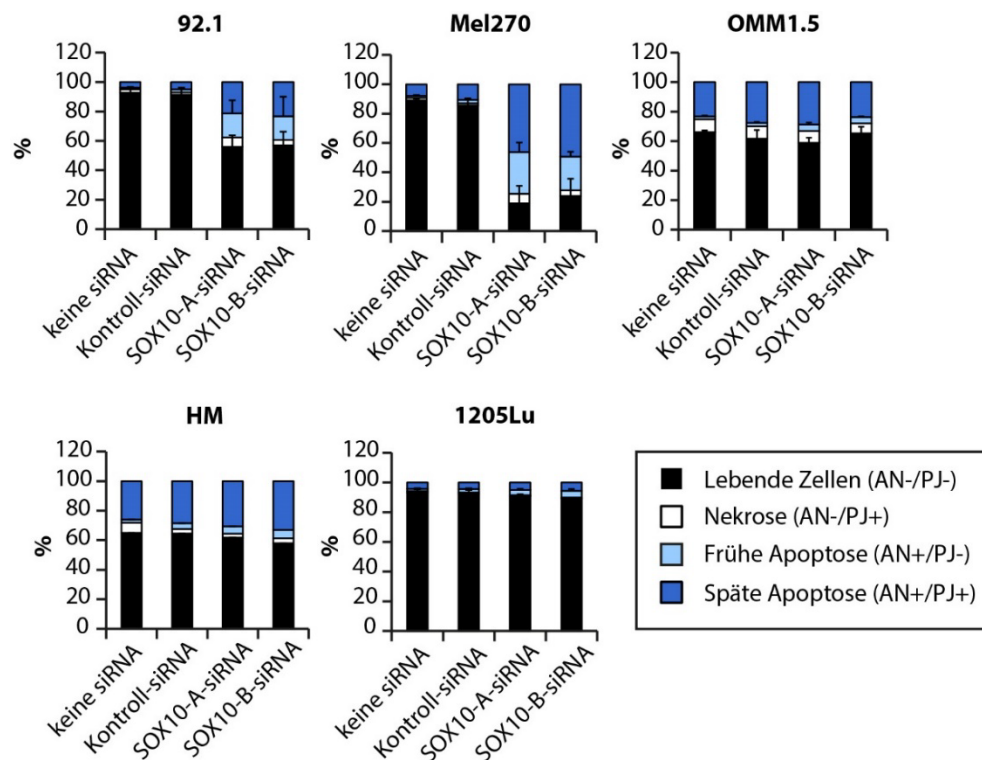


Abb. 14: SOX10-Hemmung induziert Apoptose in UM-Zellen

Zelltodanalysen mittels Annexin V-Propidiumjodid-Färbung und anschließende Durchflusszytometrie nach SOX10-Hemmung. Anteil der lebenden (AN-/PJ-), nekrotischen (AN-/PJ+), früh- (AN+/PJ-) und spätapoptotischen (AN+/PJ+) Zellen nach Transfektion mit SOX10-A-, SOX10-B- oder einer Kontroll-siRNA oder Behandlung nur mit Transfektionsreagenz (HM: jetPRIME®, andere Zellen: Lipofectamine® RNAiMAX; „keine siRNA“) für 48h, Mittelwerte \pm SD, n = 3. AN: Annexin V, PJ: Propidiumjodid.

Die Apoptose kann über den extrinsischen oder den intrinsischen Signalweg ausgelöst werden, die beide letztlich zur Spaltung der Caspase 3, DNA-Fragmentierung und Ausbildung der Apoptosekörper führen [396]. Die Initiierung beider Wege ist dabei essenziell von der Aktivierung verschiedener Cystein-Aspartat-Proteasen, den Caspasen, abhängig [397]. Die Caspasen werden als inaktive Proenzyme (Procaspasen) gebildet, die nach ihrer Aktivierung wiederum andere Caspasen oder sich selbst spalten und dadurch aktivieren können, wodurch es zu einer Verstärkung der proapoptotischen Kaskade kommt [396]. Initiatorcaspasen wie die Caspasen 2, 8, 9 und 10 stehen dabei am Anfang der Kaskade, während die Effektorcaspasen 3, 6 und 7 letztlich die zellulären Veränderungen der Apoptose vermitteln [396]. Während der extrinsische Apoptoseweg durch die Bindung von externen Liganden wie TNF- α oder Fas-Ligand an Todesrezeptoren ausgelöst wird und über Caspase 8 vermittelt wird [396, 397], wird der intrinsische, mitochondriale Apoptoseweg unabhängig von Rezeptoren über negative Faktoren wie das Fehlen von Hormonen, Zytokinen oder Wachstumsfaktoren oder positive Faktoren wie ROS, Toxine, Strahlung, Hypoxie, Hyperthermie oder virale Infektionen ausgelöst [396-398]. Er beinhaltet als zentralen Punkt die Veränderung der mitochondrialen Permeabilität, wodurch proapoptotische Proteine wie Cytochrom C vom Mitochondrium in das

Zytosol gelangen [396-398]. Dieses bildet dann zusammen mit Apaf-1 und der Procaspase 9 den Proteinkomplex des Apoptosoms, was zur Aktivierung der Caspase 9 führt [396-398]. Die Proteine der Bcl-2-Familie kontrollieren die mitochondrialen Ereignisse der Apoptose, indem sie die Permeabilität der Mitochondrienmembran und die Cytochrom C-Freisetzung ins Zytosol beeinflussen [396, 399]. Proteine wie Bcl-2, Bcl-w, Bcl-xL wirken antiapoptotisch, während Bak, Bax, Bid, Bik, Bim und Bad die Apoptose fördern [396, 399]. Bak und Bax bilden dabei Oligomere in der Mitochondrienmembran, was zu deren Permeabilisierung und so zur Cytochrom C-Freisetzung aus den Mitochondrien führt [398, 399]. Sowohl der intrinsische als auch der extrinsische Signalweg enden in einer gemeinsamen Signalkaskade, die durch die Aktivierung der Effektorcaspasen wie der Caspase 3 durch die Initiatorcaspasen Caspase 8, 9 und 10 induziert wird und zur Spaltung verschiedener Proteine führt, darunter auch die Poly(ADP-ribose)-Polymerase (PARP), und es letztlich zur DNA-Fragmentierung und Ausbildung der Apoptosekörper kommt [396, 397].

Um den Mechanismus der Apoptoseinitiierung genauer zu untersuchen, wurde die Proteinexpression verschiedener Proteine des intrinsischen Apoptoseweges durch Western Blot-Analysen nach SOX10-Hemmung untersucht. 48h nach Transfektion mit SOX10-spezifischen siRNAs kam es in den Zelllinien 92.1 und Mel270 zu einer deutlichen Spaltung der Procaspase 3 und 9 (Abb. 15A). In OMM1.5 war ebenfalls eine Spaltung der Procaspase 9 nachweisbar, die jedoch weniger stark als in den Zelllinien 92.1 und Mel270 ausgeprägt war. Wie aufgrund der durchflusszytometrischen Analysen nach Annexin V-Propidiumjodid-Färbung zu erwarten war, konnte gespaltene Caspase 3 in der Zelllinie OMM1.5 kaum nachgewiesen werden. Ebenfalls 48h nach der siRNA-Transfektion wurden die Expressionen der proapoptotischen Proteine Bak, Bax und Cytochrom C sowie der antiapoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-w und Bcl-xL analysiert. Die Expression von Bak, Bax, Bcl-2 und Bcl-w blieb weitgehend konstant, lediglich in Mel270 war eine leichte Verringerung der Bcl-2-Expression im Vergleich zur Kontrolle erkennbar, während von Bcl-xL in zwei Zelllinien (92.1, Mel270) nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. 15B und C). Die Expression von Cytochrom C stieg nach SOX10-Hemmung in der Zelllinie OMM1.5 an, während sie sich in der Zelllinie 92.1 nicht veränderte und in Mel270 abnahm.

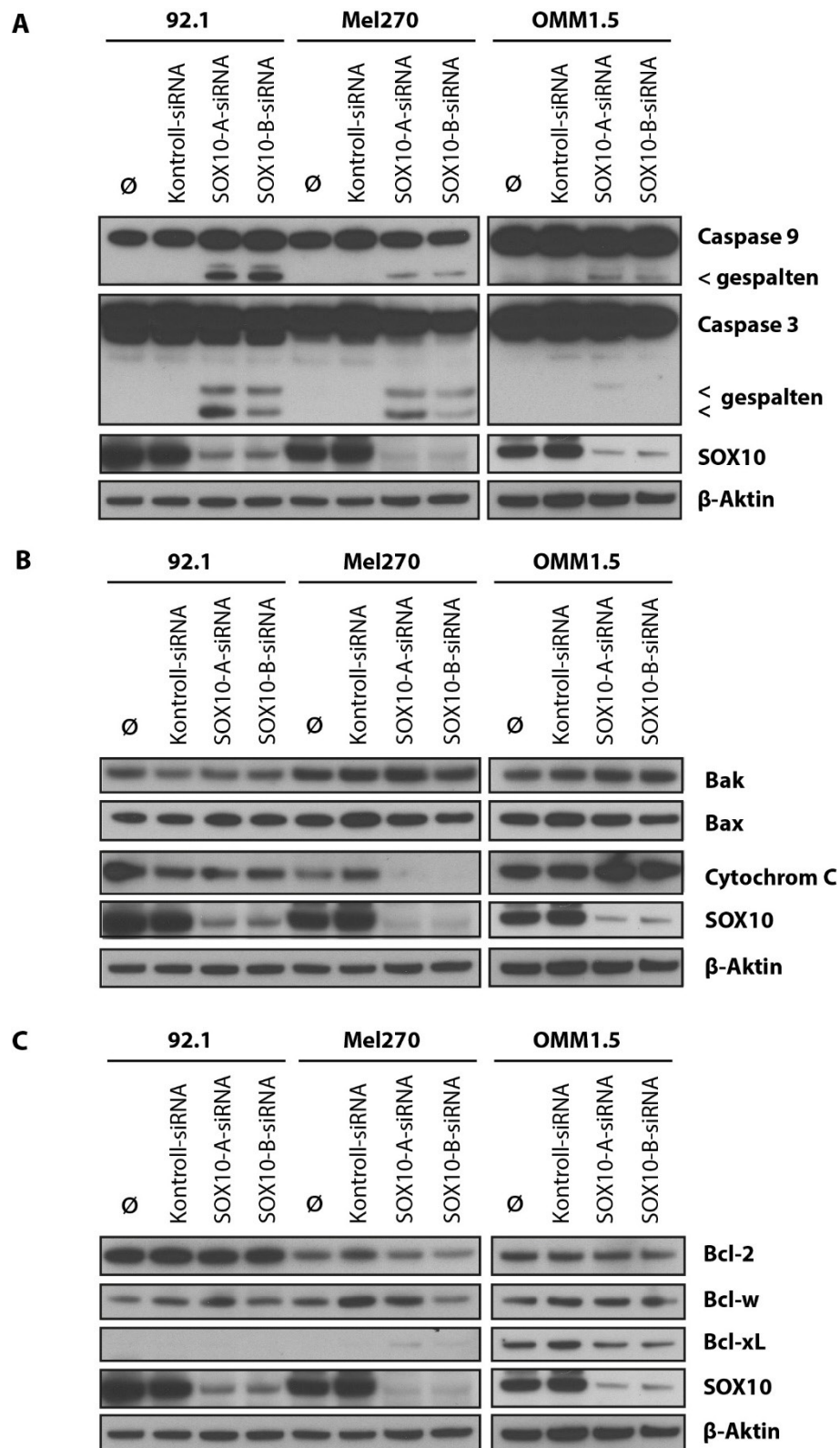


Abb. 15: Analyse der Proteinexpression pro- und antiapoptotischer Proteine des intrinsischen Apoptoseweges

(A) Proteinexpression von SOX10 und Spaltung der Procaspasen 9 und 3, (B) der proapoptotischen Proteine Bak, Bax und Cytochrom C sowie (C) der antiapoptotischen Proteine Bcl-2, Bcl-w und Bcl-xL 48h nach Transfektion mit SOX10-A-, SOX10-B- oder einer Kontroll-siRNA. Ø: Zellen nur mit Transfektionsreagenz behandelt. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob eine pharmakologische Inhibition der Caspase 3 den Zelltod nach SOX10-Hemmung verringern kann. Dazu wurden die beiden Zelllinien 92.1 und Mel270, die bereits 48h nach der Transfektion mit SOX10-spezifischen siRNAs deutliche Anzeichen der Apoptose zeigten, zuerst für 1h mit dem spezifischen, irreversiblen Caspase-3-Inhibitor Z-DEVD-FMK oder dem Lösungsmittel DMSO als Kontrolle vorinkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit SOX10-siRNAs oder einer Kontroll-siRNA in Anwesenheit von Z-DEVD-FMK transfiziert und nach 48h die Zellviabilität bestimmt sowie die Zellen für Western Blot-Analysen geerntet. Die Transfektion mit SOX10-spezifischen siRNAs reduzierte die Zellviabilität der Zelllinie 92.1 deutlich wie bereits zuvor gezeigt (Abb. 16A). Die Zellviabilität der Zellen, die vor und während der Transfektion mit SOX10-siRNAs mit dem Inhibitor Z-DEVD-FMK inkubiert worden waren, war jedoch höher als die der Kontrollzellen, die mit DMSO anstatt Z-DEVD-FMK behandelt worden waren. Allerdings war die Zellviabilität trotzdem noch deutlich niedriger im Vergleich zu den Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA transfiziert worden waren. Die Western Blot-Analysen zeigten eine verringerte Spaltung von PARP sowie der Procaspase 3 bei einem Teil der mit SOX10-siRNAs und Z-DEVD-FMK-inkubierten Zellen im Vergleich zu Zellen nach SOX10-Hemmung ohne Apoptose-Inhibitor (Abb. 16B und C).

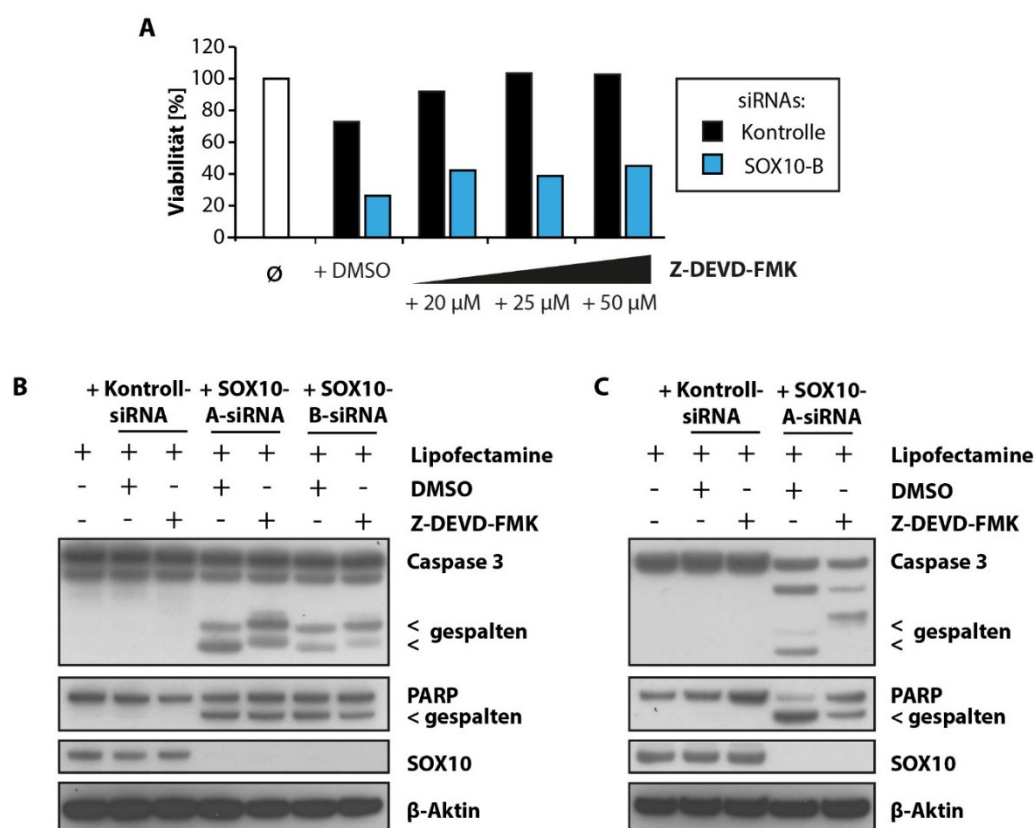


Abb. 16: Inhibition der Apoptose nach SOX10-Hemmung durch den Caspase-3-Inhibitor Z-DEVD-FMK

(A) Zellviabilität der UM-Zelllinie 92.1 48h nach Transfektion mit SOX10-B-siRNA oder einer Kontroll-siRNA. Die Zellen wurden 1h vor der Transfektion und dann während der gesamten Versuchslaufzeit mit Z-DEVD-FMK oder DMSO (Kontrolle) inkubiert, n = 1. Ø: unbehandelte Zellen.

Proteinexpression von SOX10 sowie Spaltung der Procaspase 3 und PARP nach Inkubation mit 20 μ M Caspase-Inhibitor Z-DEVD-FMK oder DMSO und Transfektion mit SOX10-A-, SOX10-B- oder einer Kontroll-siRNA für 48h in den UM-Zelllinien (B) 92.1 bzw (C) Mel270. Die Zellen wurden analog zu den Zellviabilitätsexperimenten in (A) vor der Transfektion mit 20 μ M Z-DEVD-FMK oder DMSO für 1h vorinkubiert. β -Aktin diene als Ladekontrolle.

Die Daten deuten also darauf hin, dass die Hemmung von SOX10 zum Zelltod durch Apoptose führt. Insgesamt sind die verursachten Veränderungen aber so gravierend, dass eine Caspasehemmung alleine den Zelltod nicht komplett verhindern kann.

3.2.4 Analyse von DNA-Schadensmarkern

DNA-Schäden sind eine der Hauptursachen für einen Zellzyklusarrest [385]. dsDNA-Brüche kommen relativ selten vor, können jedoch zu weitreichenden Folgen wie größeren chromosomalen Aberrationen führen, wenn es bei ihrer Reparatur zu Fehlern bzw. einer fehlerhaften Rekombination kommt [400]. Sie können durch eine Vielzahl an exogenen und endogenen Faktoren oder auch im Rahmen der DNA-Fragmentierung während der Apoptose entstehen [400, 401]. Die C-terminale Phosphorylierung der Histonvariante H2A.X an Ser139 (γ -H2A.X) wird nach dsDNA-Brüchen durch die Serin/Threoninkinasen ATM, ATR und DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) induziert und dient als Markierung von DNA-Bruchstellen und zum Andocken von verschiedenen DNA-Reparaturproteinen [400-402]. Um zu untersuchen, ob es durch die SOX10-Hemmung zum vermehrten Auftreten von DNA-Schäden kommt, wurde die Expression von γ -H2A.X nach SOX10-Inhibition untersucht. Die γ -H2A.X-Expression war in 92.1 und Mel270 stark erhöht, wohingegen in OMM1.5 kaum eine Veränderung im Vergleich zu den mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen sichtbar war (Abb. 17). Die Analyse von Zellen, die 12h und 24h nach der Transfektion mit SOX10-spezifischen siRNAs geerntet waren, zeigte insbesondere bei der Zelllinie Mel270 einen Anstieg der γ -H2A.X-Expression erst nach 24h im Vergleich zu den Kontrollen, während eine Spaltung der Procaspase 3 sowie von PARP bereits nach 12h nachgewiesen werden konnte. Somit scheint es zuerst zur Apoptoseinduktion und dann zur Ausbildung von dsDNA-Brüchen zu kommen.

Diese Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, dass die Hemmung von SOX10 zwar zu dsDNA-Brüchen führt, diese aber vermutlich kein unmittelbarer Auslöser des Zellzyklusarrests bzw. der Apoptose sind.

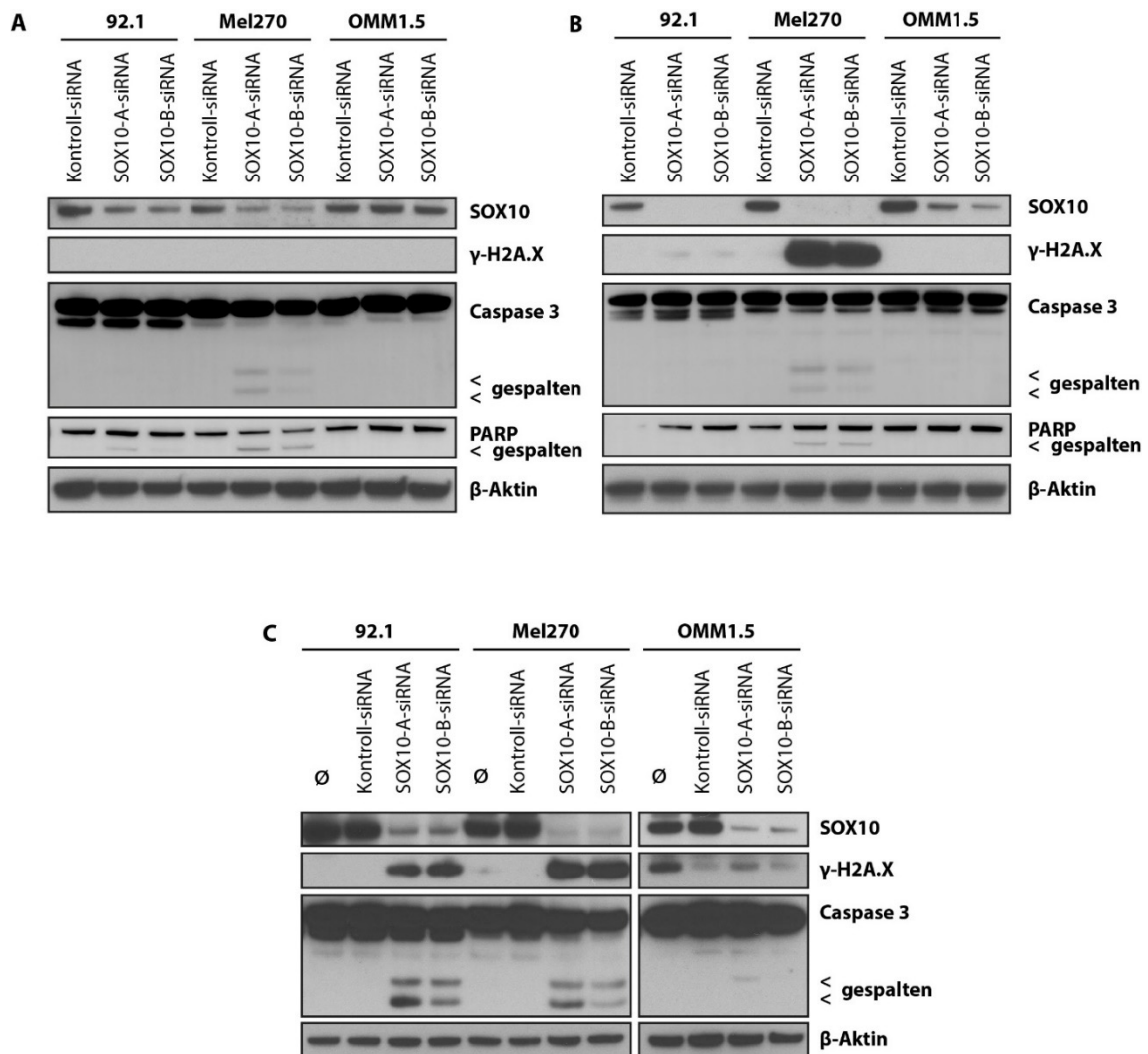


Abb. 17: Expression von DNA-Schadensmarkern und Zellzyklusinhibitoren nach SOX10-Hemmung.

Proteinexpression von γ-H2A.X, einem Marker für DNA-Doppelstrangbrüche sowie von Caspase 3 und PARP (A) 12h und (B) 24h nach Transfektion mit SOX10-spezifischen siRNAs oder einer Kontroll-siRNA. Ladekontrolle: β-Aktin. (C) Im Vergleich dazu Proteinexpression von γ-H2A.X, Caspase 3 und SOX10 48h nach Transfektion mit SOX10-A-, SOX10-B- oder einer Kontroll-siRNA. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Ø: Zellen nur mit Transfektionsreagenz behandelt.

3.2.5 Analyse verschiedener Signaltransduktionswege nach SOX10-Hemmung

Um zu entschlüsseln, welchen Einfluss SOX10 auf die Aktivität wichtiger Signalwege im UM ausübt, wurde die Proteinexpression und Phosphorylierung von Proteinen des MAPK- und Akt-Signalweges in den Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 basal sowie nach SOX10-Hemmung analysiert. Hierfür wurden Western Blot-Analysen von unbehandelten Zellen sowie 24h nach Transfektion mit SOX10-siRNAs oder einer Kontroll-siRNA durchgeführt. Die basale Expression wurde zudem mit der Expression in unbehandelten HM und der KM-Zelllinie 1205Lu verglichen.

3.2.5.1 Aktivität des MAPK-Signalweges über ERK und p38

ERK1 (p44) und ERK2 (p42) sind Kinasen des BRAF/MEK/ERK-Signalweges, der zentral an der Regulation und Förderung der Proliferation und des Überlebens von Zellen beteiligt ist [403, 404]. Dieser Signalweg ist insbesondere im Kontext des UM interessant, da er über die G-Proteine GNAQ und GNA11 aktiviert werden kann, die im UM häufig durch Mutationen konstitutiv aktiv sind [71, 76]. Die Aktivität wird durch die Phosphorylierung an Thr202 und Tyrosin (Tyr) 204 von ERK1 und Thr183 und Tyr185 von ERK2 durch die im Signalweg vorgeschalteten Kinasen MEK1 und MEK2 vermittelt, die wiederum durch BRAF ebenfalls durch Phosphorylierung aktiviert werden [405, 406]. Nach der Aktivierung kommt es zur Translokation und Akkumulation von ERK1 und ERK2 im Zellkern, wo sie unter anderem die Aktivität von Transkriptionsfaktoren durch Phosphorylierung erhöhen, die wiederum die Expression von Zellzyklusregulationsproteinen steuern [403, 404, 406, 407].

Basal war die Proteinexpression von ERK1 und ERK2 in allen vier untersuchten Zelllinien sowie den HM nahezu identisch (Abb. 18A). Die Phosphorylierung und damit Aktivität des Signalweges unterschied sich jedoch deutlich zwischen den einzelnen Zelllinien. Die stärkste Phosphorylierung von ERK1 (phospho-ERK1) und ERK2 (phospho-ERK2) unter allen Zellen wurde bei der KM-Zelllinie 1205Lu detektiert. ERK1 war außer in den 1205Lu-Zellen nur in HM und in der UM-Zelllinie 92.1 schwach phosphoryliert. Im Vergleich zu phospho-ERK1 war die Bande von phospho-ERK2 wiederum deutlich stärker ausgeprägt und konnte in HM, 92.1 und OMM1.5 nachgewiesen werden. Die phospho-ERK2-Expression unterschied sich zwischen diesen drei Zelltypen jedoch kaum. Somit konnte nur für die Zelllinie Mel270 keine basale Aktivität des ERK-Signalings nachgewiesen werden.

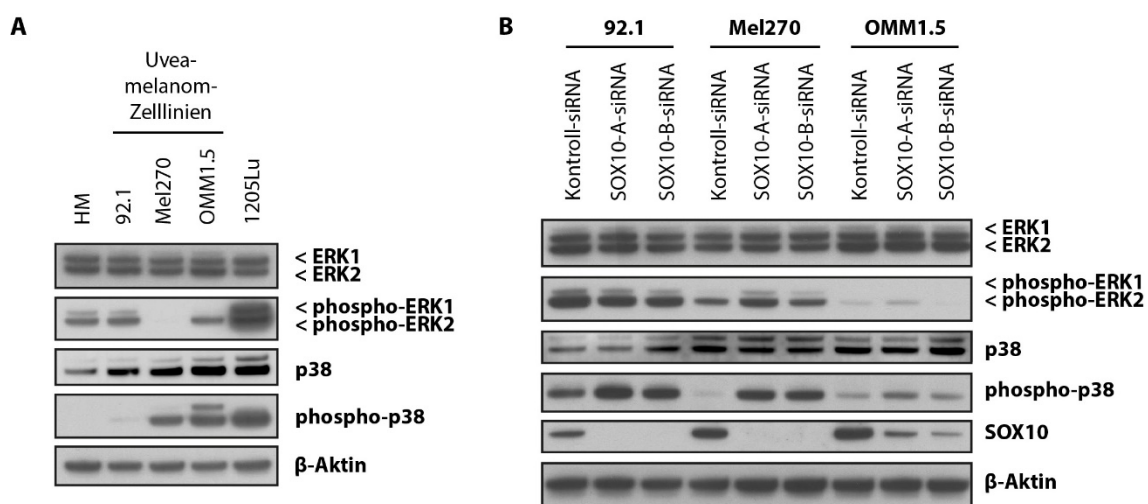


Abb. 18: Expression der MAP-Kinasen ERK1, ERK2 und p38

(A) Basale Proteinexpression und Aktivität der MAP-Kinasen ERK1, ERK2 und p38. (B) Proteinexpression und Phosphorylierung der MAP-Kinasen ERK1, ERK2 und p38 nach Transfektion mit SOX10-A-, SOX10-B- oder einer Kontroll-siRNA für 24h. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Der p38-Signalweg ist ein zweiter MAPK-Signalweg, der durch Stress wie Hypoxie, UV-Strahlung, oxidativen Stress sowie inflammatorische Zytokine wie Interleukin (IL)-1 und TNF- α aktiviert werden kann und an der Regulation der Apoptose- und Zellzyklusarrest-induktion, der Differenzierung und auch bei der Immunantwort beteiligt ist [407-409]. Analog zu ERK1/2 werden auch die p38-Kinasen durch Phosphorylierung von Tyrosin (Tyr182) und Threoninresten (Thr180) in der Aktivierungsschleife des Proteins aktiviert [408]. Die vier p38-Isoformen (α , β , γ , δ) werden von verschiedenen Genen codiert und können alle durch MEK6 phosphoryliert und damit aktiviert werden [407, 408]. Die Kinase MEK3 hingegen aktiviert vor allem p38 α , γ und δ [408]. Speziell nach dsDNA-Brüchen kommt es jedoch zu einer Akkumulation von p38 α im Zellkern, sodass davon ausgegangen wird, dass das Protein beim G2/M-Arrest und der DNA-Reparatur eine Rolle spielt [410]. Zudem kann die Aktivierung von p38 zum Arrest am Übergang von der G1- in die S-Phase führen [409]. Zu den von p38 phosphorylierten Proteinen gehören unter anderem Kinasen, Transkriptionsfaktoren sowie Proteine der Zellzyklus- und Apoptoseregulation wie CDK-Inhibitoren, Cyclin D1 und Proteine der Bcl-2-Familie [407-409, 411]. Durch die Phosphorylierung von PP2A und der daraus resultierenden Dephosphorylierung von MEK1/2 kann p38 außerdem die ERK1/2-Signalachse hemmen [412].

Die Analysen zeigten eine basale p38-Expression in allen untersuchten Zellen, wobei die Zelllinien OMM1.5 und 1205Lu die höchste und HM die niedrigste Expression aufwiesen. Die KM-Zelllinie 1205Lu zeigte wie schon bei der Analyse von ERK die stärkste basale p38-Phosphorylierung (phospho-p38), gefolgt von den Zelllinien OMM1.5 und Mel270. Nur eine sehr schwache Bande konnte bei 92.1 und keine Bande bei HM nachgewiesen werden (Abb. 18A).

Neben der basalen Expression wurden auch die Veränderungen in der Aktivität der Signalwege nach SOX10-Hemmung mittels Western Blot-Analysen untersucht. In der Zelllinie 92.1 kam es dabei zu einer geringfügigen Verringerung der phospho-ERK1- und phospho-ERK2-Expression und einem Anstieg der phospho-p38-Expression, nicht aber von p38 selbst (Abb. 18B). In der Zelllinie Mel270 wurde hingegen eine Zunahme von phospho-ERK1 und phospho-ERK2 sowie von phospho-p38 detektiert. Ebenfalls war eine Zunahme von phospho-p38 in OMM1.5 erkennbar. Die Expressionslevel von phospho-ERK2 änderten sich nach Transfektion mit der siRNA SOX10-A nicht, waren aber nach Transfektion mit der zweiten SOX10-spezifischen siRNA SOX10-B in dieser Zelllinie verringert. Somit schien es in allen drei Zelllinien zu einer Zunahme der p38-Aktivität nach SOX10-Hemmung zu kommen, wohingegen die ERK-Aktivität zelllinienabhängig variierte. Interessant war hierbei, dass sich die Aktivität von ERK1 und ERK2 nach Transfektion mit der Kontroll-siRNA teilweise von der der unbehandelten Zellen unterschied. Während beispielsweise basal kein phospho-ERK1 und phospho-ERK2 in der Zelllinie Mel270 nachweisbar war, zeigte sich nach Transfektion mit der Kontroll-siRNA eine Phosphorylierung von ERK2. Andererseits war die basale phospho-ERK2-Expression von OMM1.5 relativ deutlich ausgeprägt, während sie nach Transfektion mit der Kontroll-siRNA kaum noch nachweisbar war.

3.2.5.2 Aktivität des Akt-Signalweges

Die PI3-Kinase/Akt-Achse ist ein weiterer Signalweg, der das Überleben und das Zellwachstum entscheidend beeinflusst [413, 414]. Eine dauerhafte Aktivierung der Kinase Akt wurde bei vielen Tumorentitäten und sowohl bei UM-Primärtumoren als auch Zelllinien nachgewiesen [413-416]. Der Signalweg wird normalerweise durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren aktiviert [413]. Nach der Autophosphorylierung dieser RTK kommt es zur Rekrutierung der Kinase PI3K an den Rezeptor, die in der Zellmembran die Umsetzung von PIP_2 zu Phosphatidylinositoltriphosphat (PIP_3) katalysiert [413, 414]. PIP_3 wiederum rekrutiert die *3-phosphoinositide dependent protein kinase 1* (PDK1) und den *mechanistic Target of Rapamycin* (mTOR)-Komplex 2, welche Akt an Thr308 bzw. Serin (Ser) 473 phosphorylieren und damit aktivieren kann [413, 417, 418]. Negativer Regulator des PI3K/Akt-Signaling ist das Protein *Phosphatase and Tensin Homolog* (PTEN) [413, 419]. Akt hemmt die Aktivität unter anderem von p27, Bad und der Caspase 9, wodurch es zu einer Hemmung der Apoptose, Verringerung des Zellzyklusarrests, Aktivierung des mTOR- und NF- κ B-Signalweges, Erhöhung der Lipidsynthese sowie Förderung der Angiogenese kommt [413, 420-422].

In dieser Arbeit wurde sowohl die basale Expression als auch die Aktivität von Akt durch Analyse der Phosphorylierung von Serin 473 (phospho-Akt Ser473) bestimmt. Basal zeigten sich kaum Unterschiede in der Akt-Expression der untersuchten Zellen (Abb. 19A). Die stärkste Phosphorylierung zeigte – wie schon bei der Analyse von ERK und p38 – die KM-Zelllinie 1205Lu gefolgt von der UM-Zelllinie OMM1.5 und den HM. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Zelllinien 92.1 und Mel270 nur eine schwache Bande. Nach SOX10-Hemmung war in allen drei Zelllinien allenfalls eine geringe Abnahme der phospho-Akt Ser473-Expression zu beobachten, während sich die Expression von Akt nicht veränderte (Abb. 19B). Analog zu den Untersuchungen des MAPK-Signalweges fiel jedoch auch hier auf, dass sich die basalen phospho-Akt-Spiegel der unbehandelten Zellen von denen nach Transfektion mit der Kontroll-siRNA unterschieden.

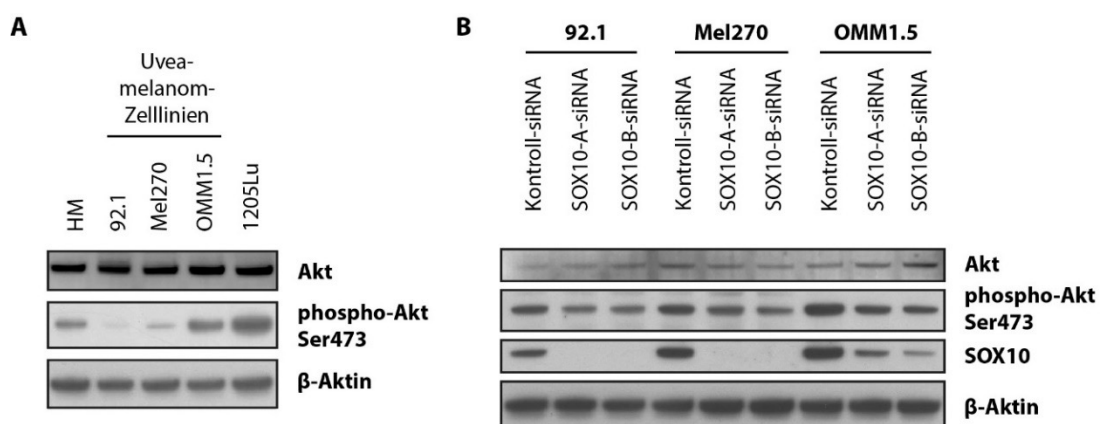


Abb. 19: Aktivität des Akt-Signalweges basal und nach Hemmung von SOX10

(A) Basale Proteinexpression und Phosphorylierung (phospho-Akt Ser473) von Akt. (B) Proteinexpression und Phosphorylierung (phospho-Akt Ser473) von Akt nach Transfektion mit SOX10-A-, SOX10-B- oder einer Kontroll-siRNA für 24h. β -Aktin diente als Ladekontrolle.

Insgesamt war nur für die Zelllinie OMM1.5 eine basale Aktivierung aller drei untersuchten Signalwege nachweisbar. In 92.1-Zellen war primär der ERK-Signalweg aktiviert, wohingegen in Mel270 vor allem der p38-Signalweg aktiviert war. Durch SOX10-Hemmung kam es zu einer Aktivierung des p38-Signalweges und einer Verringerung des Akt-Signalweges, während sich die Aktivität des ERK-Signalweges stark zwischen den untersuchten Zelllinien unterschied.

3.2.5.3 Analyse weiterer Signalwege

Neben den MAPK- und Akt-Signalwegen gibt es noch eine Reihe weiterer Signalwege, die möglicherweise durch die SOX10-Hemmung verändert werden und funktionell zum Zelltod beitragen könnten. Um diese in einem breitangelegten Ansatz simultan zu untersuchen, wurden die Zelllinien 92.1 und Mel270 mit SOX10-B- oder Kontroll-siRNA für 24h transfiziert und die Zelllysate mittels Phospho-Kinase-Array analysiert (Abb. 20A und B). Die densitometrische Analyse ergab jedoch nur geringfügige Unterschiede zwischen den Kontrollen und den behandelten Zellen (Abb. 20C und D). Eine leicht erhöhte Phosphorylierung wurde für die Proteine Akt (an Thr308), p27, CREB, Chk-2, mTOR, Lyn, Yes, PDGF-R β , p53 (an Ser46) sowie die STAT-Proteine STAT2, STAT5a/b, und STAT6 in beiden Zelllinien sowie von EGFR in 92.1 nachgewiesen. In Mel270 war hingegen die Phosphorylierung von c-Jun nach SOX10-Hemmung vermindert. Insgesamt waren diese Unterschiede allerdings relativ gering ausgeprägt und wurden daher im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter untersucht.

Abb. 20: Aktivitätsanalyse weiterer Signalwege nach SOX10-Hemmung mittels Phospho-Kinase-Array

(A, B) Röntgenfilmaufnahme des Phospho-Kinase-Arrays. Die Array-Membranen wurden mit Zelllysaten inkubiert, die von den Zelllinien 92.1 (A) und Mel270 (B) nach Transfektion mit SOX10-B- oder Kontroll-siRNA für 24h stammten. Der Nachweis der Antikörperbindung erfolgte durch Chemilumineszenz. (C, D) Ergebnis der densitometrischen Auswertung des Phospho-Kinase-Array. (C) UM-Zelllinie 92.1, (D) UM-Zelllinie Mel270. Mittelwerte \pm SD, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Abb. 20 siehe Folgeseite

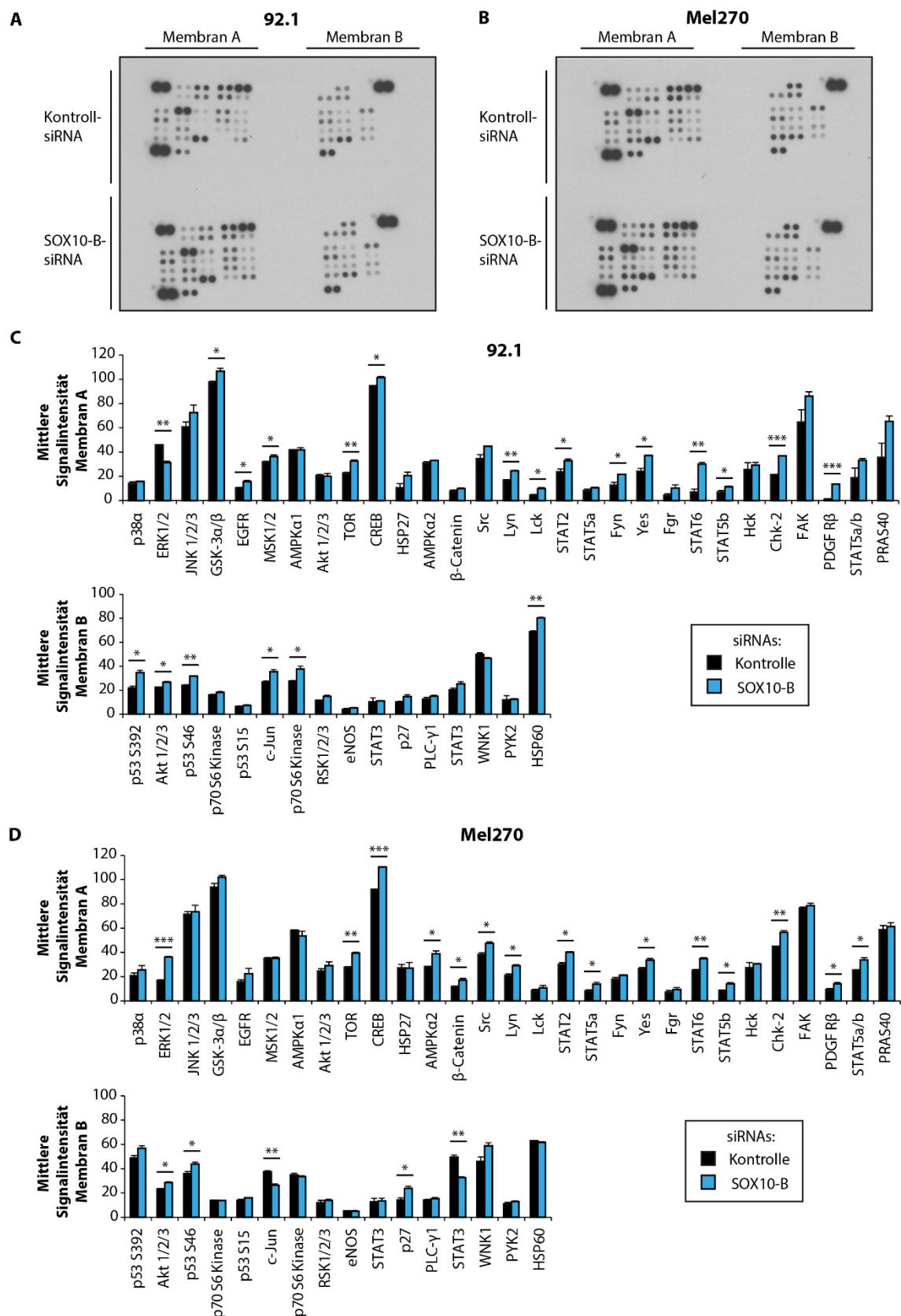


Abb. 20, Beschreibung siehe S. 127

Da SOX10 ein Transkriptionsfaktor ist, sind ein Teil der beobachteten Effekte der SOX10-Hemmung auf eine direkte Veränderung der Genexpression seiner Zielgene zurückzuführen. Diese könnten möglicherweise auch leichter pharmakologisch gehemmt und dadurch für eine zielgerichtete Therapie besser geeignet sein als SOX10 selbst, für das bisher noch kein spezifischer Inhibitor existiert [423]. Um in einem umfassenden Ansatz die Veränderungen des Genexpressionsprofils zu untersuchen und potenzielle SOX10-Zielgene oder Mediatoren der Effekte im UM zu identifizieren, wurden die Zelllinien 92.1 und Mel270 mit SOX10-B-siRNA oder einer Kontroll-siRNA transfiziert, die RNA nach 24h isoliert und eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Die Anzahl der sequenzierten Leseraster betrug dabei zwischen 73,588 und 96,113 Mio Fragmente und die der sequenzierten Basen betrug zwischen 14,621 und 18,89 Mrd. Basen. Die durchschnittliche Länge der getrimmten FASTQ-Reads betrug 100-102 bp.

Der Principal Component-Analyse (PCA) liegt ein mathematischer Algorithmus zugrunde, mit dessen Hilfe die Dimensionalität der Daten reduziert werden kann, wobei allerdings die Variation im Datensatz erhalten bleibt, indem Richtungen (*directions*) identifiziert werden (= *principal components*), entlang derer die Variation der Daten maximal ist [424]. Die PCA der RNA-Sequenzierungsdaten zeigte eine eindeutige Trennung der Cluster der beiden Zelllinien als auch der Cluster der mit SOX10-B- und Kontroll-siRNA transfizierten Zellen, was auf eine große Variation der Genexpressionsdaten zwischen den verschiedenen Gruppen hindeutet (Abb. 21A und B). Die biologischen Replikate clusterten eng beieinander, sodass davon auszugehen ist, dass die Genexpressionsprofile der Zellen in den jeweiligen Wiederholungsversuchen konsistent waren.

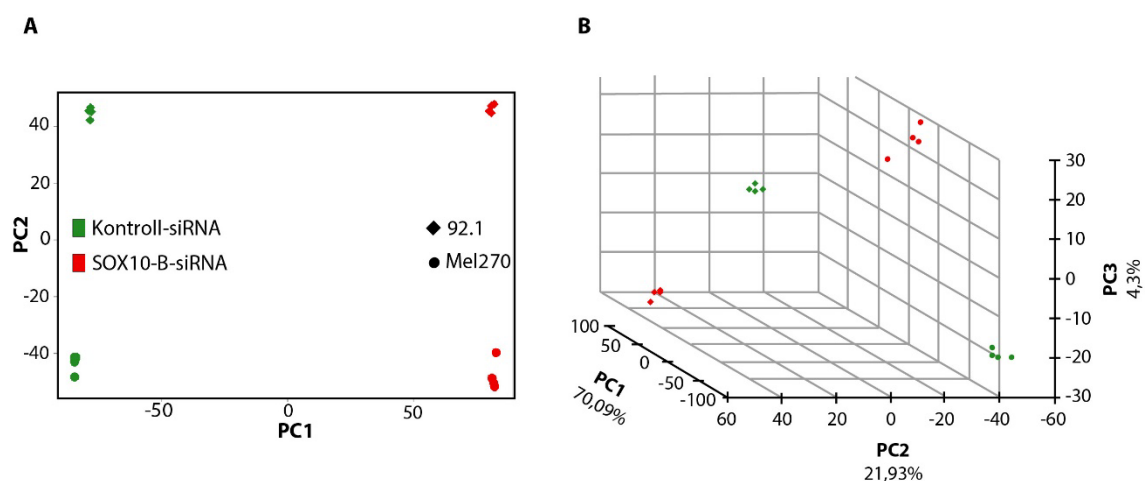


Abb. 21: Principal component-Analyse (PCA)

(A) Zweidimensionale und (B) dreidimensionale Darstellung der PCA der RNA-Sequenzierungsdaten der Zelllinien 92.1 (Rautensymbol) und Mel270 (Kreissymbol), die für 24h mit SOX10-B- (rot) oder einer Kontroll-siRNA (grün) transfiziert worden waren. N = 4. PC: *principal component*.

Insgesamt wurden 37.451 Gene mit einer mittleren Read-Anzahl > 0 gefunden. In der differentiellen Genexpressionsanalyse der 17.448 Gene mit einer mittleren Anzahl an

sequenzierten Reads > 10 wurden insgesamt 5.914 herabregulierte und 6.537 hochregulierte Gene bei einer FWER von 0,05 identifiziert (Abb. 22A). Bei 4.997 Genen führte die SOX10-Hemmung zu keiner signifikanten Veränderung der Genexpression. Bei 1.949 Genen kam es nach SOX10-Hemmung mindestens zu einer Verdoppelung oder einer Halbierung der Genexpression ($|\log_2 \text{fold change}| > 1$). Um nun potenzielle Zielgene von SOX10 zu identifizieren, wurden publizierte Daten von SOX10-ChIP-Seq-Experimenten mit murinen Melanozyten [346] mit der Liste der 1.949 am stärksten in den UM-Zelllinien veränderten Genen nach SOX10-Hemmung verglichen. Konkret wurde analysiert, welche der Gene SOX10-ChIP-Signale im Bereich -10.000 Basenpaare (bp) bis + 5.000 bp relativ zum jeweiligen TSS aufwiesen. Die so identifizierten 395 potenziellen SOX10-Zielgene wurden mittels *Gene Ontology* (GO)-Term-Analysen (Abb. 22B) sowie Netzwerkanalysen (Abb. 22C) untersucht. Die drei am meisten veränderten Signalwege wurden den GO-Terms „axonogenesis“, „peptidyl-tyrosine phosphorylation“ bzw. „peptidyl-tyrosine modification“ und „renal development system“ zugeordnet. Bei 27 Genen wurde ein Bezug zu GO-Terms festgestellt, die mit Apoptose in Zusammenhang stehen, darunter waren etwa Gene wie *BCL2*. Insgesamt ist festzustellen, dass die Hemmung von SOX10 zu äußerst weitreichenden Veränderungen der Genexpression in den Zellen führte und eine Vielzahl an Signalwegen infolge dessen mutmaßlich beeinflusst werden, darunter zahlreiche mit Bezug zur Embryonalentwicklung und Apoptoseinduktion.

Abb. 22: GO-Term-Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten nach SOX10-Hemmung

(A) Schematische Darstellung des Vorgehens zur Identifizierung potenzieller SOX10-Zielgene oder seiner Mediatoren im UM. Die SOX10-Hemmung führte zu einer signifikanter Herabregulation von 5.914 Genen und einer Hochregulation von 6.537 Genen. Nach Ausschluss der Gene mit einer geringen Expressionsveränderung ($|\log_2 \text{fold change}| < 1$) wurden die verbliebenen 1.949 differenziell exprimierten Gene mit veröffentlichten, von murinen Melanozyten stammenden SOX10-ChIP-Seq-Signalen [346] aus dem Bereich von -10.000 bp bis +5.000 bp um die jeweiligen Transkriptionsstartstellen (TSS) der Gene abgeglichen. Dadurch wurden 395 differenziell exprimierte Gene identifiziert, die möglicherweise direkt durch SOX10 im UM reguliert werden. (B) Untersuchung der 395 potenziellen SOX10-Zielgene mittels GO Term-Analysen und (C) Netzwerkanalysen. Die drei am meisten veränderten Signalwege wurden den GO-Terms „axonogenesis“, „peptidyl-tyrosine phosphorylation“ bzw. „modification“ und „renal development system“ zugeordnet. FWER: family-wise error rate.

Abb. 22 siehe Folgeseite

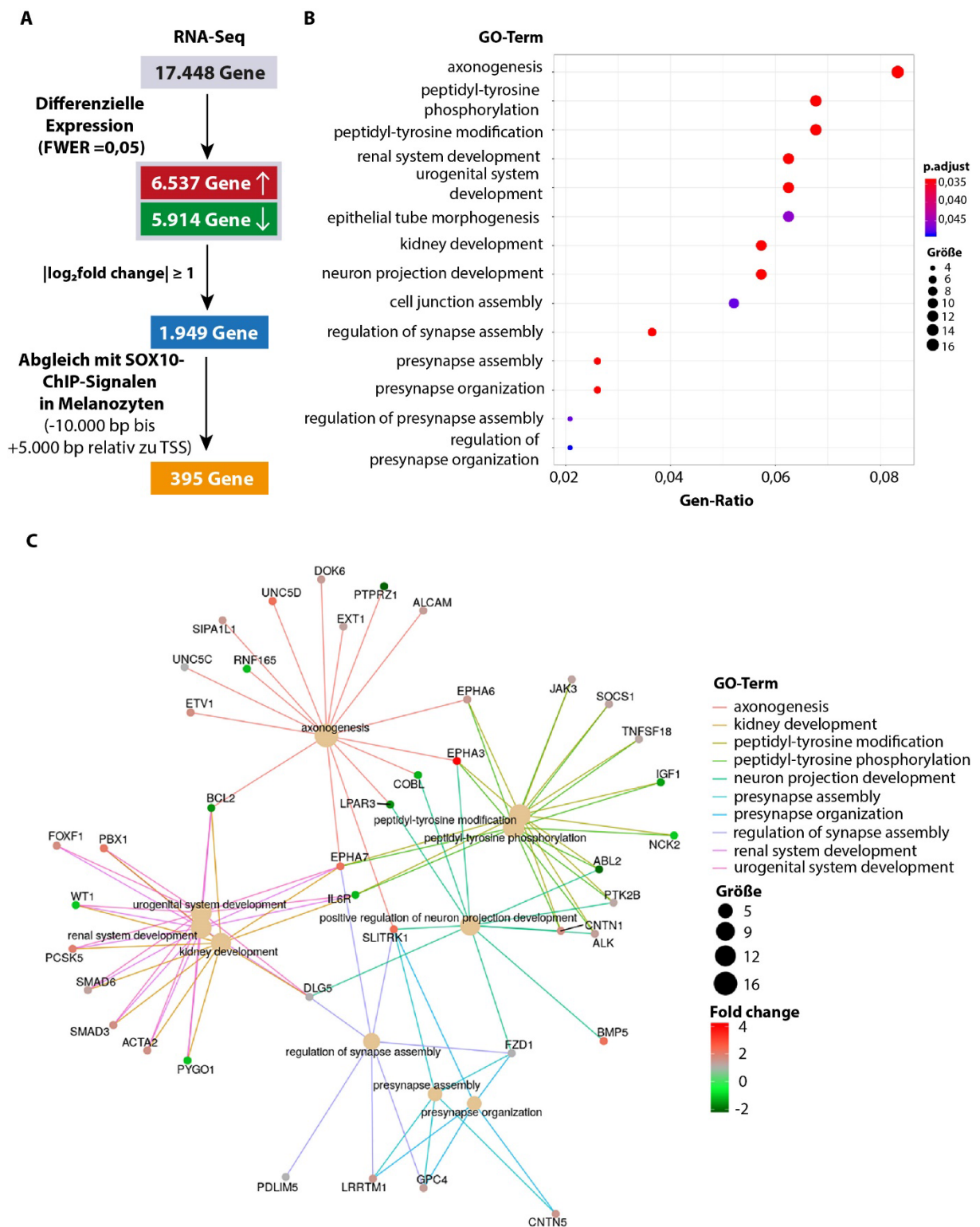


Abb. 22, Beschreibung siehe S. 130

3.3 SOX10-Zielgene als potenzielle Mediatoren der Effekte

3.3.1 Veränderung der Genexpression von SOX9 und bekannten SOX10-Zielgenen nach SOX10-Hemmung

SOX10 ist als Transkriptionsfaktor vor allem für die transkriptionelle Regulation von Genen verantwortlich. Ein Teil der Effekte, die nach der Hemmung von SOX10 zu beobachten sind, ist aus diesem Grund sehr wahrscheinlich auf eine veränderte Expression seiner direkten Zielgene zurückzuführen. Zusätzlich zur oben beschriebenen Analyse der Transkriptomdaten wurde die Genexpression einiger ausgewählter bereits bekannter SOX10-Zielgene 24h nach Transfektion mit SOX10-spezifischen siRNAs mittels qPCR in den UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 sowie der KM-Zelllinie 1205Lu analysiert (Abb. 23).

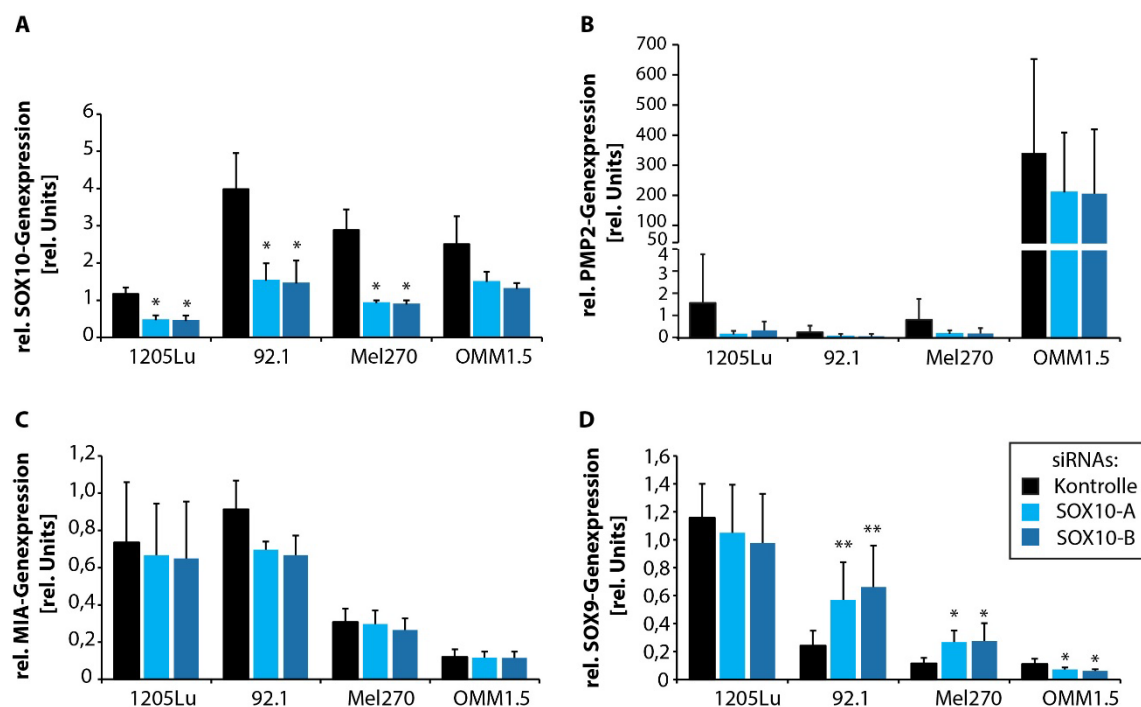


Abb. 23: Analyse der Genexpression von SOX10 sowie der durch SOX10 transkriptionell regulierten Gene *PMP2*, *MIA* und *SOX9* nach SOX10-Hemmung

Analysiert wurde die Genexpression von (A) *SOX10*, (B) *PMP2*, (C) *MIA* und (D) *SOX9* nach Transfektion mit SOX10-A-, SOX10-B- oder einer Kontroll-siRNA für 24h. Normalisierung auf *GAPDH*-Genexpression, Mittelwerte \pm SD, n = 3. *: p < 0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,001 vs. Kontroll-siRNA.

PMP2 ist ein cholesterol- und fettsäurebindendes Protein in den peripheren Gliazellen und eines der Hauptproteine im Myelin des PNS [425]. *PMP2* wird auch im KM exprimiert, wo es die Migration und Invasion von Melanomzellen fördert und direkt durch SOX10 transkriptionell reguliert wird [297]. Die *PMP2*-Genexpression war in der Zelllinie OMM1.5 mit Abstand am höchsten und in diesen Zellen kam es nach SOX10-Hemmung auch zu einer Verringerung der *PMP2*-Expression, die jedoch nicht signifikant war (Abb.

23B). Eine ebenfalls verringerte PMP2-Expression wurde in den Zelllinien 1205Lu und Mel270 nach SOX10-Hemmung beobachtet. Am geringsten wurde PMP2 in der Zelllinie 92.1 exprimiert. Hier führte die Transfektion mit SOX10-siRNAs auch zu keiner weiteren Reduktion der ohnehin geringen *PMP2*-Genexpression.

Das Protein MIA wird während der Embryonalentwicklung und postnatal im Knorpel sowie in Chondrosarkomen, dem KM und Adenomen exprimiert, jedoch nicht in Melanozyten [426]. MIA wird sezerniert, beeinflusst die Pigmentierung und Morphologie der Melanomzellen und fördert die Invasion und Metastasierung im KM [426-428]. Dort wird MIA durch SOX10 direkt transkriptionell reguliert und die Expression durch Hemmung von SOX10 inhibiert [295]. In allen vier untersuchten UM-Zelllinien kam es zum Analysezeitpunkt 24h nach der Transfektion mit SOX10-siRNAs zu keiner signifikanten Veränderung der *MIA*-Genexpression (Abb. 23C). Die MIA-Expression der Kontrollzellen war am höchsten in der UM-Zelllinie 92.1 und der KM-Zelllinie 1205Lu und am geringsten in den UM-Zelllinien Mel270 und OMM1.5.

Der Transkriptionsfaktor SOX9 gehört wie SOX10 zur SoxE-Subfamilie der SOX-Transkriptionsfaktorfamilie und besitzt eine große Homologie zu SOX10 und SOX8 [429]. Frühere Arbeiten konnten zeigen, dass die Hemmung von SOX10 im KM zu einem Anstieg der SOX9-Expression führt und umgekehrt, zudem bindet SOX9 an den *SOX10*-Promotor [296]. In den UM-Zelllinien 92.1 und Mel270 konnte eine geringfügige Steigerung der SOX9-Genexpression nach SOX10-Hemmung festgestellt werden, in der Zelllinie OMM1.5 dagegen eine Abnahme, diese Zelllinie exprimiert jedoch nur wenig SOX9 (Abb. 23D). Auffällig war außerdem die inverse Korrelation zwischen der *SOX10*- und *SOX9*-Genexpression der Kontrollzellen sowohl bei der KM-Zelllinie 1205Lu als auch bei den drei untersuchten UM-Zelllinien.

3.3.2 Das SOX10-Zielgen MITF als potenzieller Mediator der Effekte

3.3.2.1 MITF-Expression basal und nach Hemmung von SOX10

Das Gen *MITF* codiert für den Transkriptionsfaktor *Microphthalmia-associated transcription factor* und ist das am besten untersuchte Zielgen von SOX10. MITF gehört zur Familie der basic-Helix-Loop-Helix-Leucin-Zipper-Transkriptionsfaktoren und gilt als „Master-Regulator“ der Melanogenese, da es die Expression zahlreicher an der Melaninsynthese beteiligten Enzyme wie TYR oder DCT transkriptionell steuert [202, 208, 430, 431]. Das kodierende Gen umfasst etwa 230.000 bp und ist auf Chr. 3 lokalisiert, zudem existieren mehrere TSS, sodass zahlreiche Isoformen durch alternatives Splicing generiert werden können [432, 433]. Die unterschiedlichen Isoformen unterscheiden sich im Bereich des ersten Exons durch die Verwendung unterschiedlicher Promotoren, während die Exons 2 bis 9 in allen Isoformen gleich bleiben [432, 433]. In melanozytären Zellen wird die M-Isoform exprimiert, deren Expression von den Transkriptionsfaktoren SOX10 und PAX3 durch Bindung an den Promotorbereich der M-Isoform induziert werden kann [261, 262, 434-436]. Im Auge wird in der Iris die M-Isoform, in der Choroidea neben der M- auch die A- und J-Isoform und im RPE zusätzlich

die D- und H-Isoform exprimiert [437]. MITF ist nicht nur an der Melanogenese in normalen Melanozyten beteiligt, sondern wird auch im KM exprimiert, wo es ein entscheidender Faktor für die Heterogenität und die Plastizität des KM ist [433, 438]. MITF ist etwa zentral am Wechsel der Zellen von einem proliferativen, MITF-hochexprimierenden hin zu einem invasiven, kaum proliferativen Phänotyp mit niedriger MITF-Expression und wieder zurück beteiligt [233, 438]. Zudem sind Amplifikationen des *MITF*-Gens bei etwa 20 % der KM nachweisbar [439]. Über die Funktion im UM ist nur wenig bekannt, allerdings wird MITF bei etwa 65 % der UM exprimiert [440]. Es können sowohl Zellen mit hoher als auch niedriger MITF-Expression nebeneinander im Tumorgewebe vorliegen, sodass davon ausgegangen wird, dass MITF ähnlich wie im KM zur Tumorerogenität im UM beiträgt [437].

Da SOX10 die Expression des Transkriptionsfaktors MITF direkt transkriptionell regulieren kann [261, 262], wurde eine Analyse der MITF-Gen- und Proteinexpression in HM, der KM-Zelllinie 1205Lu sowie den UM-Zelllinien 92.1, Mel270, OMM2.3, OMM 1.5 (= OMM2.5), Mel285, Mel202, Mel290 und OMM-1 durchgeführt. Hierbei wurde eine starke Expression in den sechs untersuchten UM-Zelllinien 92.1, Mel270, OMM1.5 (bzw. OMM2.5), OMM2.3, OMM-1 und Mel202 nachgewiesen (Abb. 24A und B). Im Gegensatz dazu wurde *MITF* in der Zelllinie Mel290 gering exprimiert. In den Zelllinien Mel285 und 1205Lu wurde *MITF* auf Genebene sehr gering exprimiert, während eine Expression auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden konnte. Eine statistisch signifikante positive Korrelation zwischen der SOX10- und der MITF-Proteinexpression in UM-Zellen und HM konnte nachgewiesen werden (Pearson-Korrelationskoeffizient 0,792, $p = 0,004$, Abb. 24C).

Abb. 24: Basale Proteinexpression von MITF

(A) Relative Genexpression von *MITF*, normalisiert auf *GAPDH*-Expression, Mittelwerte \pm SD, $n = 3$ und (B) Proteinexpression von MITF, SOX10 und β -Aktin in HM (zwei Spender), UM-Zelllinien 92.1, Mel270, OMM1.5 und Mel285 bzw. Mel202, Mel290, OMM-1, OMM2.3 und OMM2.5 sowie der KM-Zelllinie 1205Lu. (C) Grafische Darstellung der Korrelation zwischen der relativen SOX10- und MITF-Proteinexpression bestimmt durch densitometrische Analysen mithilfe des Programms ImageJ, jeweils normalisiert auf die β -Aktin-Expression, Expression von OMM1.5/OMM2.5 = 1. Pearson-Korrelationskoeffizient $r = 0,792$, $p = 0,004$.

Abb. 24 siehe Folgeseite

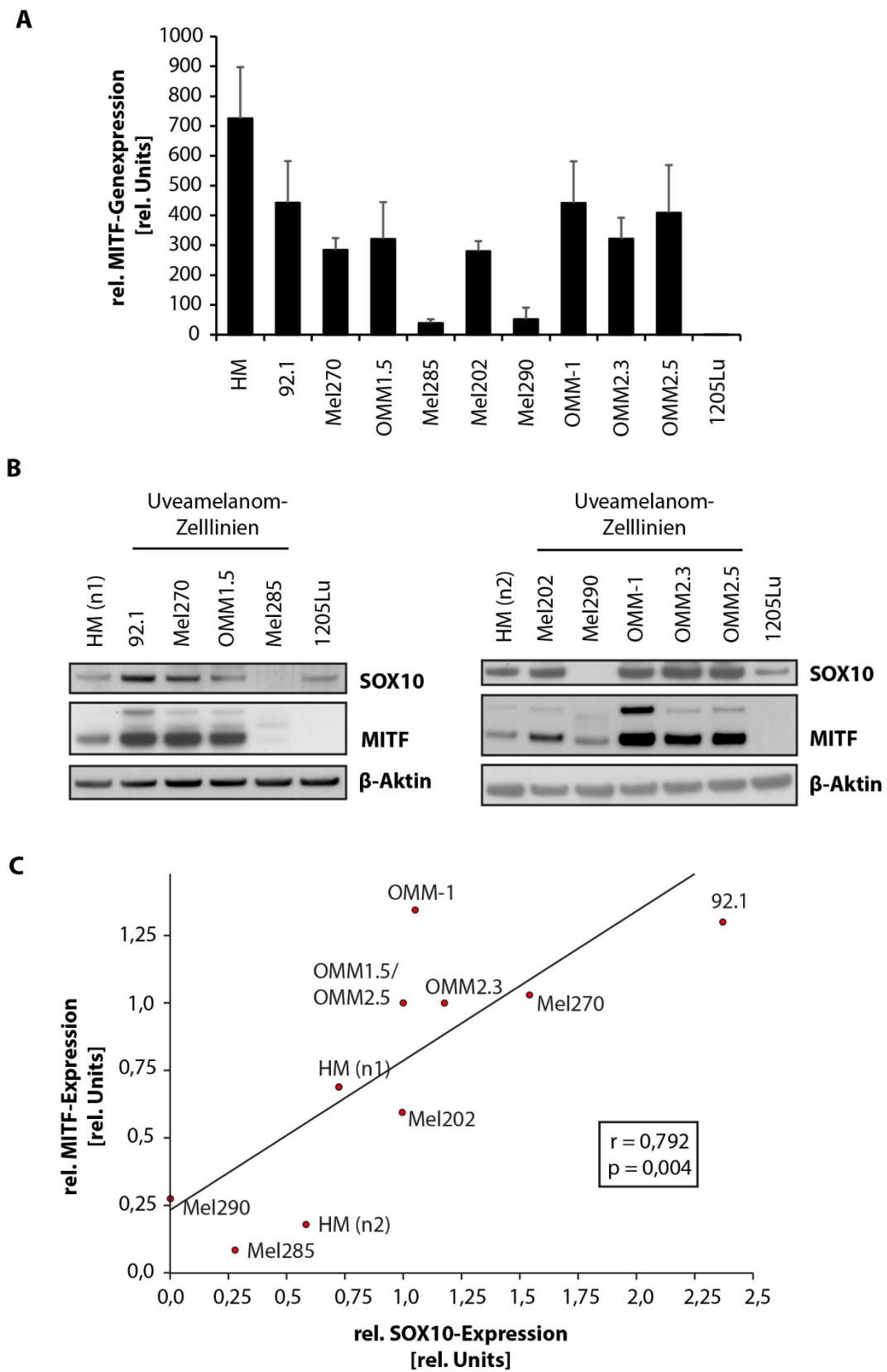


Abb. 24, Beschreibung siehe S. 134

Um zu untersuchen, ob eine Hemmung von SOX10 auch direkte Auswirkungen auf die Expression von MITF hat, wurden die SOX10-hochexprimierenden UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 mit SOX10-spezifischen siRNAs, einer Kontroll-siRNA oder nur mit dem Transfektionsreagenz transfiziert und die MITF-Expression analysiert. Bereits 24h nach der Transfektion kam es zu einer deutlichen Verminderung der MITF-Gen- und Proteinexpression in den drei untersuchten UM-Zelllinien (Abb. 25).

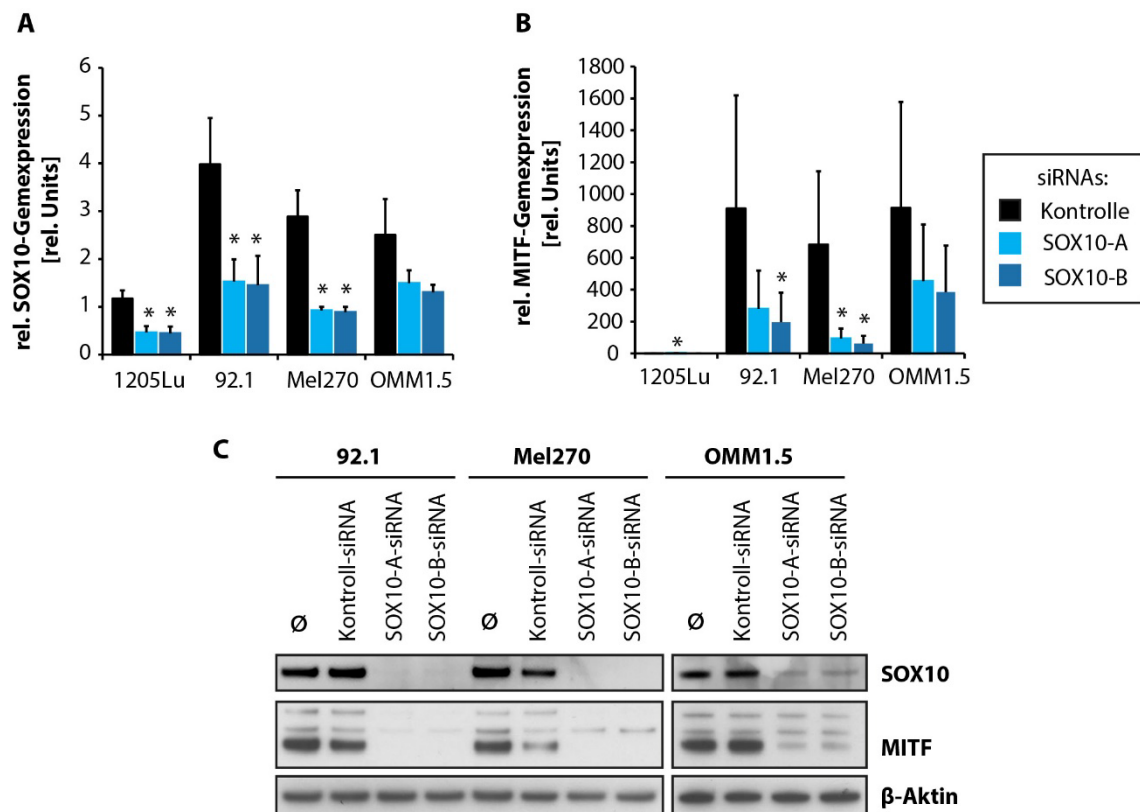


Abb. 25: Veränderung der MITF-Expression nach SOX10-Hemmung

(A) Genexpression von *SOX10* in der KM-Zelllinie 1205Lu sowie den UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 24h nach Transfektion mit SOX10-spezifischen siRNAs (SOX10-A, SOX10-B) oder Kontroll-siRNA, normalisiert auf GAPDH-Genexpression, Mittelwerte \pm SD, $n = 3$, *: $p < 0,05$ vs. Kontroll-siRNA. (B) Genexpression von *MITF* in der KM-Zelllinie 1205Lu sowie den UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 24h nach Transfektion mit SOX10-spezifischen siRNAs (SOX10-A, SOX10-B) oder Kontroll-siRNA, normalisiert auf GAPDH-Genexpression, Mittelwerte \pm SD, $n = 3$. *: $p < 0,05$ vs. Kontroll-siRNA. (C) MITF- und SOX10-Proteinexpression 24h nach Transfektion mit SOX10-spezifischen siRNAs (SOX10-A, SOX10-B), Kontroll-siRNA oder Behandlung nur mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine® RNAiMAX (Ø). Ladekontrolle: β -Aktin.

3.3.2.2 Verringerung der Zellviabilität nach MITF-Hemmung

Die beobachteten Veränderungen der MITF-Expression nach SOX10-Hemmung legen nahe, dass MITF durch SOX10 auch im UM reguliert und daher möglicherweise bei der Vermittlung der Effekte nach SOX10-Hemmung beteiligt ist. Zudem wäre denkbar, dass die Hemmung von MITF auf UM-Zellen einen ähnlichen Effekt wie die Inhibition von SOX10 haben könnte, da MITF die Expression pro- und antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 und zellzyklusregulatorischer Proteine wie Cyclin D1 und CDK2 beeinflussen kann [437, 441, 442]. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden die UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 in weiteren Experimenten mit MITF-spezifischer oder einer Kontroll-siRNA transfiziert und die Zellviabilität nach 24h, 48h, 72h und 96h bestimmt. Analog zu den Ergebnissen nach SOX10-Hemmung kam es auch nach Transfektion mit der MITF-spezifischen siRNA zu einer deutlichen Abnahme der Zellviabilität der untersuchten UM-Zelllinien (Abb. 26). Am deutlichsten war dieser Effekt bei den Zelllinien 92.1 und Mel270 zu beobachten, bei denen nach 96h kaum mehr lebende Zellen vorhanden waren (4,1 bzw. 5,6 % lebende Zellen). Die Zellviabilität von OMM1.5 nach Transfektion mit MITF-siRNA blieb für 48h nahezu konstant und nahm erst dann signifikant ab. Nach 96h waren hier jedoch immer noch 29,5 % lebende Zellen vorhanden. In der Zelllinie 1205Lu war hingegen kaum eine Abnahme der Zellviabilität im Vergleich zu den mit der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen nachweisbar.

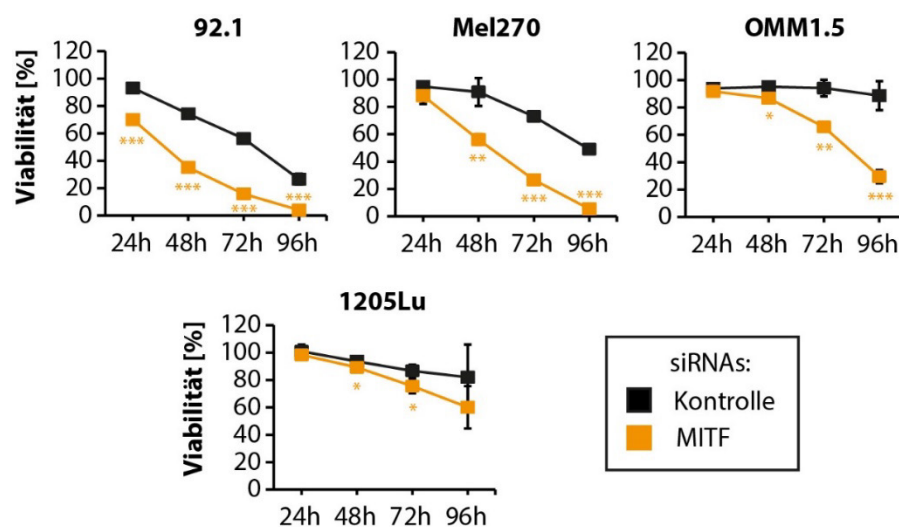


Abb. 26: Verringerung der Zellviabilität nach MITF-Hemmung

Die KM-Zelllinie 1205Lu sowie die drei SOX10-exprimierenden UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 wurden mit einer MITF- oder Kontroll-siRNA transfiziert und die Zellviabilität nach 24h, 48h, 72h und 96h mithilfe des CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega) bestimmt. 100%: Zellen nur mit Transfektionreagenz Lipofectamine® RNAiMAX behandelt. Mittelwerte \pm SD, n = 3. *: p < 0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,001 vs. Kontroll-siRNA.

3.3.2.3 Induktion eines Zellzyklusarrests in G1 durch MITF-Hemmung

Die Ergebnisse der Zellviabilitätsanalysen lassen darauf schließen, dass nicht nur SOX10, sondern auch der Transkriptionsfaktor MITF essenziell für das Überleben von UM-Zellen ist. Um den Einfluss der MITF-Expression auf den Zellzyklusprogress zu untersuchen, wurden die Zellen mit einer MITF-siRNA, Kontroll-siRNA oder nur dem Transfektionsreagenz Lipofectamine® RNAiMAX für 48h transfiziert und dann eine Zellzyklusanalyse mittels Propidiumjodid-Färbung und Durchflusszytometrie durchgeführt. Hier zeigte sich bei der Zelllinie 92.1 nach MITF-Hemmung ein deutlicher Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Abb. 27). Ein höherer Anteil an Zellen in der G1-Phase wurde ebenfalls bei den Zelllinien Mel270 und 1205Lu beobachtet. Im Gegensatz dazu änderte sich die Verteilung der Zellzyklusphasen in den OMM1.5-Zellen nach MITF-Inhibition nicht.

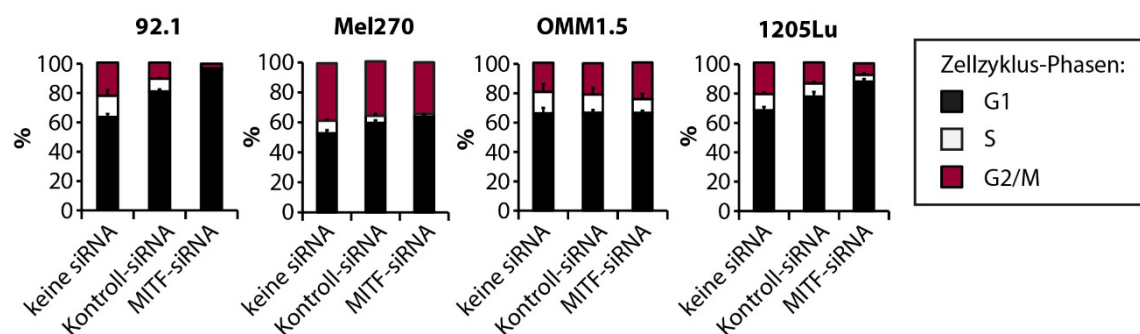


Abb. 27: Zellzyklusarrest in der G1-Phase des Zellzyklus nach Hemmung von MITF

Anteil der in den Zellzyklusphasen G1, S und G2/M befindlichen Zellen nach Transfektion mit MITF- oder einer Kontroll-siRNA bzw. nach Behandlung nur mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine® RNAiMAX für 48h, Mittelwerte \pm SD, $n = 3$. Keine siRNA: Zellen nur mit Transfektionsreagenz behandelt. Analyse durch Propidiumjodid-Färbung und anschließende durchflusszytometrische Messung.

Dass eine Hemmung von MITF zu einem Arrest in der G1-Phase des Zellzyklus führt, konnte durch Western-Blot-Analysen bestätigt werden. Nach MITF-Hemmung kam es zu einer Hypophosphorylierung des Rb-Proteins sowie zu einer Verringerung der Cyclin D1-Expression in den Zelllinien 92.1 und Mel270 (Abb. 28). Darüber hinaus konnte eine Induktion der p21-Expression sowie eine Verringerung der p27-Expression festgestellt werden, wohingegen sich die Expression des Tumorsuppressorproteins p53 nicht veränderte. Die Expression der untersuchten zellzyklusregulierenden Proteine veränderte sich 24h nach der Transfektion in der Zelllinie OMM1.5 nicht. Dieses Ergebnis stimmt mit den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analysen überein, da bei dieser Zelllinie auch 48h nach der Transfektion noch keine Anzeichen eines Zellzyklusarrests zu beobachten war.

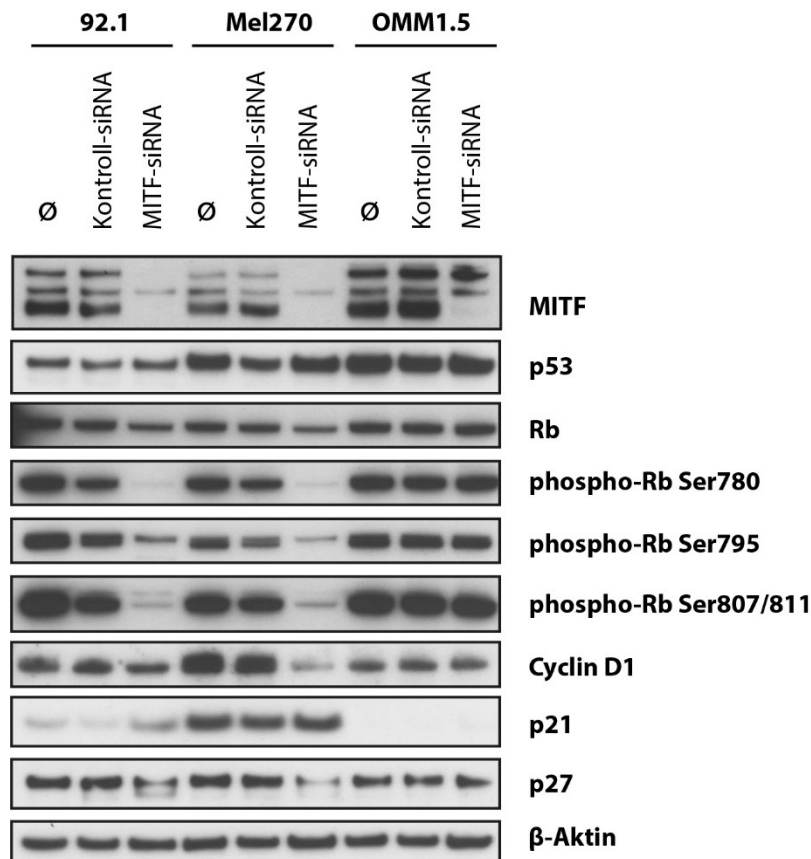


Abb. 28: Expressionsanalyse von zellzyklusregulierenden Proteinen bestätigt Zellzyklusarrest in der G1-Phase nach MITF-Hemmung

Proteinexpression von MITF, Retinoblastom-Protein (Rb), phosphoryliertem Rb (phospho-Rb; Phosphorylierung an Ser780, Ser795 bzw. Ser807 und Ser811), Cyclin D1, p21, p27 und p53 24h nach Transfektion mit MITF- oder einer Kontroll-siRNA. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Ø: Zellen nur mit Transfektionsreagenz Lipofectamine® RNAiMAX behandelt.

3.3.2.4 Zelltodinduktion nach MITF-Hemmung über den intrinsischen Apoptoseweg

Die starke Abnahme der Zellviabilität in den Zelllinien 92.1 und Mel270 nach MITF-Inhibition deutete auf eine Zelltodinduktion hin. Um zu untersuchen, ob der Zelltod durch Apoptose oder Nekrose verursacht wurde, wurden die UM-Zelllinien 92.1, Mel270, OMM1.5 sowie die KM-Zelllinie 1205Lu mit MITF-siRNA, einer Kontroll-siRNA oder dem Transfektionsreagenz alleine für 48h transfiziert, dann eine Annexin V-Propidiumjodid-Färbung durchgeführt und die Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert. In den beiden Zelllinien 92.1 und Mel270 kam es - wie schon durch die Ergebnisse der Zellviabilitätsversuche zu erwarten war - zu einer deutlichen Zunahme an Annexin V-positiven Zellen nach MITF-Hemmung, wohingegen die Zelllinien OMM1.5 und 1205Lu kaum Veränderungen zeigten (Abb. 29). Dies spricht für eine gezielte Zelltodinduktion durch Apoptose nach MITF-Inhibition in zwei der drei untersuchten UM-Zelllinien.

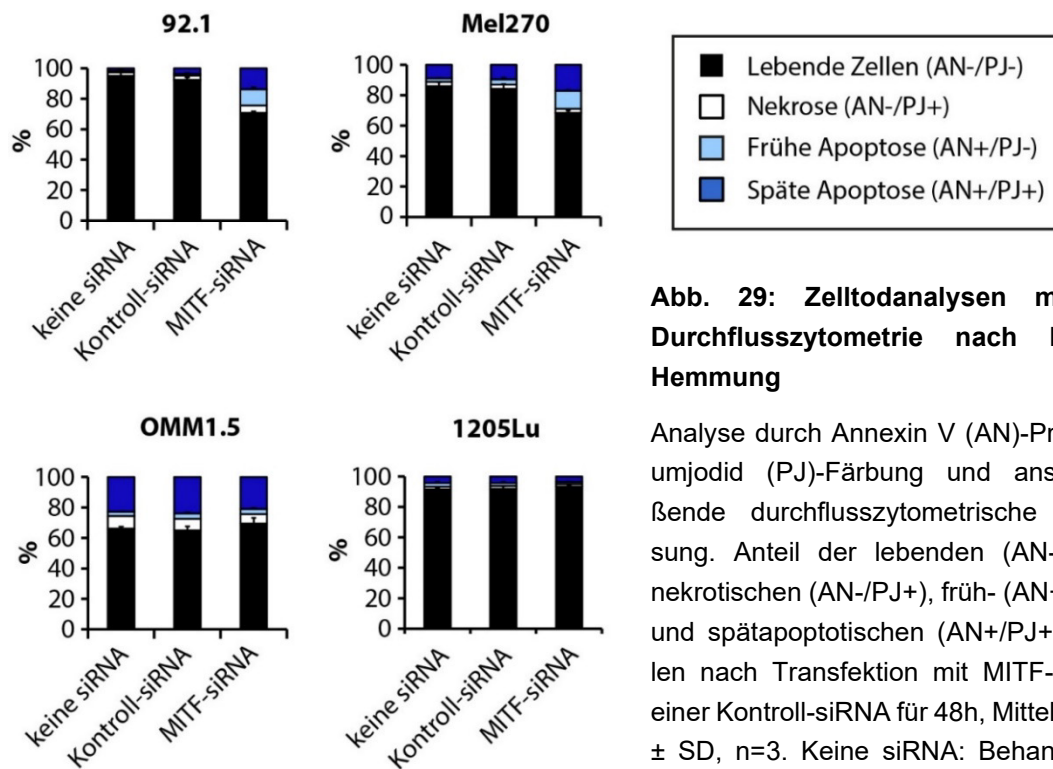


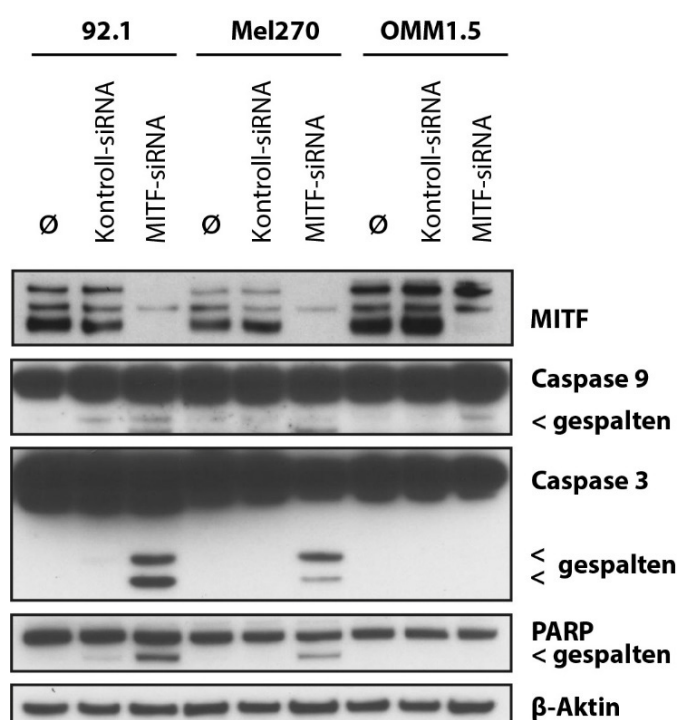
Abb. 29: Zelltodanalysen mittels Durchflusszytometrie nach MITF-Hemmung

Analyse durch Annexin V (AN)-Propidiumjodid (PJ)-Färbung und anschließende durchflusszytometrische Messung. Anteil der lebenden (AN-/PJ-), nekrotischen (AN-/PJ+), früh- (AN+/PJ-) und spätapoptotischen (AN+/PJ+) Zellen nach Transfektion mit MITF- oder einer Kontroll-siRNA für 48h, Mittelwerte \pm SD, n=3. Keine siRNA: Behandlung nur mit Transfektionsreagenz (Lipofectamine® RNAiMAX).

In Western Blot-Analysen konnte nach MITF-Hemmung eine Spaltung und damit Aktivierung der Procaspasen 3 und 9 sowie von PARP, welches durch die aktivierte Caspase 3 gespalten wird, in den Zelllinien 92.1 und Mel270 nachgewiesen werden (Abb. 30). Dies deutet darauf hin, dass es in diesen beiden Zelllinien durch die Hemmung von MITF tatsächlich zur Apoptoseinduktion kommt.

Abb. 30: MITF-Hemmung führt zur Spaltung der Procaspasen 9 und 3 und des Zielproteins PARP

Proteinexpression von MITF, Procaspase 9, Procaspase 3 und PARP 24h nach Transfektion mit MITF- oder einer Kontroll-siRNA. β -Aktin diene als Ladekontrolle. \emptyset : Zellen nur mit Transfektionsreagenz behandelt.



Die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 war nach MITF-Hemmung in den Zelllinien 92.1 und Mel270 leicht verringert (Abb. 31). In der Zelllinie Mel270 kam es außerdem zu einer Verringerung der Bcl-w-Expression; demgegenüber war kein Bcl-w in der Zelllinie 92.1 nachweisbar. Die Proteinexpression der Proteine Bak und Bax veränderte sich in beiden Zelllinien nicht.

In OMM1.5, in der es nach MITF-Hemmung kaum zur Zelltodinduktion kam, wurden wie erwartet keine Veränderungen der Proteinexpression der vier untersuchten Proteine detektiert. Ebenfalls untersucht wurde die Expression des DNA-Schadensmarkers γ -H2A.X, welcher in allen drei untersuchten Zelllinien in Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen geringfügig stärker exprimiert war.

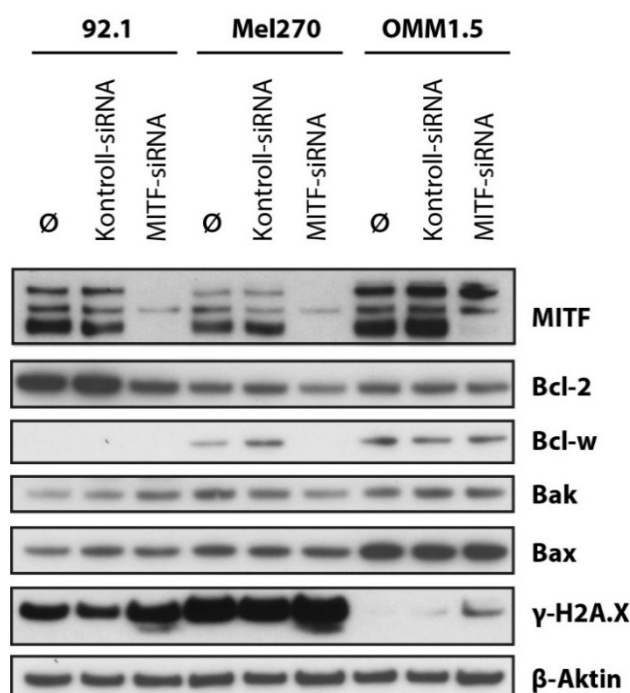


Abb. 31: Analyse der Expression pro- und antiapoptotischer Proteine sowie des DNA-Schadensmarkers γ -H2A.X nach MITF-Hemmung

Proteinexpression von MITF, Bcl-2, Bcl-w, Bak, Bax und γ -H2A.X 24h nach Transfektion mit MITF- oder einer Kontroll-siRNA. β -Aktin diente als Ladekontrolle. Ø: Zellen nur mit Transfektionsreagenz behandelt.

Die Daten deuten insgesamt darauf hin, dass die Hemmung von MITF in den Zelllinien 92.1 und Mel270 zur Apoptoseinduktion über den intrinsischen Apoptoseweg führt. Somit scheinen die Hemmung von MITF und SOX10 einen ähnlichen zytotoxischen Effekt auf UM-Zellen auszuüben.

3.3.2.5 Ektipe Expression von MITF verhindert Zelltod nach SOX10-Hemmung

Die oben beschriebenen Experimente zeigen, dass die Hemmung von MITF zu ähnlichen Effekten wie die Hemmung von SOX10 führt. Zusammen mit der Tatsache, dass MITF ein direktes Zielgen von SOX10 ist, sprechen die Daten dafür, dass SOX10 seine überlebensfördernden Effekte zum Teil über MITF ausübt. Sollte dies tatsächlich der Fall sein, könnte eine SOX10-unabhängige Expression von MITF die Zellen bei einer SOX10-Hemmung möglicherweise vor dem Zelltod retten. Für ein solches „Rescue“-Experiment wurden Mel270-Zellen zuerst mit einem MITF-Expressionsplasmid (pCMV6-MITF-Myc-DDK), welches durch den enthaltenen CMV-Promotor unabhängig von der SOX10-Expression zur Expression der melanozytären Isoform von MITF (M-MITF) mit

einem Myc-DDK-Tag führt, oder mit dem entsprechenden Kontrollvektor (pCMV6-Entry) transfiziert. Nach 16h wurden die Zellen dann mit SOX10-B-siRNA oder einer Kontroll-siRNA transfiziert. Anschließend wurde die Zellviabilität mittels CellTiter-Blue® Assay sowie die Apoptoseinduktion im Western Blot jeweils 24h und 48h nach der siRNA-Transfektion analysiert (Abb. 32A). Zellen, die vor der SOX10-Hemmung mit dem Expressionsplasmid pCMV6-MITF-Myc-DDK transfiziert worden waren, zeigten nach 48h eine höhere Zellviabilität als diejenigen, die mit dem Kontrollvektor pCMV6-Entry transfiziert worden waren (Abb. 32B und C).

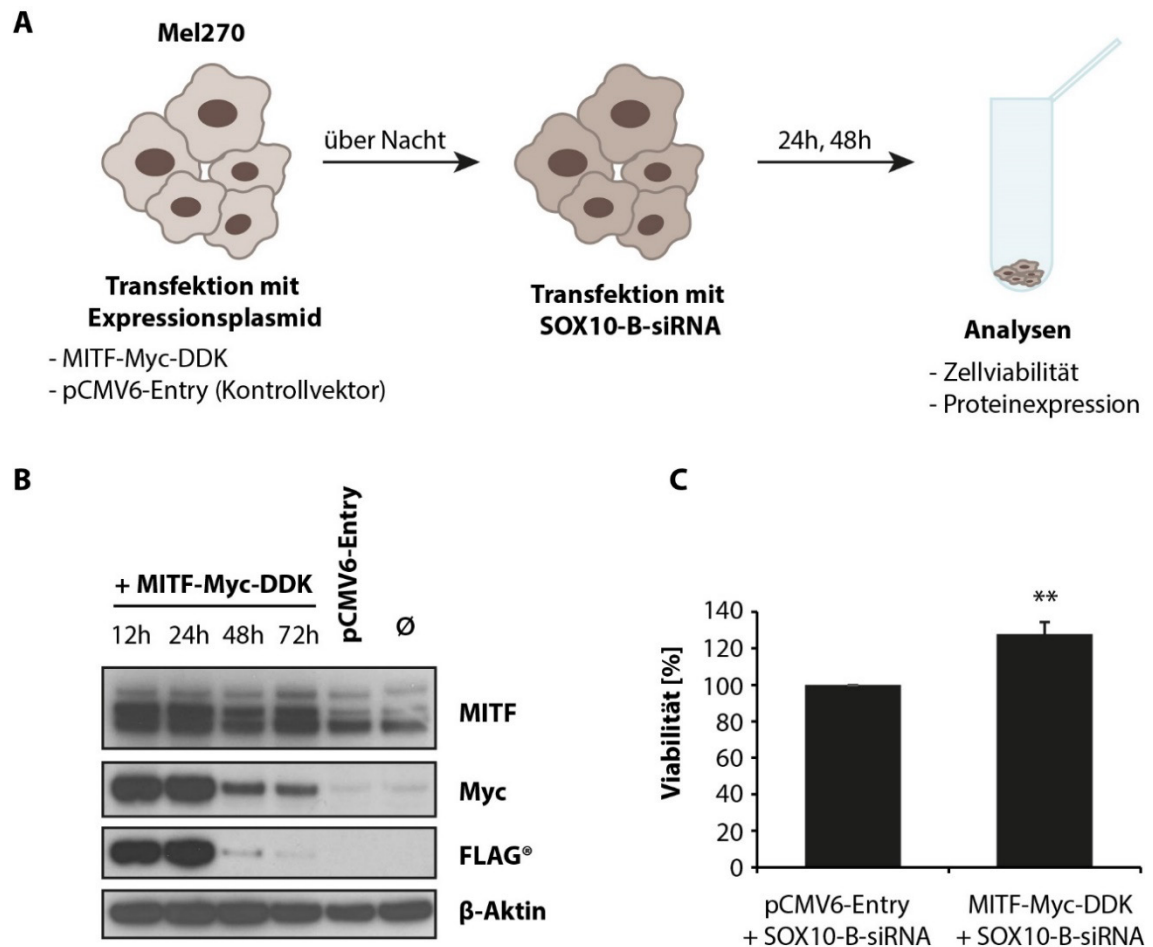


Abb. 32: Analyse der Zellviabilität nach ektopter Expression von MITF und zeitgleicher SOX10-Hemmung

(A) Schematische Darstellung des Versuchsprotokolls. Die UM-Zelllinie Mel270 wurde zuerst mit dem Kontroll-Plasmid pCMV6-Entry oder dem Expressionsplasmid pCMV6-MITF-Myc-DDK transfiziert, um eine ektope Expression von MITF zu induzieren. Nach 16h Inkubation wurde das Medium gewechselt und die Zellen mit SOX10-B-siRNA transfiziert, um eine Hemmung der SOX10-Expression zu erzielen. Nach weiteren 24h und 48h wurde die Zellviabilität bestimmt und die Zellen für Proteinexpressionsanalysen geerntet. (B) Nachweis der ektopten MITF-Expression 12h, 24h, 48h und 72h nach der Transfektion mit dem Plasmid pCMV6-MITF-Myc-DDK in Mel270-Zellen. Aufgrund des verwendeten Expressionsvektors verfügt das ektopt exprimierte MITF über einen Myc-DDK-Tag und kann daher nicht nur durch MITF-spezifische Antikörper, sondern auch durch anti-Myc- und anti-FLAG®-Antikörper im Western Blot detektiert werden. Ladekontrolle: β-Aktin. pCMV6-Entry: Kontrollvektor, Ø: unbehandelte Zellen. (C) Bestimmung

der Zellviabilität von Mel270 nach Transfektion mit dem Kontrollvektor pCMV6-Entry oder dem MITF-Expressionsplasmid pCMV6-MITF-Myc-DDK und zeitgleicher Hemmung der SOX10-Expression mithilfe des CellTiter-Blue® Assay (Promega), Analyse 48h nach Transfektion mit SOX10-B-siRNA, Mittelwerte \pm SD, n = 3. **: p < 0,01 vs. pCMV6-Entry + SOX10-B-siRNA.

Die Analyse der Effektorcaspase-Aktivität ergab, dass in den Zellen mit ektopter MITF-Expression nach SOX10-Inhibition weniger Spaltung der Procaspasen 3 und 9 sowie von PARP zu beobachten war als in den Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert worden waren (Abb. 33). Am ausgeprägtesten war dieser Effekt 48h nach der siRNA-Transfektion. Somit scheint eine ektope Expression von MITF den Zelltod und die Caspase-aktivierung nach SOX10-Hemmung zumindest teilweise verhindern zu können.

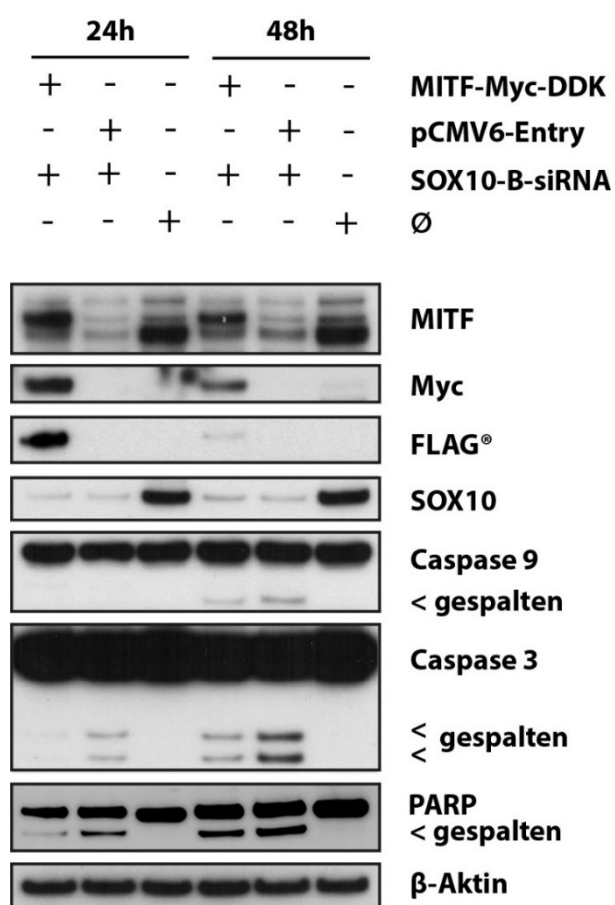


Abb. 33: Analyse der Caspase-Aktivität nach ektopter Expression von MITF und zeitgleicher SOX10-Hemmung

Proteinexpression von MITF, Myc, FLAG®, SOX10, Procaspase 3, Procaspase 9 und PARP. Mel270-Zellen wurden mit dem Kontrollvektor pCMV6-Entry oder dem MITF-Expressionsplasmid pCMV6-MITF-Myc-DDK transfiziert; nach 16h Inkubation erfolgte dann eine weitere Transfektion mit SOX10-B-siRNA oder einer Kontroll-siRNA. Die Ernte der Zellen für die Western-Blot-Analysen erfolgte 24h und 48h nach der siRNA-Transfektion. β-Aktin diente als Ladekontrolle. Ø: Zellen nur mit Transfektionsreagenzien (Lipofectamine™ 3000 und Lipofectamine® RNAiMAX) behandelt.

Mit der Zelllinie 92.1, bei der nach Hemmung von SOX10 und MITF ebenfalls eine starke Zelltodinduktion beobachtet wurde, war geplant, analoge Versuche durchzuführen, allerdings ließ sich diese Zelllinie auch mit verschiedenen Transfektionsreagenzien nicht mit den Expressionsplasmiden transfizieren. Aufgrund der schlechten Transfektionseffizienz von < 5 % war es daher nicht möglich war, Rescue-Experimente mit dieser Zelllinie durchzuführen.

3.4 SOX10-basiertes *drug repurposing*

3.4.1 SOX10-basierte Identifizierung potenzieller Kandidatenstrukturen für eine zielgerichtete Therapie mittels UM-Interaktionsnetzwerk

Da derzeit wirksame Therapien insbesondere für UM-Patienten mit fortgeschrittener Erkrankung nur begrenzt verfügbar sind, wurden im letzten Teil der Arbeit die zuvor gewonnenen Erkenntnisse über die essenzielle Funktion von SOX10 im UM genutzt, um neue Zielstrukturen für eine zielgerichtete Therapie des UM zu finden. Die Generierung und Analyse der Netzwerke sowie die Selektion potenzieller Zielstrukturen auf Basis der experimentellen Erkenntnisse zu SOX10 im UM erfolgte durch Adrian Weich, M.Sc. und Prof. Dr. Julio Vera-Gonzalez (AG Vera-Gonzalez, Hautklinik des Uniklinikums Erlangen). Konkret sollten mithilfe eines bioinformatischen, netzwerkbasierten Ansatzes neue potenzielle Kandidaten identifiziert werden, deren Funktion im Rahmen einer zielgerichteten Therapie anstelle des nicht pharmakologisch beeinflussbaren SOX10 moduliert werden könnten. Dabei könnten nicht nur neuartige Substanzen zum Einsatz kommen, die bisher nur präklinisch eingesetzt wurden, sondern möglicherweise bereits gut erforschte oder sogar zugelassene Medikamente im Sinne eines *drug repurposing* in einem neuen Anwendungsgebiet eingesetzt werden, für das sie ursprünglich nicht entwickelt wurden [443]. *Drug repurposing* hat neben der Ersparnis von Kosten bezüglich der Forschung und Entwicklung unter anderem den Vorteil, dass etwa die für eine Zulassung benötigten umfangreiche Sicherheitstests, wenn auch in einem anderen medizinischen Anwendungsgebiet, bereits in der Vergangenheit durchgeführt wurden und dadurch die Translation in die klinische Anwendung schneller erfolgen kann [443]. Dies sind insbesondere Vorteile, die das *drug repurposing* für die Behandlung von seltenen Erkrankungen attraktiv machen, für die sonst nur begrenzte Ressourcen zur Verfügung stehen [443, 444].

Für die Generierung eines UM-Protein-Interaktionsnetzwerkes wurden Proteine aus wichtigen Signalwegen im UM und Proteine mit bekannter SOX10-Interaktion in ein Netzwerk implementiert und dieses mit Daten bezüglich miRNA-mRNA-Interaktionen erweitert, wodurch ein Netzwerk bestehend aus 4.954 *nodes* (Knotenpunkten) und 63.506 *edges* (Ecken) generiert wurde. Nach der weiteren Prozessierung und der Integration von Daten eines bereits zuvor erstellten SOX10-Interaktionsnetzwerkes aus dem Kontext der Oligodendrozytendifferenzierung [377] wurde das Netzwerk auf 5.479 *nodes* und 65.032 *edges* erweitert. Nach Entfernung doppelter Knotenpunkte und Self-Loops wurde so letztendlich ein Netzwerk bestehend aus 3.003 *nodes* und 12.517 *edges* erstellt. In dieses Netzwerk wurden dann Genexpressionsdaten von 80 UM-Primärtumoren aus der TCGA-Datenbank des Datensatzes „*Ocular Melanomas*“ [75] implementiert, das Netzwerk auf regulatorische Motive hin untersucht und nach Erstellung einer Hierarchie ein Kern-Interaktionsnetzwerk mit den 100 am höchsten bewerteten Motiven bestehend aus 65 *nodes* und 306 *edges* generiert (Abb. 34).

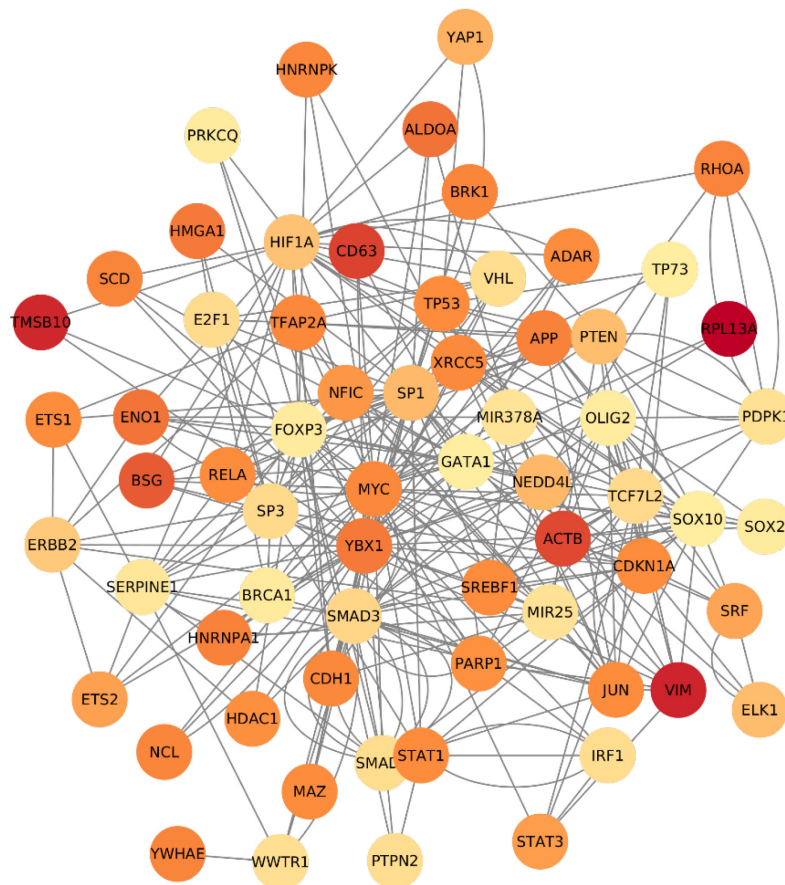


Abb. 34: Kern-Interaktionsnetzwerk im Uveal melanom

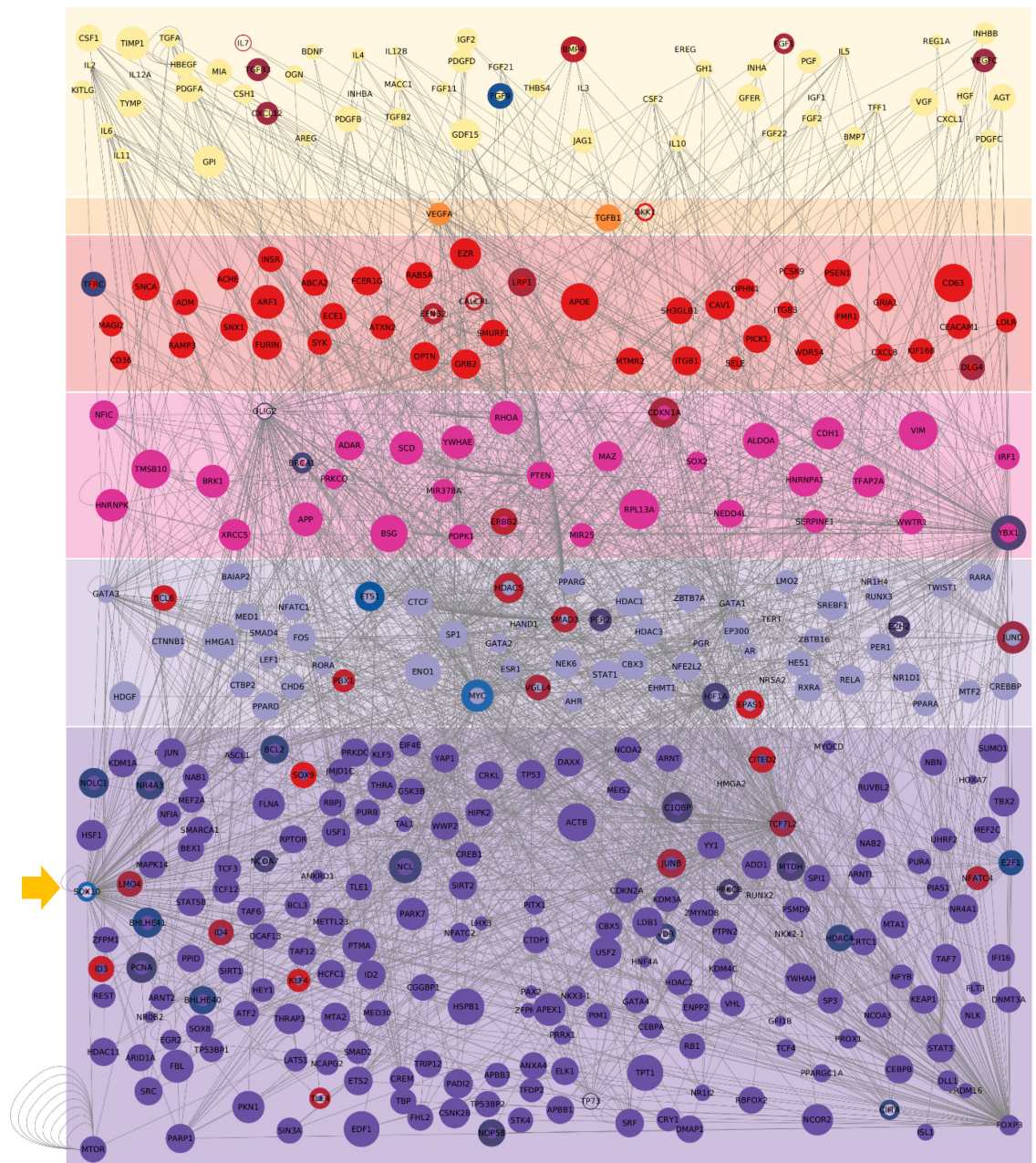
Das Kern-Netzwerk enthält die 100 am höchsten bewerteten Motive und besteht aus 65 *nodes* und 306 *edges*.

Das Kern-Interaktionsnetzwerk wurde dann als Ausgangspunkt für die Generierung eines Netzwerkes für die Zielstrukturselektion („*target selection network*“) genutzt, indem die Kern-Komponenten des Netzwerks und ihre jeweiligen ersten Nachbarn im Netzwerk extrahiert und nach ihrer grundlegenden Funktion reannotiert wurden. Das so entstandene Netzwerk enthielt 394 *nodes* und 1.817 *edges*, die dann GO-Terms zugeordnet wurden (Abb. 35). Dem Term „*growth factors*“ wurden dabei 63, dem Term „*receptors*“ 47, dem Term „*co-transcription factors*“ 63 und dem Term „*transcription factors*“ 110 Gene (Anzahl inkl. „*Co-transcription factors*“) zugewiesen. Nach Integration der Ergebnisse der RNA-Sequenzierung nach Transfektion mit SOX10-spezifischer siRNA wurden letztlich 56 *nodes* identifiziert, die nach SOX10-Hemmung differenziell exprimiert waren.

Abb. 35: Netzwerk zur Identifizierung potenzieller therapeutischer Zielstrukturen im UM („*target selection network*“)

Die Hintergrundfarbe repräsentiert die Zugehörigkeit zu unterschiedlichen GO-Terms, die Größe des jeweiligen Knotens korreliert mit der \log_{10} -transformierten mittleren Genexpression im UM, berechnet auf Basis des TCGA-Datensatzes (80 UM-Primärtumoren) [75]. Die Farbe des Ringes um den Knoten stellt dar, ob das jeweilige Gen bei den in dieser Arbeit beschriebenen RNA-Sequenzierungsanalysen nach SOX10-Hemmung in den UM-Zelllinien 92.1 und Mel270 im Vergleich zur Kontrolle herabreguliert (blau) oder hochreguliert (rot) war. Gelber Pfeil: Position von SOX10 im Netzwerk.

Abb. 35 siehe Folgeseite



GO Terms:

- Growth Factor (GO:0008083)
- Growth Factor (GO:0008083) & Receptor (GO:0043112)
- Receptor (GO:0043112)
- Other
- Co-Transcription Factor (GO:0001221)
- Transcription Factor (GO:0008134)

Farbe des äußeren Rings:
log₂fold change
nach SOX10-Hemmung



Abb. 35, Beschreibung siehe S. 145

Aus diesem Netzwerk wurden dann die vier Kandidatengene *Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2)*, *E2F1*, Transferrin-Rezeptor (*TFRC*) (codiert für CD71) und *FGF9* ausgewählt und in ersten *in vitro*-Experimenten auf ihre Eignung als potenzielle therapeutische Zielstrukturen im UM getestet. Alle vier Kandidaten wurden nach SOX10-Hemmung herabreguliert, können entweder durch *small molecule*-Inhibitoren oder neutralisierende bzw. blockierende Antikörper gehemmt werden und wurden bereits in Verbindung mit tumorfördernden Vorgängen im UM oder in anderen Krebsarten beschrieben.

E2F1 aus der E2F-Transkriptionsfaktorfamilie ist zentral am Zellzyklusübergang von der G1- in die S-Phase beteiligt [386]. Die E2F-Transkriptionsfaktorfamilie besteht aus acht nah verwandten Mitgliedern, die neben der Zellzyklusregulation auch in die Aufrechterhaltung der Genomstabilität involviert sind [445]. Mit Ausnahme von E2F7 und E2F8 agieren sie in Komplexen mit TFDP1, TFDP2 oder TFDP3 aus der Transkriptionsfaktordimerisierungspartner-(TFDP)-Familie [445]. E2F1, E2F2 und E2F3 fördern die Expression ihrer Zielgene und werden daher als transkriptionelle Aktivatoren bezeichnet, während die kanonischen Repressoren E2F4, E2F5 und E2F6 die Transkription hemmen [445, 446]. E2F7 und E2F8 besitzen zwei DNA-Bindedomänen, jedoch keine Dimerisierungsdomäne und können daher ihre repressive Funktion unabhängig der TFDP-Proteine als Homodimere ausüben, weshalb sie auch als atypische Repressoren bezeichnet werden [445, 447]. E2F1 bildet in Zellen in der G0/G1-Phase Komplexe mit dem Tumorsuppressorprotein Rb, wodurch seine Bindung an die DNA inhibiert wird und es transkriptionell inaktiv ist [386]. Nachdem Rb durch die Cyclin-CDK-Komplexe Cyclin D1-CDK4/6 und Cyclin E1-CDK2 in der G1-Phase hyperphosphoryliert wird, nimmt seine Bindung zu E2F1 ab und E2F1 kann dann seine Funktion als Transkriptionsfaktor direkt durch Stimulierung der Transkription von Genen ausüben, die für den Übergang in die S-Phase benötigt werden [384-386]. Im KM führt die Hemmung von E2F1 zum Zelltod, zur Seneszenz und erhöht die Sensitivität gegen BRAFi von BRAFi-resistenten Zellen [448]. Cronin et al. konnten nach Ausschaltung von SOX10 im KM eine Verringerung der E2F1-Expression zeigen [294]. Darüber hinaus fehlen weitere Hinweise in der Literatur, dass SOX10 die Expression von E2F1 beeinflussen kann. Pan et al. fanden, dass die Hemmung von BAP1 die Expression von E2F1-Zielgenen, nicht aber von E2F1 selbst in UM-Zellen verringert [93]. Darüber hinaus gibt es derzeit keine Publikationen zur Rolle von E2F1 im UM.

Die Histonmethyltransferase EZH2 gehört zur Familie der *Polycomb group*-Gene und stellt die katalytische Untereinheit des Polycomb repressive complex 2 (PRC2) dar, der durch epigenetische Veränderungen die Stilllegung von Genen bewirkt [449]. Konkret führt EZH2 zur Dreifach-Methylierung von Lysin 27 am Histon H3 (H3K27me3), welches als repressive Chromatinmarkierung dient und somit die Stilllegung von Genen bedingt [450]. EZH2 ist eines der Gene, das über den Rb-E2F-Signalweg und insbesondere über E2F1 und E2F2 transkriptionell hochreguliert wird [451]. Es wird in proliferierenden Zellen und auch in einer Vielzahl von Tumorentitäten inklusive dem KM exprimiert [451, 452]. Auch im UM scheint EZH2 eine Rolle zu spielen, wie die Analyse von 89 UM-

Primärtumoren zeigte; hier hatten Patienten mit einer höheren EZH2-Expression eine höhere Mitoserate und Ki67-Expression, ein höheres Risiko für die Entwicklung von Metastasen und ein schlechteres krankheitsspezifisches Überleben [453]. Die Funktion von EZH2 kann über *small molecule*-Inhibitoren wie GSK126, EPZ011989 und Tazemetostat (EPZ-6438) gehemmt werden, die mit seinem Substrat S-Adenosyl-Methionin (SAM) konkurrieren und so eine kompetitive Hemmung des Enzyms bedingen [449]. Tazemetostat wurde von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) im Januar 2020 für die Behandlung von Patienten ≥ 16 Jahren mit fortgeschrittenem oder metastasiertem, nicht-resezierbarem epitheloiden Sarkom zugelassen [454]. LaFave et al. konnten zeigen, dass Mesotheliom-Zellen mit einem Funktionsverlust von BAP1 sensitiv auf eine Hemmung von EZH2 mit dem *small molecule*-Inhibitor EPZ011989 reagieren [455], weshalb eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte, ob eine EZH2-Hemmung durch Tazemetostat (EPZ-6438) ebenfalls einen Effekt auf UM-Zellen haben könnte [456]. Allerdings zeigte sich hier, dass der Inhibitor in keiner der getesteten Konzentrationen weder die Kolonienbildung noch das Zellwachstum der UM-Zelllinien (darunter die BAP1-exprimierende Zelllinie 92.1) beeinflusste und auch keine Korrelation zwischen dem BAP1-Status und der EZH2-Expression bestand [456]. Im Gegensatz dazu zeigten Jin et al. in ihrer Arbeit, dass der EZH2-Inhibitor GSK126 die Zellviabilität der Zelllinien 92.1, Mel270, OMM2.3 und OMM-1 verringern konnte, zur Apoptoseinduktion führte sowie das Tumorstwachstum im Xenograft-Mausmodell verringerte [457].

Das Gen *TFRC* ist auf Chr. 3q29 lokalisiert und codiert für das Protein Transferrin-Rezeptor 1 (CD71), das zentral an der Aufrechterhaltung des Eisenhaushalts der Zellen beteiligt ist [458, 459]. Eisen wird im Körper neben der Verwendung in Hämoglobin und Myoglobin zum Sauerstofftransport im Blut und den Muskeln auch für die Funktion zahlreicher Enzyme benötigt und ist unter anderem für die Funktion des Immunsystems essenziell [459, 460]. Da Fe^{3+} schlecht löslich ist und freie Eisenionen zur Produktion von ROS führen, werden diese im Organismus an das Plasmaprotein Transferrin gebunden transportiert [459, 461]. CD71 ist ein ubiquitär exprimierter Transmembranrezeptor und liegt als Homodimer in der Zelloberfläche vor, wo es die clathrin-vermittelte Endozytose von Transferrin und den jeweils daran gebundenen zwei Fe^{3+} -Ionen ins Zellinnere vermittelt [459, 461-463]. CD71 scheint darüber hinaus an der Ferroptose, einer eisenvermittelten Art des nicht-apoptotischen Zelltodes, beteiligt zu sein, die mit Tumorerkrankungen und neurologischen Erkrankungen assoziiert wird [459, 464, 465]. Eine Überexpression von CD71 im Vergleich zum normalen Gewebe wurde in zahlreichen Tumoren gefunden [463], darunter auch im HCC [466, 467], wo die Expression im *in vivo*-Modell positiv mit dem Fortschreiten der Erkrankung korrelierte [468]. Außerdem wurde eine erhöhte Expression im Mammakarzinom festgestellt, wo es ein schlechter prognostischer Marker ist und negativ mit dem Ansprechen auf Tamoxifen korreliert [469]. Bislang gibt es noch keine Publikationen zu einer gezielten Hemmung der CD71-Rezeptorfunktion im UM, allerdings konnten Zhang et al. im Mausmodell zeigen, dass das DNA-Aptamer XQ-2d, das spezifisch an CD71 bindet, genutzt werden kann, um das daran gekoppelte Zytostatikum Monomethylauristatin E gezielt in UM-Zellen einzuschleusen [470].

Fibroblast growth factor 9 (FGF9) ist ein Wachstumsfaktor aus der FGF-Familie, deren 18 sezernierte Mitglieder als Liganden der vier FGF-Rezeptoren FGFR1, FGFR2, FGFR3 und FGFR4 wirken [471]. Letztere sind RTK, die aus drei extrazellulären Immunglobulin-artigen Domänen (I, II und III), die die Bindungsspezifität der FGFs bestimmen, einer Transmembrandomäne und der zweigeteilten intrazellulären Tyrosinkinasedomäne aufgebaut sind [471-473]. Von FGFR1, FGFR2 und FGFR3 können durch alternatives Splicing der Exons 7 bis 9, die für die immunglobulin-artige Domäne III codieren, die beiden Splicevarianten IIIb (Nutzung von Exon 8) und IIIc (Nutzung von Exon 9) generiert werden, wodurch sich der C-terminale Bereich der Domäne III ändert und die Bindungsaffinität zu den Liganden moduliert wird [472, 474]. FGFs sind zentral an der Regulierung der Proliferation, Migration, am Metabolismus, Zellüberleben und an der Differenzierung von Zellen beteiligt und können parakrin als auch autokrin wirken [471]. Bisher wurden 22 FGFs, die aufgrund ihrer Sequenzhomologie, biologischen Funktion und evolutionärer Verwandtschaft fünf Subfamilien zugeordnet werden können, identifiziert [471]. FGF9 bildet zusammen mit FGF9, FGF16 und FGF20 eine eigene Subfamilie, deren Mitglieder die IIIc-Splicevarianten von FGFR1, FGFR2 und FGFR3 sowie im Gegensatz zu anderen FGFs auch die IIIb-Splicevariante von FGFR3 zusätzlich zu FGFR4 aktivieren können [471]. FGF9 bindet vor allem an die IIIc-Isoformen und zeigt die höchste Rezeptorspezifität für FGFR3c, gefolgt von FGFR2c [475]. Bislang gibt es keine Publikationen zur Frage, ob SOX10 die Expression von FGF9 beeinflussen kann. Im Kontext des UM konnten Seitz et al. zeigen, dass aktivierte hepatische Sternzellen FGF9 sezernieren und dieses die Proliferationsfähigkeit der UM-Zelllinien OMM-1 und OMM2.5 *in vitro* fördert, was zum speziellen Hepatotropismus des UM beitragen könnte [476].

3.4.1.1 Basale Expression der Kandidatengene E2F1, EZH2, TFRC und FGF9

Zunächst wurde die basale Gen- und Proteinexpression der vier ausgewählten Kandidatengene *EZH2*, *E2F1*, *FGF9* und *TFRC* in den drei UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 sowie in der KM-Zelllinie 1205Lu mittels qPCR- und Western Blot-Analysen untersucht. *EZH2* und *E2F1* wurden in allen untersuchten Zelllinien exprimiert, am stärksten war die Genexpression dabei in den Zelllinien 92.1 und Mel270 (Abb. 36A und B). *TFRC* wurde ebenfalls in allen Zelllinien nachgewiesen (Abb. 36C). *FGF9* wurde nur in der Zelllinie 92.1 stark exprimiert; bei den beiden anderen untersuchten UM-ZL sowie der KM-ZL 1205Lu war nur eine geringe *FGF9*-Genexpression nachzuweisen (Abb. 36D). Auf Proteinebene konnte E2F1 bei allen Zelllinien detektiert werden, wobei die höchste Expression in der UM-Zelllinie Mel285 detektiert wurde. (Abb. 36E). EZH2 konnte neben den bereits untersuchten UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 auch in der Zelllinie Mel285 sowie in der KM-Zelllinie 1205Lu nachgewiesen werden. Im Western Blot zeigte sich bei HM nur eine schwache Bande. CD71 (codiert durch *TFRC*) wurde am stärksten in den UM-Zelllinien Mel270 und OMM1.5 exprimiert, gefolgt von HM und Mel285. Die Expression in der KM-Zelllinie 1205Lu war wie bereits in der Genexpressionsanalyse gezeigt am geringsten. Im Gegensatz zu den Genexpressionsdaten

war in 92.1-Zellen jedoch eine geringere Expression als in der Zelllinie Mel270 nachweisbar. Ebenfalls eine von den Genexpressionsanalysen abweichendes Ergebnis zeigte sich bei der Analyse der FGF9-Expression. Im Western Blot war die höchste Proteinexpression in den Zelllinien 92.1 und Mel270 detektierbar, allerdings war im Gegensatz zur Genexpression kein deutlicher Expressionsunterschied zwischen beiden Zelllinien erkennbar. Insgesamt war eine FGF9-Proteinexpression in allen untersuchten UM-Zelllinien, in der KM-Zelllinie 1205Lu und in geringem Ausmaß auch in HM nachweisbar.

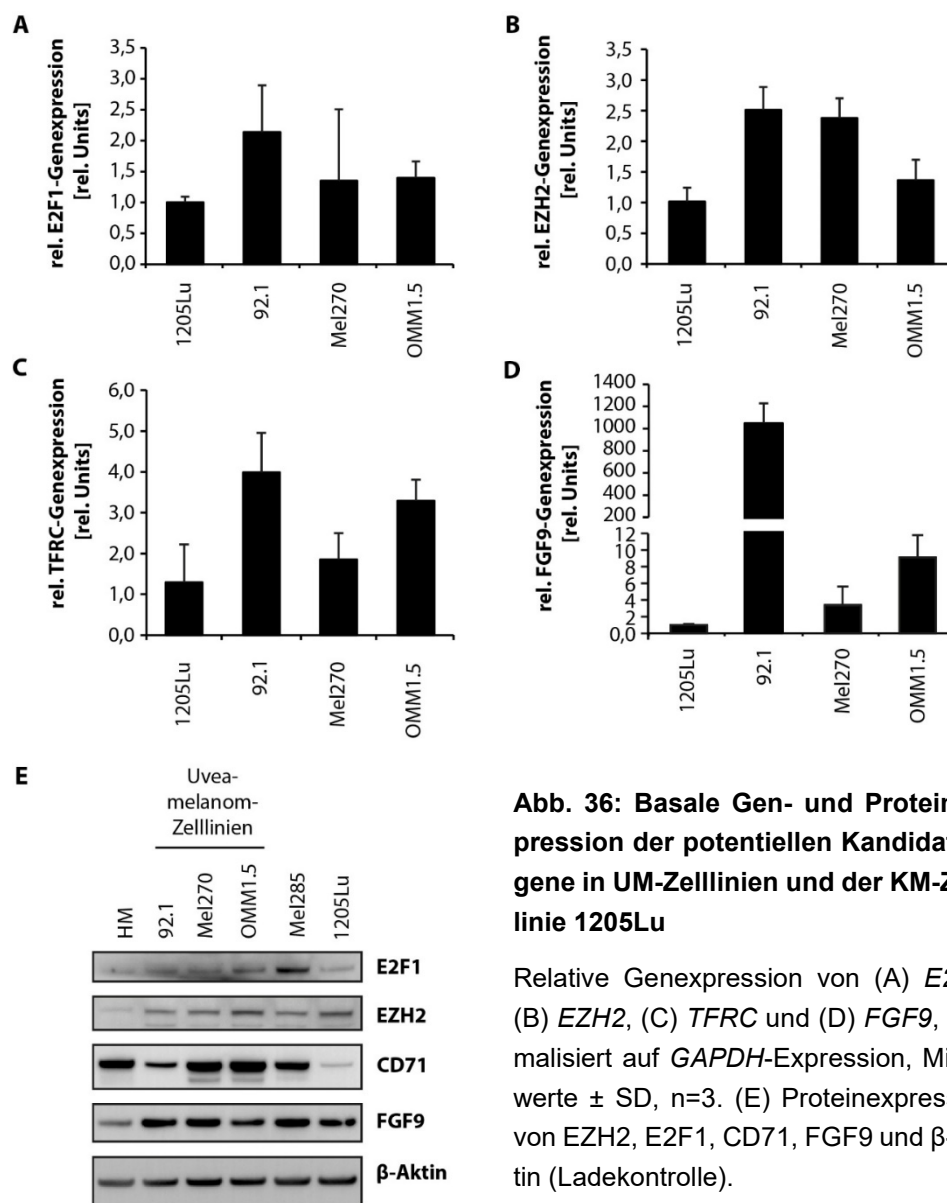


Abb. 36: Basale Gen- und Proteinexpression der potentiellen Kandidatengene in UM-Zelllinien und der KM-Zelllinie 1205Lu

Relative Genexpression von (A) *E2F1*, (B) *EZH2*, (C) *TFRC* und (D) *FGF9*, normalisiert auf *GAPDH*-Expression, Mittelwerte \pm SD, $n=3$. (E) Proteinexpression von *EZH2*, *E2F1*, *CD71*, *FGF9* und β -Aktin (Ladekontrolle).

Zusätzlich zur basalen Genexpression wurde auch die Genexpression nach Transfektion mit SOX10-spezifischen siRNAs analysiert und mit den Ergebnissen der unter Punkt 3.2.5.3 beschriebenen RNA-Sequenzierungsanalyse verglichen (Abb. 37). Hier zeigte sich, dass laut der qPCR-Analyse die Gene *E2F1* und *TFRC* nach SOX10-Hemmung in den beiden Zelllinien 92.1 und Mel270 deutlich geringer exprimiert wurden, während sich die Expression in der Zelllinie OMM1.5 kaum änderte. Ebenfalls eine geringere Expression nach SOX10-Hemmung konnte in der Zelllinie 92.1 bei *FGF9* detektiert werden, während sich die Expression in den Zelllinien Mel270 und OMM1.5 kaum veränderte,

was auf die geringe *FGF9*-Genexpression der Zellen zurückzuführen war. Im Gegensatz zu den RNA-Sequenzierungsdaten konnte die Herabregulation von *EZH2* nach SOX10-Knockdown in der qPCR-Analyse allerdings nicht bestätigt werden.

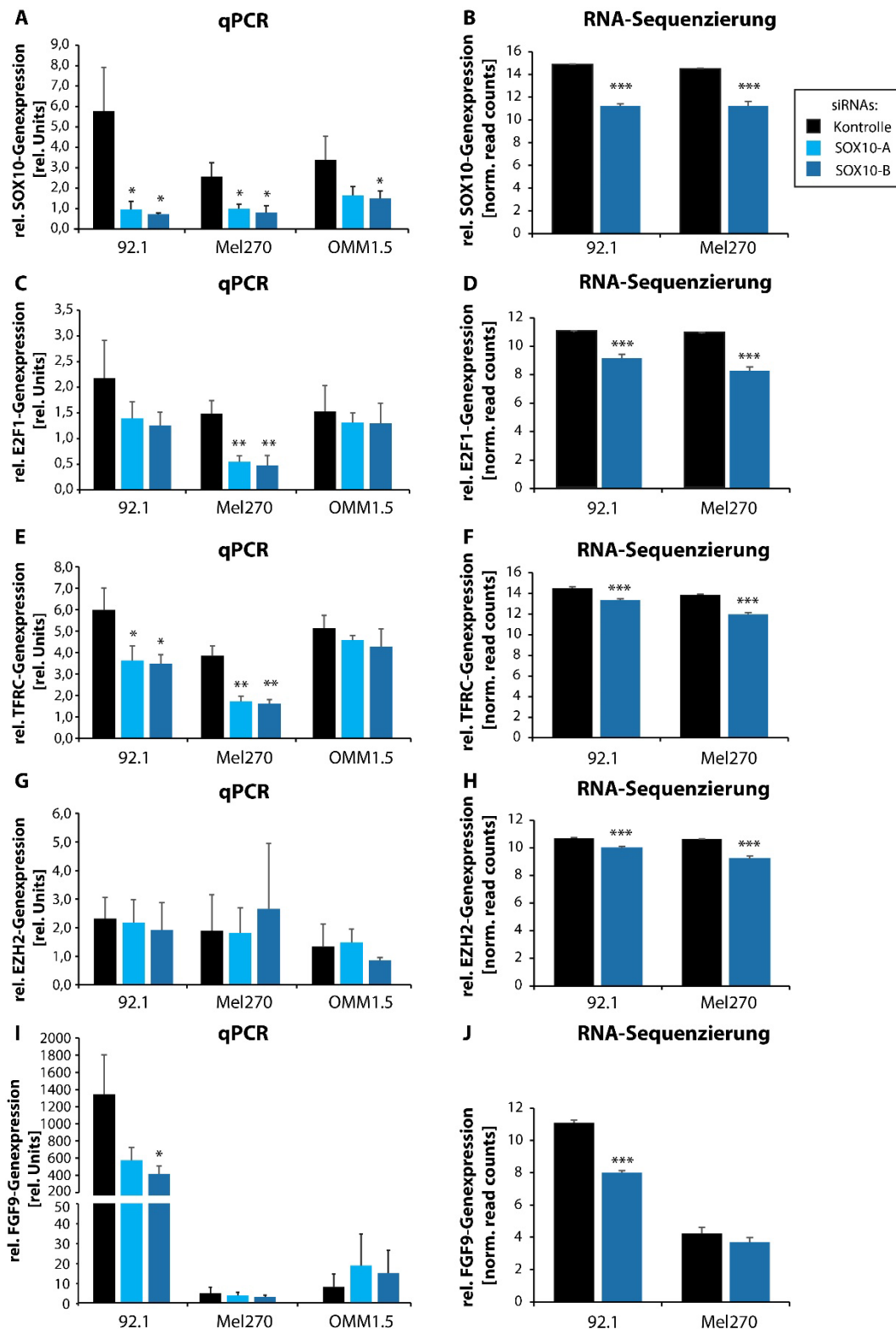


Abb. 37, Beschreibung siehe S. 152

Abb. 37: Genexpression der vier Kandidatengene *E2F1*, *TFRC*, *EZH2* und *FGF9* nach SOX10-Hemmung

Relative Genexpression von (A, B) *SOX10*, (C, D) *E2F1*, (E, F) *TFRC*, (G, H) *EZH2* und (I, J) *FGF9* nach Transfektion mit SOX10-A-, SOX10-B- oder einer Kontroll-siRNA für 24h, analysiert durch qPCR (linke Spalte, n = 3) bzw. RNA-Sequenzierungsanalyse nach Transfektion mit SOX10-B- oder einer Kontroll-siRNA für 24h (rechte Spalte, n = 4 gepoolt). Mittelwerte \pm SD, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. Kontroll-siRNA.

Die Analyse der Proteinexpression nach SOX10-Hemmung ergab analog zu den Ergebnissen der Genexpressionsanalysen eine deutliche Herabregulierung von *E2F1* in den UM-Zelllinien 92.1 und Mel270 (Abb. 38). Das von *TFRC* codierte Protein CD71 wurde etwas verringert in der Zelllinie 92.1 exprimiert, allerdings zeigten sich hier keine Unterschiede nach SOX10-Hemmung in der Zelllinie Mel270, bei der zuvor eine verringerte *TFRC*-Genexpression gefunden wurde, und in der Zelllinie OMM1.5. Analog zur Genexpressionsanalyse konnten in allen drei untersuchten Zelllinien keine Veränderungen der *EZH2*-Expression detektiert werden. Anders als durch die Genexpressionsanalyse zu erwarten gewesen war, zeigte die Zelllinie 92.1 keine übermäßige *FGF9*-Proteinexpression im Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien. Insgesamt war auch keine *FGF9*-Herabregulation nach SOX10-Hemmung in allen drei Zelllinien nachweisbar. *FGF9* kann posttranslational durch N-Glykosylierung modifiziert werden und kann als 25, 29 und 30 kDa große Isoformen auftreten [477, 478]. Anders als in Abb. 36E zu sehen ist, konnte nach SOX10-Hemmung bei der Detektion mit dem *FGF9*-spezifischen Antikörper eine zweite Bande mit einem etwas geringeren Molekulargewicht bei den Zelllinien 92.1 und Mel270 nachgewiesen werden. Eine 25 kDa-Bande wurde allerdings bei keiner der drei untersuchten Zelllinien detektiert.

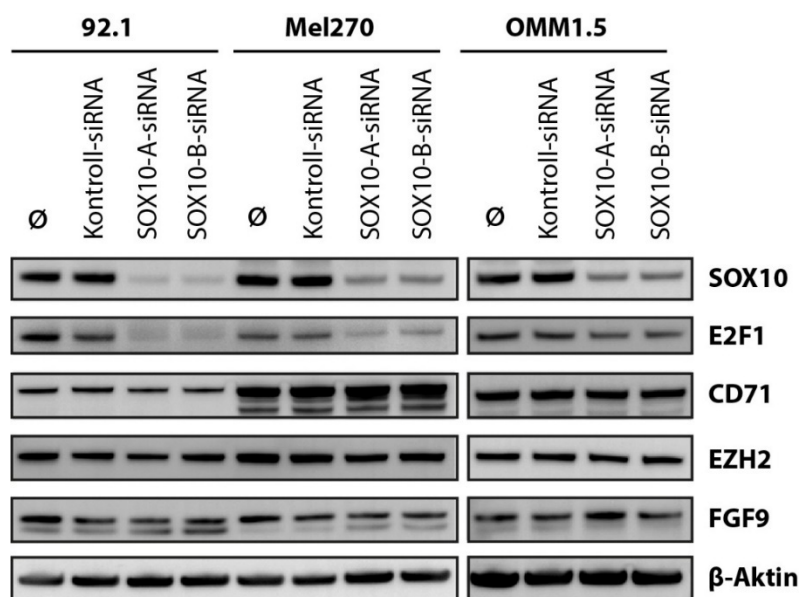


Abb. 38: Proteinexpression von *E2F1*, *CD71*, *EZH2* und *FGF9* nach SOX10-Hemmung

Proteinexpression von *SOX10*, *E2F1*, *CD71*, *EZH2* und *FGF9* 48h nach Transfektion mit SOX10-spezifischen siRNAs (SOX10-A, SOX10-B), Kontroll-siRNA oder Behandlung nur mit dem Transfektionsreagenz Lipofectamine® RNAiMAX (Ø). Ladekontrolle: β -Aktin.

3.4.1.2 Zellviabilität nach Inhibition mit *small molecule*-Inhibitoren bzw. blockierenden Antikörpern

Als nächstes wurde die Wirkung der beiden *small molecule*-Inhibitoren Tazemetostat und HLM006474 zur pharmakologischen Hemmung von EZH2 bzw. E2F1 sowie der Einfluss von neutralisierenden bzw. blockierenden Antikörper gegen FGF9 und CD71 auf die Zellviabilität der drei UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 mittels CellTiter-Blue-Assays untersucht. Hierbei zeigte sich insbesondere bei der Behandlung mit HLM006474 eine deutliche Reduktion der Zellviabilität nach 96h in allen drei analysierten UM-Zelllinien (Abb. 39A). Die EZH2-Inhibition durch Tazemetostat (IC_{50} : 11 nM [479]), führte nur in den höchsten getesteten Konzentrationen zu einer Abnahme der Zellviabilität (Abb. 39B). HLM006474 ist ein pan-E2F-Inhibitor (E2Fi), der die DNA-Bindung der E2F-Transkriptionsfaktoren hemmt (IC_{50} : 29,8 μ M) und nicht spezifisch für E2F1 ist [480]. Daher wurde auch die Genexpression der sieben anderen Mitglieder der E2F-Transkriptionsfaktoren analysiert. Diese waren nicht Bestandteile des generierten *target selection network*, allerdings ist bekannt, dass andere Mitglieder dieser Transkriptionsfaktorfamilie den Funktionsausfall einzelner E2Fs kompensieren können [447, 481]. Daher liegt nahe, dass die deutliche Abnahme der Zellviabilität nach HLM006474-Exposition nicht nur durch E2F1, sondern auch durch Inhibition der anderen E2F-Transkriptionsfaktoren vermittelt werden könnte. Die Daten der RNA-Sequenzierungsanalyse nach SOX10-Inhibition zeigten, dass insbesondere E2F3 in den Zellen stark exprimiert war und nach SOX10-Hemmung herabreguliert wurde (Abb. 39C). Außerdem konnte auch eine Herabregulation von E2F2, E2F4, E2F6 sowie E2F7 in beiden Zelllinien sowie von E2F8 in der Zelllinie Mel270 detektiert werden.

Die Hemmung von CD71 mithilfe eines neutralisierenden Antikörpers führte nur in der höchsten getesteten AK-Konzentration zu einer Abnahme der Zellviabilität der Zelllinie 92.1 nach 7 Tagen, während sich die Zellviabilität der beiden anderen Zelllinien kaum änderte. Bei der Behandlung der Zellen mit einem FGF9-neutralisierenden Antikörper zeigten sich jedoch keinerlei Unterschiede in der Zellviabilität im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 40).

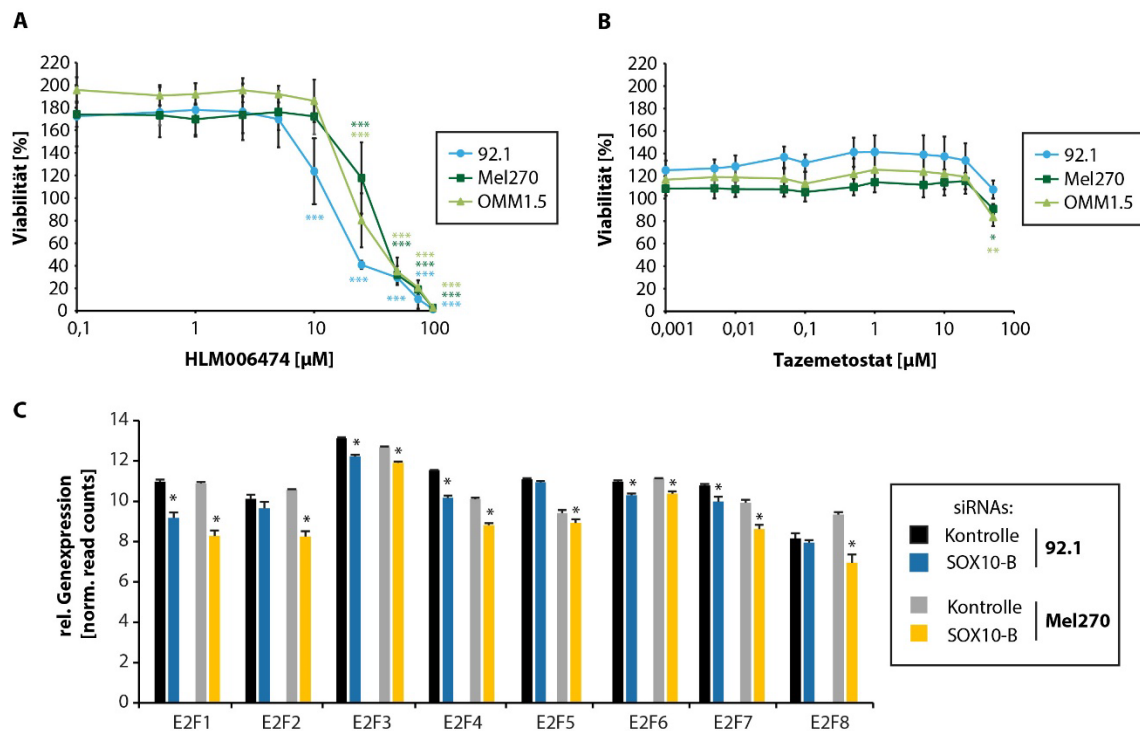


Abb. 39: Verringerung der Zellviabilität nach Inkubation mit HLM006474 bzw. Tazemetostat und Expression von E2F-Transkriptionsfaktoren

Die UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 wurden mit verschiedenen Konzentrationen des (A) pan-E2Fi HLM006474 bzw. (B) EZH2-Inhibitors Tazemetostat oder DMSO (Kontrolle, 100%) inkubiert und die Zellviabilität nach 96h mithilfe des CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega) bestimmt. Mittelwerte \pm SD, $n = 3$. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$ vs. DMSO-Kontrolle. (C) Relative Genexpression der acht Mitglieder der E2F-Transkriptionsfaktorfamilie in den Zelllinien 92.1 und Mel270 nach Transfektion mit einer Kontroll-siRNA oder SOX10-B-siRNA für 24h ($n = 4$ gepoolt). Mittelwerte \pm SD, *: $p < 0,001$ vs. Kontroll-siRNA.

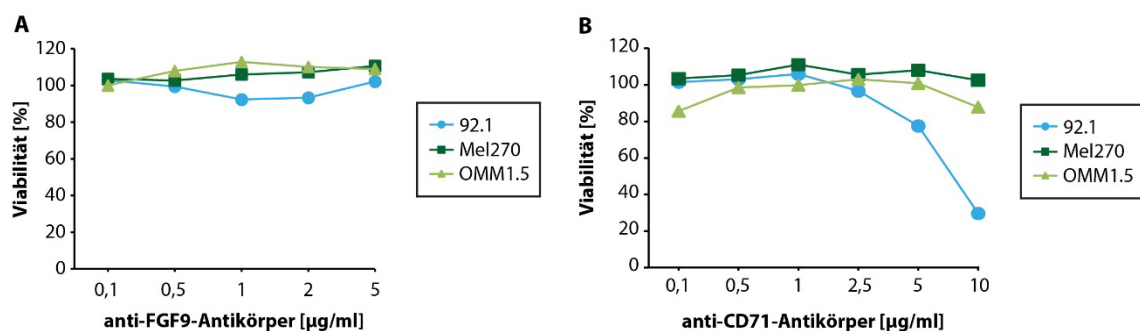


Abb. 40: Analyse der Zellviabilität nach Inkubation mit neutralisierenden Antikörpern gegen FGF9 bzw. CD71

Die UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 wurden mit verschiedenen Konzentrationen von neutralisierenden Antikörpern gegen (A) FGF9 (#MAB273-100, R&D Systems) und (B) CD71 (#AF2474, R&D Systems) für 7 Tage inkubiert und dann die Zellviabilität mithilfe des CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega) bestimmt. 100%: Zellviabilität unbehandelter Zellen. $N = 1$.

3.4.2 Der pan-E2F-Inhibitor HLM006474 als mögliche zielgerichtete Therapie im Uveamelanom

3.4.2.1 HLM006474 induziert Zellzyklusarrest und Apoptose in UM-Zelllinien

Da es durch die Behandlung mit dem pan-E2Fi HLM006474 zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellviabilität kam, wurden weitere funktionelle Analysen mit diesem Inhibitor durchgeführt. Für die Untersuchung der Zellzyklusprogression unter HLM006474-Behandlung wurden die Zellen mit 50 μ M HLM006474 oder DMSO als Kontrolle für 72h inkubiert und dann eine Zellzyklusanalyse mittels Propidiumjodid-Färbung und Durchflusszytometrie durchgeführt. Hier zeigte sich bei allen untersuchten Zelllinien ein deutlicher Anstieg des Anteils an Zellen in der S-Phase (Abb. 41).

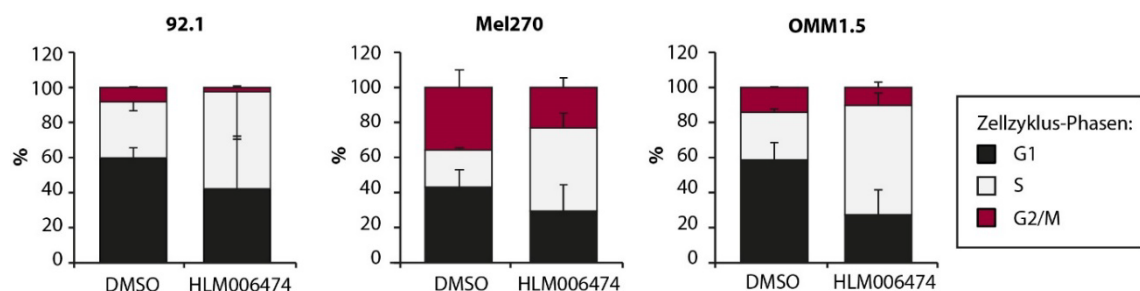


Abb. 41: Zellzyklusarrest in der S-Phase des Zellzyklus nach Inkubation mit HLM006474

Anteil der in den Zellzyklusphasen G1, S und G2/M befindlichen Zellen nach Inkubation mit 50 μ M HLM006474 oder DMSO (Kontrolle) für 72h, Mittelwerte \pm SD, n = 3. Analyse durch Propidiumjodid-Färbung und anschließende durchflusszytometrische Messung.

Die Veränderungen der Zellzyklusprogression konnte durch Western Blot-Analysen bestätigt werden (Abb. 42). Die Expression von Cyclin D1 war nur gering nachweisbar und nach HLM006474-Behandlung leicht vermindert, während die p21-Expression in der Zelllinie 92.1 erhöht und in den Zelllinien Mel270 und OMM1.5 unverändert blieb und die p27-Expression in allen Zellen leicht verringert war. Nach Inkubation mit HLM006474 für 96h kam es sowohl zu einer verringerten Proteinexpression als auch zu einer Rb-Hydrophosphorylierung in allen untersuchten Zelllinien. Außerdem konnte eine Herabregulierung von E2F1 beobachtet werden, was dadurch erklärt werden kann, dass E2F1 unter anderem auch seine eigene Transkription über eine positive Rückkopplungsschleife reguliert [482]. E2F1 fördert als Transkriptionsfaktor direkt die Expression zahlreicher Proteine, darunter die regulatorischen Proteine der G1- und S-Phase wie Cyclin E1, Cyclin A2 und CDK2 [482-484]. Nach der Inkubation mit HLM006474 kam es zu einer deutlichen Verminderung der Expression von Cyclin E1, CDK2 und Cyclin A2, sodass von einer Bestätigung des S-Phase-Arrests ausgegangen werden kann.

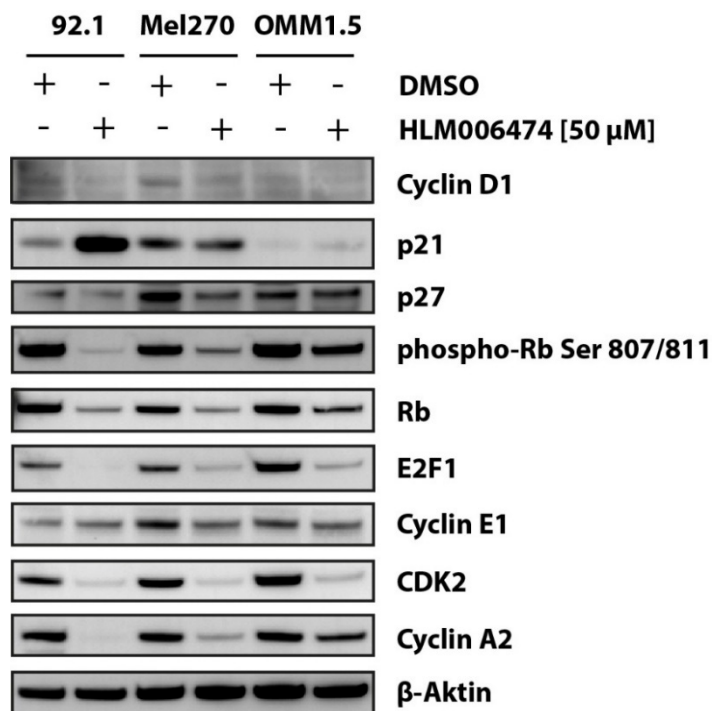


Abb. 42: Expressionsanalyse von zellzyklusregulierenden Proteinen nach Inkubation mit HLM006474

Proteinexpression von Cyclin D1, p21, p27, phosphoryliertem Retinoblastom-Protein (phospho-Rb; Phosphorylierung an Ser807 und Ser811), Rb, E2F1, Cyclin E1, CDK2 und Cyclin A2 nach Inkubation mit 50 µM HLM006474 oder DMSO (Kontrolle) für 96h. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

3.4.2.2 HLM007464 aktiviert p38 MAPK und induziert Zelltod über intrinsischen Apoptoseweg

Die starke Abnahme der Zellviabilität nach Inkubation mit HLM006474 deutet auf eine Zelltodinduktion hin. Um zu untersuchen, ob der Zelltod durch Apoptose oder Nekrose verursacht wird, wurden die UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 für 96h mit 50 µM HLM006474 oder DMSO als Kontrolle inkubiert, dann eine Annexin V-Propidiumjodid-Färbung durchgeführt und die Färbung mittels Durchflusszytometrie analysiert. In allen drei untersuchten Zelllinien kam es durch die Inkubation mit HLM006474 zu einer signifikanten Zunahme an Annexin V-positiven Zellen, was für eine gezielte Zelltodinduktion durch Apoptose spricht (Abb. 43).

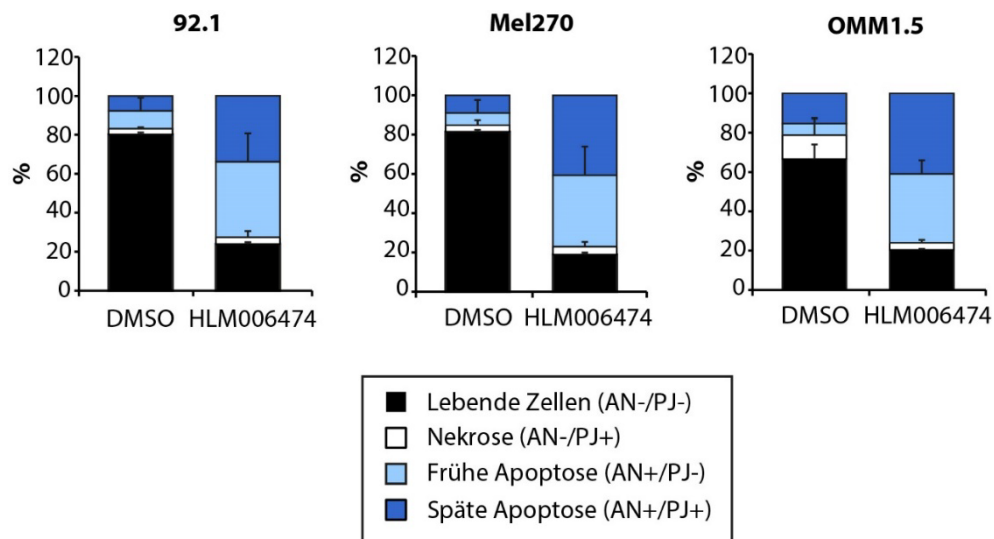


Abb. 43: Zelltodanalysen mittels Durchflusszytometrie nach Inkubation mit HLM006474

Anteil der lebenden (AN-/PJ-), nekrotischen (AN-/PJ+), früh- (AN+/PJ-) und spätapoptotischen (AN+/PJ+) Zellen nach Inkubation der UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 mit 50 µM HLM006474 oder DMSO (Kontrolle) für 96h, Mittelwerte \pm SD, $n = 3$. Analyse durch Annexin V (AN)-Propidiumjodid (PJ)-Färbung und anschließende durchflusszytometrische Messung.

In Western Blot-Analysen wurde außerdem gezeigt, dass die Inkubation mit HLM006474 zu einer Spaltung der Procaspasen 3 und 9 sowie des Substrates PARP in allen untersuchten UM-Zelllinien führte (Abb. 44). Die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-2 war in den Zelllinien Mel270 sowie OMM1.5 deutlich verringert und in diesen Zelllinien war auch eine Spaltung der Procaspase 3 nachweisbar. Dies sind weitere Hinweise, dass in den UM-Zelllinien Apoptose durch die Inkubation mit HLM006474 ausgelöst wurde. Da eine Aktivierung des p38-MAPK-Signalweges durch verschiedene pharmakologische Substanzen wie beispielsweise Furazolidon zu einem S-Phasen-Arrest führen und Apoptose induzieren kann [485], könnte die Aktivierung dieses Signalweges auch im Falle von HLM006474 möglicherweise bedeutend für die Zelltodinduktion sein. Ähnlich wie bereits zuvor im KM beobachtet wurde [448], erhöhte HLM006474 auch in allen drei untersuchten UM-Zelllinien die Phosphorylierung von p38 und führte somit zu einer Aktivierung des p38-MAPK-Signalweges. Außerdem wurde die Expression des DNA-Schadensmarkers γ -H2A.X stark in den Zelllinien 92.1 und Mel270 sowie gering in OMM1.5 nach Inkubation mit HLM006474 induziert. Anders als von Rouaud et al. im KM gezeigt wurde [448], konnte im UM keine Akkumulation von p53 nach HLM006474-Inkubation detektiert werden.

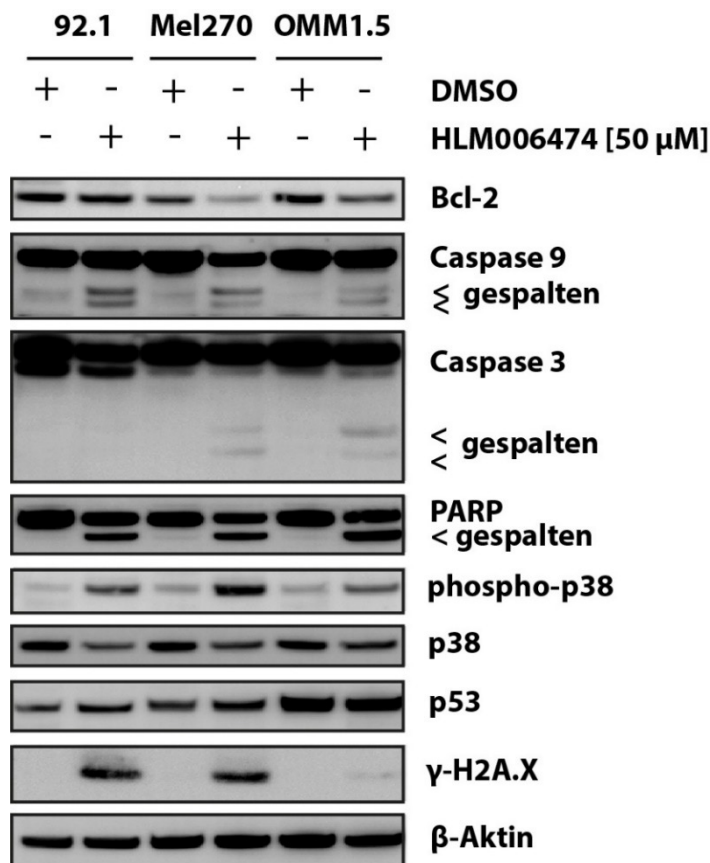


Abb. 44: Inkubation mit HLM006474 führt zu Apoptose, p38-Aktivierung und γ-H2A.X-Induktion

Proteinexpression von Bcl-2, Caspase 9, Caspase 3, PARP, phospho-p38, p38, p53 und des DNA-Schadensmarkers γ-H2A.X nach Inkubation mit 50 µM HLM006474 oder DMSO (Kontrolle) für 96h. β-Aktin diente als Ladekontrolle.

Zusammenfassend deuten die Daten darauf hin, dass die Inkubation mit HLM006474 in allen getesteten UM-Zelllinien durch Aktivierung des p38-Signalweges unabhängig von p53 zum Zellzyklusarrest sowie zur Apoptoseinduktion über den intrinsischen Apoptoseweg führt. Die Hemmung von E2F1 führt daher ähnlich wie die Hemmung von SOX10 und MITF mit siRNAs zum Zelltod von UM-Zellen. Somit könnte E2F1 ein vielversprechender, neuer potenzieller Kandidat für einen neuen Angriffspunkt einer pharmakologischen Therapie im UM sein.

4. Diskussion

Das UM entwickelt sich zwar wie das KM, ALM oder MUM aus den pigmentbildenden Zellen der Haut, den Melanozyten, unterscheidet sich jedoch sowohl tumorbiologisch als auch vom klinischen Verlauf her deutlich von diesen anderen Melanomsotypen [3, 40]. Analysen haben gezeigt, dass Transkriptionsfaktoren, die an der embryonalen Entwicklung der Melanozyten beteiligt sind, auch eine bedeutende Rolle im KM spielen [233, 288, 294, 296, 323, 324]. Hierzu zählt insbesondere der Transkriptionsfaktor SOX10. Er wird bereits in der frühen Phase der Embryonalentwicklung in den ersten Vorläuferzellen der Melanozyten in der NC exprimiert [227, 234, 235], ist dann während der Migration der Zellen aus dieser anatomischen Struktur in Richtung Dermis und Epidermis essenziell für das Überleben der Zellen [236] und persistiert auch in adulten Melanozyten [265-267]. Darüber hinaus wird SOX10 auch in benignen Nävi, kongenitalen Riesennävi sowie im KM exprimiert und fördert in letzterem das Überleben und die Invasion der Zellen [265, 266, 287, 288, 294, 295]. Im Kontext des UM gibt es bisher nur wenige Publikationen zu SOX10. SOX10 wird von der Mehrheit der UM exprimiert und kann daher als Marker bei der histologischen Diagnostik verwendet werden [268, 269]. Darüber hinaus wurde in der Literatur der Fall eines UM mit einer 20 Basenpaare umfassenden Deletion in Exon 4 des *SOX10*-Gens beschrieben, die zu einer Leserahmenverschiebung führte [316]. Die Autoren führten jedoch über die Mutationsanalyse hinaus keine weiteren Untersuchungen durch, sodass die funktionelle Relevanz des Transkriptionsfaktors im UM bisher unbekannt war.

Ziel dieser Arbeit war daher die Durchführung einer funktionellen Charakterisierung von SOX10 im UM, um damit einerseits zu einem besseren grundlegenden Verständnis dieses seltenen Tumors beizutragen und um andererseits von diesen Erkenntnissen mögliche neue systemische Therapiekonzepte ableiten zu können. Zu diesem Zweck wurden zuerst verschiedene UM-Zelllinien, öffentlich zugängliche Genexpressionsdaten des TCGA sowie Gewebeproben von UM-Metastasen auf die Expression von SOX10 hin untersucht und eine SOX10-Expression bei der Mehrheit der untersuchten Proben gefunden. Um die funktionelle Relevanz von SOX10 zu charakterisieren, wurde die SOX10-Expression in drei ausgewählten SOX10-hochexprimierenden UM-Zelllinien durch Transfektion mit spezifischen siRNAs gehemmt. Dies führte zu morphologischen Veränderungen und einer starken Verringerung der Zellviabilität. Die Analysen mittels Durchflusszytometrie bzw. Western Blot zeigten, dass es nach SOX10-Hemmung zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase mit einer Rb-Hypophosphorylierung und einer teilweisen Hochregulierung von p21 und p27 kam. Darüber hinaus führte die SOX10-Hemmung zu einem Anstieg der apoptotischen Zellen und einer vermehrten Spaltung der Procaspasen 3 und 9 sowie des Caspase 3-Substrates PARP. Die Analyse von pro- und antiapoptischen Proteinen der Bcl-2-Familie, einigen BH3-only-Proteinen sowie Bax und Bak ergab jedoch keine weiteren Hinweise auf den genauen Mechanismus der Apoptoseinduktion und die Expressionsanalyse des DNA-Schadensmarkers γ -H2A.X zeigte eine vermehrte Expression erst nach 24h. Das Tumorsuppressorprotein p53 ak-

kumulierte nicht nach SOX10-Hemmung, weshalb davon auszugehen ist, dass der Zelltod nach SOX10-Hemmung unabhängig von p53 induziert wird. Bei der Analyse verschiedener proliferationsfördernder Signalwege wurde wiederum eine zelllinienabhängige, unterschiedliche Aktivierung des ERK-, p38- und Akt-Signalweges nach SOX10-Hemmung gezeigt.

Da SOX10 ein Transkriptionsfaktor ist und daher direkt die Transkription anderer Gene beeinflusst, wurde in einem weiteren Teil dieser Arbeit untersucht, wie sich die Hemmung von SOX10 auf die Expression verschiedener bekannter Zielgene wie *PMP2*, *MIA*, und *MITF* sowie auf das Transkriptom der UM-Zellen auswirkt.

Durch die Hemmung von SOX10 kam es dabei zu weitreichenden Veränderungen des Transkriptoms, darunter einer kompensatorischen Hochregulierung von *SOX9*, was zuvor auch im KM beobachtet worden war [296]. Insbesondere der Transkriptionsfaktor *MITF* wurde in den SOX10-exprimierenden Zellen ebenfalls stark exprimiert und war nach SOX10-Hemmung deutlich herabreguliert. Ein weiterer Fokus dieser Arbeit lag daher auf der funktionellen Analyse von *MITF* im UM. Die Hemmung von *MITF* durch spezifische siRNAs führte ähnlich wie die Hemmung von SOX10 zu einer schnellen Abnahme der Zellviabilität in zwei der drei untersuchten Zelllinien. In diesen kam es ebenfalls zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase des Zellzyklus, einer Rb-Hypophosphorylierung, Verringerung der Cyclin D1- und p27-Expression, Induktion der p21-Expression sowie zur Apoptose über den intrinsischen Apoptoseweg. Wie schon nach der SOX10-Hemmung änderte sich die p53-Proteinexpression nach *MITF*-Hemmung nicht, sodass auch hier von einem Zellzyklusarrest unabhängig von p53 ausgegangen werden kann. Interessanterweise konnte eine ektope Expression von *MITF* die zytotoxischen Effekte der SOX10-Hemmung in den analysierten Mel270-Zellen abschwächen, was dafür spricht, dass *MITF* zentral an der Vermittlung der überlebensfördernden Effekte von SOX10 im UM beteiligt ist.

Da derzeit wirksame Therapieoptionen insbesondere für UM-Patienten im fortgeschrittenen Stadium nur begrenzt verfügbar sind, wurden im letzten Teil der Arbeit die zuvor gewonnenen Erkenntnisse für die Identifizierung neuer potenzieller Kandidaten genutzt, die sich für eine zielgerichtete Therapie des UM eignen könnten. Da derzeit noch kein Inhibitor bekannt ist, der SOX10 direkt hemmen kann [423], könnten stattdessen möglicherweise von SOX10 regulierte Gene, die eine ähnliche Funktion aufweisen und leichter pharmakologisch gehemmt werden können, anstelle von SOX10 selbst für eine mögliche zielgerichtete Therapie eingesetzt werden.

Basierend auf RNA-Sequenzierungsdaten nach SOX10-Hemmung und einem bereits existierenden SOX10-Protein-Interaktionsnetzwerk wurde in einem bioinformatischen Ansatz ein Netzwerk für diese Zielstrukturselektion („*target selection network*“) generiert. Anschließend wurden mit dessen Hilfe Kandidaten identifiziert, deren Genexpression nach SOX10-Hemmung einerseits herabreguliert war und die andererseits pharmakologisch über *small molecule*-Inhibitoren oder blockierende bzw. neutralisierende Antikörper gehemmt werden können und daher für eine potenzielle Systemtherapie im UM mög-

licherweise geeignet sind. Für eine erste *in vitro*-Validierung wurden dabei die vier Kandidaten *E2F1*, *EZH2*, *TFRC* und *FGF9* ausgewählt. Hierbei zeigte sich, dass besonders die Hemmung des Transkriptionsfaktors E2F1 durch den *small molecule*-Inhibitor HLM006474 zu einer deutlichen Abnahme der Zellviabilität, einer Aktivierung des p38-MAPK-Signalweges, Zellzyklusarrest in der S-Phase und letztlich zum Zelltod durch Apoptose führte. Diese ersten Ergebnisse zeigen, dass E2F1 möglicherweise ein Kandidat für eine zielgerichtete Therapie im UM wäre und ein möglicher Mediator der Effekte ist.

Insgesamt liefert diese Arbeit nicht nur neue Erkenntnisse über die Biologie des UM und insbesondere die NC-Transkriptionsfaktoren im Kontext dieser Tumorentität, sondern demonstriert auch das Potenzial bioinformatischer Ansätze bei der Identifizierung neuer therapeutischer Ziele in der Krebstherapie. Damit zeigt diese Arbeit Möglichkeiten für eine translationale Anwendung des Wissens aus der tumorbiologischen Grundlagenforschung bei der Entwicklung neuer Therapieoptionen insbesondere für seltene Tumorerkrankungen auf.

4.1 Die funktionelle Rolle von SOX10 im Uveamelanom

4.1.1 Basale Expression von SOX10 im Uveamelanom

Die Untersuchung der SOX10-Gen- und Proteinexpression ergab eine deutliche SOX10-Expression in sieben der neun analysierten UM-Zelllinien, in den Genexpressionsdaten des TCGA-Datensatzes „*Ocular Melanomas*“ ($n = 80$) und in 37 von 42 immunhistochemisch untersuchten UM-Metastasen (88,1 %). Die weit verbreitete Expression in UM-Zelllinien, Primärtumoren und Metastasen bestätigt die Beobachtungen zweier früherer Arbeiten, die bei IHC-Analysen von Tumormaterial eine SOX10-Kernfärbung in allen der insgesamt 60 untersuchten UM-Primärtumoren nachweisen konnten [268, 269]. SOX10 scheint dabei ein besonders sensibler diagnostischer Marker für das UM zu sein. Der melanozytäre Marker gp100, der durch Färbungen mit dem Antikörperklon HMB45 detektiert werden kann [486], wurde in der erwähnten Studie von Alghamdi et al. ebenfalls untersucht; dabei wurde gp100 im Gegensatz zu SOX10 (100 % Positivität) nur in 36 von 38 UM (94,7 %) exprimiert [268]. Eine weitere Arbeit konnte zeigen, dass UM von den seltenen benignen APCE, die aus Zellen des pigmentierten Ziliarkörperepithels entstehen, histologisch zuverlässig anhand der SOX10-Expression unterschieden werden können, da APCE im Gegensatz zu UM kein SOX10 exprimieren [269]. Entwicklungsgeschichtlich ist das Epithel des Ziliarkörpers eng mit dem RPE verwandt [487], wohingegen UM aus melanozytären Zellen entstehen und daher entwicklungsgeschichtlich von NC-Zellen abstammen [216, 231]. Nichtsdestotrotz können APCE auch melanozytäre Marker wie S100, Melan A oder MITF exprimieren, was die diagnostische Unterscheidung zum UM in der Praxis erschwert [488]. Da SOX10 nur in Zellen exprimiert wird, die aus Vorläuferzellen aus der NC stammen [250-252], liegt es nahe, dass sich SOX10 als Marker für die eindeutige Unterscheidung des UM und APCE eignet.

Die beiden UM-Zelllinien Mel285 und Mel290 exprimierten kein SOX10 und unterschieden sich damit deutlich von den anderen untersuchten UM-Zelllinien. In früheren Studien von Griewank et al. bzw. van Dinten et al. konnte in diesen beiden Zelllinien keine Expression der melanozytären Marker Melan A, gp100, TYR, TYRP1 und DCT nachgewiesen werden [320, 489]. Die Expression dieser Proteine wird maßgeblich durch MITF beeinflusst, welches wiederum ein direktes Zielgen von SOX10 ist [261, 262]. Darüber hinaus werden TYR [270] und DCT [272, 273] direkt transkriptionell durch SOX10 reguliert. Somit könnte das in Griewank et al. und van Dinten et al. beschriebene Nichtvorhandensein der melanozytären Marker dieser beiden Zelllinien durch die fehlende SOX10-Expression erklärt werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang, dass Mel285 und Mel290 im Gegensatz zu den anderen untersuchten Zelllinien keine Mutationen in den Genen *GNAQ* und *GNA11* aufweisen [320, 325], die insgesamt bei etwa 80 % aller UM gefunden werden [71, 76]. Jager et al. spekulierten daher, dass die durch Mutationen in *GNAQ* bzw. *GNA11* aktivierten Signalwege die Expression von Pigmentierungsmarkern im UM beeinflussen könnten [325]. Bislang gibt es jedoch keine Publikationen, die einen Zusammenhang zwischen *GNAQ*- bzw. *GNA11*-Mutationen und der SOX10-Expression beschreiben. Darüber hinaus wurden in den Zelllinien Mel285 und Mel290 auch keine Mutationen in den im UM häufig mutierten Genen *BAP1* [24], *EIF1AX* und *SF3B1* [97] gefunden. Da in den Zelllinien weder die für das UM charakteristischen Mutationen noch die üblichen melanozytären Marker exprimiert wurden, stellten Jager et al. die Frage, ob es sich bei diesen Zelllinien überhaupt um UM-Zelllinien handle [325]. Die Ergebnisse ihrer *short tandem repeats*-Analyse von archiviertem Tumorgewebe der Patienten und den daraus generierten Zelllinien legen aber nahe, dass Primärtumor und Zelllinien vom gleichen Spender stammen; ebenso sprechen chromosomale Aberrationen wie ein teilweiser Verlust von Chr. 3 (3p26-pter) und ein Zugewinn von Chr. 8 für die Abstammung von einem bösartigen Tumor [325].

4.1.2 Auswirkungen der SOX10-Hemmung auf Zellviabilität, Zellzyklusprogression und Apoptose

Um die funktionelle Relevanz von SOX10 zu charakterisieren, wurde die Expression von SOX10 in drei ausgewählten SOX10-hochexprimierenden Zelllinien durch Transfektion mit spezifischen siRNAs gehemmt. Die molekularbiologischen Analysen zeigten hierbei, dass die Hemmung von SOX10 zu einer deutlichen Reduktion der Zellviabilität, einem G1-Arrest des Zellzyklus sowie einer starken Apoptoseinduktion führten, und dass SOX10 somit essenziell für das Überleben von UM-Zellen ist. Eine verringerte Zellviabilität nach siRNA-vermittelter Hemmung der SOX10-Expression wurde zuvor bereits in KM-Zelllinien durch Graf et al. beobachtet [295]. Ebenfalls konnte in KM-Zelllinien nach SOX10-Hemmung mittels siRNAs oder shRNAs ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase des Zellzyklus sowie ein Anstieg an Annexin V-positiven Zellen beobachtet werden [288, 294, 295]. Diese Befunde legen nahe, dass SOX10 trotz der deutlichen tumorbiologischen und klinischen Unterschiede im UM eine ähnliche Funktion wie im KM ausübt. Trotzdem traten auch einige Unterschiede im Vergleich zum KM auf. Bei der Untersuchung der Zellzyklusprogression nach SOX10-Inhibition fiel etwa auf, dass die Abnahme

der Zellviabilität bei zwei der drei untersuchten UM-Zelllinien schon nach 48h deutlich ausgeprägter war als bei der bereits von Graf et al. untersuchten KM-Zelllinie 1205Lu [295]. Der Grund für die frühe und starke Abnahme der Zellviabilität von 92.1 und Mel270 nach SOX10-Hemmung könnte an einer noch stärkeren Abhängigkeit der Zellen von SOX10 liegen. Die Zellviabilität der Zelllinie OMM1.5 verringerte sich ähnlich wie die der 1205Lu-Zellen langsamer nach SOX10-Hemmung als in den beiden anderen untersuchten Zelllinien. Dafür könnte es mehrere Gründe geben: Einerseits lag die Hemmeffizienz 24h nach der Transfektion der Zelllinie OMM1.5 nur bei etwa 50 %, während sie in den anderen Zelllinien zwischen 30 % und 40 % betrug. Die Ergebnisse der in 3.2.4 dargestellten Transfektionszeitreihe zeigten, dass die SOX10-Proteinexpression 12h nach der Transfektion in den Zelllinien 92.1 und Mel270 etwas und nach 24h deutlich herabreguliert wurde; nach 24h konnte allerdings erst eine erste Verringerung der SOX10-Expression bei der Zelllinie OMM1.5 festgestellt werden. Nach 48h konnten dann keine Unterschiede zwischen den drei Zelllinien mehr festgestellt werden. Somit scheint die Hemmung der SOX10-Expression in der Zelllinie OMM1.5 nach der Transfektion etwas verzögerter einzutreten als in den beiden anderen untersuchten UM-Zelllinien 92.1 und Mel270. Abgesehen von diesem Befund könnten die OMM1.5-Zellen eine Abnahme der SOX10-Expression jedoch möglicherweise besser kompensieren, da sie im Vergleich zu den 92.1 und Mel270 sowohl eine höhere basale Aktivität des ERK- als auch des Akt-Signalweges aufwiesen (siehe Abschnitt 3.2.5), die beide das Überleben von Zellen fördern [403, 404, 413, 414]. Auffällig war bei den Experimenten zur Zellviabilität auch, dass diese bereits durch die Transfektion mit der Kontroll-siRNA beeinträchtigt wurde im Vergleich zu den nur mit dem Transfektionsreagenz behandelten Zellen, was jedoch ein häufig zu beobachtendes Phänomen bei Transfektionsexperimenten ist [490].

Zellen können durch Stress in einen als Seneszenz bezeichneten Zustand gelangen, bei dem es zu einem irreversiblen Wachstumsarrest und charakteristischen Veränderungen der Zellmorphologie wie etwa dem Auftreten von vergrößerten, flachen Zellen kommt [491, 492]. Cronin et al. berichteten, dass die Hemmung von SOX10 mittels shRNA zur Induktion von Seneszenz in KM-Zellen führt [294]. Allerdings scheint dies nicht bei allen kutanen KM-Zelllinien der Fall zu sein, da etwa Graf et al. dieses Phänomen bei den von ihnen untersuchten Zelllinien wie etwa 1205Lu nicht beobachten konnten [295]. Die in dieser Arbeit untersuchten UM-Zelllinien zeigten nach SOX10-Hemmung ebenfalls keine morphologischen Zeichen, die auf eine Seneszenzinduktion hindeuten würden, sodass weitere Seneszenzmarker wie etwa eine erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität oder seneszenzassoziierte Heterochromatin-Foci [492] in den Zellen nicht untersucht wurden.

Interessanterweise zeigten sich bei den in dieser Arbeit untersuchten HM trotz guter Transfektionseffizienz auch 96h nach der Transfektion mit SOX10-spezifischen siRNAs keine Verringerung der Zellviabilität. Ebenso wurden auch keine morphologischen Veränderungen oder Anzeichen einer Apoptose bei den durchflusszytometrischen Analysen festgestellt. HM scheinen somit den Verlust von SOX10 besser kompensieren zu können als die untersuchten UM-Zelllinien. Welche Signalwege hierfür konkret aktiviert werden, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht. Insgesamt sind diese Befunde

jedoch von Interesse in Anbetracht einer möglichen therapeutischen Inhibition von SOX10 zur Behandlung des UM und den damit möglicherweise verbundenen unerwünschten Auswirkungen auf SOX10-exprimierendes Nichttumorgewebe.

Die Apoptose ist der zentrale Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Zellhomöostase, der sowohl während der Entwicklung als auch im adulten Organismus eine wichtige Rolle spielt [395, 396]. Während der Apoptose werden Zellen über Signalkaskaden dazu gebracht, in einem kontrollierten und koordinierten Prozess zu sterben, ohne eine Entzündungsreaktion auszulösen [395, 396]. Die Apoptose kann sowohl durch exogene Einflüsse wie das Binden von Liganden wie Fas oder TNF- α an die entsprechenden Todesrezeptoren, gefolgt von der Aktivierung der Caspase 8, ausgelöst werden (extrinsischer Weg), als auch durch endogene Einflüsse wie etwa DNA-Schäden oder zellulärem Stress, was zur Aktivierung des mitochondrialen, intrinsischen Weges mit Aktivierung der Caspasen 9 und 3 führt [396, 397]. Die durchflusszytometrischen und Western Blot-Analysen zeigten einen deutlichen Anstieg des Anteils der apoptotischen Zellen nach SOX10-Hemmung in den untersuchten UM-Zelllinien, der bereits nach 24h nachweisbar war. Am sensitivsten auf die SOX10-Hemmung schienen hierbei die beiden Zelllinien 92.1 und Mel270 zu reagieren, die beide aus UM-Primärtumoren generiert wurden [325]. In diesen zeigten sich bereits 24h und 48h nach der siRNA-Transfektion deutliche Effekte. In der UM-Zelllinie OMM1.5 und der ebenfalls untersuchten KM-Zelllinie 1205Lu setzte die Apoptose dagegen verzögert ein. Diese Zelllinien wurden beide aus Metastasen generiert [325, 331]. Ob jedoch ein kausaler Zusammenhang zwischen der Lokalisation des ursprünglichen Tumors bzw. dem Tumorstadium und der Sensitivität gegenüber der SOX10-Hemmung besteht und ob SOX10 in Metastasen keine solch ausgeprägte Rolle für das Überleben der Tumorzellen spielt wie in Primärtumoren, bleibt spekulativ. Versuche mit anderen UM-Zelllinien, die ebenfalls aus Metastasen generiert wurden, könnten hierauf aber möglicherweise neue Hinweise geben. Einschränkend ist jedoch anzumerken, dass die Zelllinien OMM1.5 und 1205Lu nicht komplett unempfindlich gegen die SOX10-Hemmung waren, da der Zelltod nach Transfektion mit spezifischen siRNAs in diesen Zellen nur später einsetzte, aber nicht komplett ausblieb, wie die Daten aus den Zellviabilitätsassays und den Durchflusszytometrie-Analysen zeigten. Um den Mechanismus der Apoptoseinduktion nach SOX10-Hemmung genauer zu untersuchen, wurde die Aktivierung der Caspasen 3 und 9 auf Proteinebene analysiert. In den Zellen kam es zur Spaltung der Procaspasen 3 und 9, was auf eine Aktivierung des intrinsischen, mitochondrialen Apoptoseweges hindeutet. Darüber hinaus konnte die Behandlung der Zellen mit dem Caspase-3-Inhibitor Z-DEVD-FMK den Zelltod nach SOX10-Hemmung teilweise verhindern, was ein weiteres Indiz dafür ist, dass die Inhibition von SOX10 zum Zelltod durch Apoptose führt. Um weitere dabei beteiligte Faktoren zu identifizieren, wurde die Expression einer Auswahl von pro- und antiapoptotischen Proteinen wie Bax, Bak und Mitglieder der Bcl-2-Familie nach 48h SOX10-Hemmung auf Proteinebene untersucht. Anders als erwartet zeigten sich hierbei jedoch kaum Unterschiede, sodass nicht näher geklärt werden konnte, wie genau es zur Apoptoseinduktion über den intrinsischen Weg kam.

DNA-Schäden wie etwa ein dsDNA-Bruch sind eine der Hauptursachen, wieso es zur Induktion eines Zellzyklusarrests kommt [385]. Durch den Stop der Zellzyklusprogression soll dabei sichergestellt werden, dass der beschädigte DNA-Abschnitt erst durch entsprechende Reparaturmechanismen repariert wird, bevor die Zellteilung von staten geht und es somit nicht zu chromosomalen Aberrationen kommt [385]. Die Reparatur von dsDNA-Brüchen kann entweder über die homologe Rekombination oder das *non-homologous end joining* (NHEJ) erfolgen [493]. Um die dabei beteiligten Reparaturenzyme an die DNA-Bruchstellen zu lotsen, werden diese durch Phosphorylierung des Histons H2A.X (γ -H2A.X) markiert, was durch Western Blot-Analysen oder IHC-Färbungen nachgewiesen werden kann [400, 493]. Nach SOX10-Hemmung wurde bei den untersuchten UM-Zelllinien eine erhöhte γ -H2A.X-Expression im Western Blot detektiert. Dies deutet darauf hin, dass es nach der Inhibition von SOX10 tatsächlich zu dsDNA-Brüchen kommt. Es stellte sich aber die Frage, ob der Verlust der SOX10-Expression die Stabilität bzw. Reparaturfähigkeit der DNA unmittelbar negativ beeinflusst, indem etwa die Expression bestimmter Reparaturenzyme des NHEJ herabreguliert wird oder ob es sich um einen sekundären Effekt handelte. Im Laufe der Apoptose kommt es in den späteren Phasen zur Fragmentierung der DNA; diese DNA-Fragmente können auch eine vermehrte γ -H2A.X-Expression induzieren [494]. Anders als etwa bei dsDNA-Brüchen durch ionisierende Strahlung, wo dies auch durch die Kinasen ATM und ATR geschehen kann, wird die Phosphorylierung von H2A.X während der späten Phase der Apoptose ausschließlich durch DNA-PK vermittelt, welche durch Autophosphorylierung an Ser2056 aktiviert wird [495]. Die Aktivierung der DNA-PK wurde in dieser Arbeit nicht untersucht, könnte jedoch durch Nachweis des phosphorylierten Proteins in Western Blot-Analysen erfolgen und damit möglicherweise noch genauere Einblicke in die Genese der dsDNA-Brüche nach SOX10-Hemmung liefern. Die Ergebnisse der durchgeführten Transfektionszeitreihe zeigten allerdings deutlich, dass die SOX10-Proteinexpression 12h nach der Transfektion in den Zelllinien 92.1 und Mel270 etwas verringert, nach 24h jedoch deutlich herabreguliert wurde; nach 24h konnte auch erstmals eine Verringerung der SOX10-Expression in der Zelllinie OMM1.5 festgestellt werden. Nach 48h waren keine Unterschiede zwischen den Zelllinien bezüglich der SOX10-Proteinexpression erkennbar. Eine Spaltung der Procaspase 3 sowie von PARP konnte in den Mel270-Zellen bereits nach 12h, die Induktion der γ -H2A.X-Expression jedoch erst nach 24h nachgewiesen werden. Zusammengefasst deutet dies darauf hin, dass es durch die verringerte SOX10-Expression zuerst zur Apoptoseinduktion und infolgedessen zu dsDNA-Brüchen und einer erhöhten γ -H2A.X-Expression kommt. Somit scheint es sich bei den detektierten dsDNA-Brüchen eher um einen sekundären Effekt durch die DNA-Fragmentierung im Rahmen der späten Apoptose zu handeln, der jedoch nicht primär ursächlich für den Zellzyklusarrest und den Zelltod zu sein scheint.

Das Tumorsuppressorprotein p53 ist ein zentraler Mediator der Zellzyklusregulation am Übergang von der G1- in die S-Phase, der auch die Apoptoseinduktion fördern kann [386, 387]. Analysen von Sun et al. haben gezeigt, dass das für p53 codierende *TP53*-Gen in UM-Zellen nicht mutiert und p53 in den Zellen funktionsfähig ist [496]. Im Falle der untersuchten UM-Zelllinien führte die Hemmung von SOX10 zu keiner Akkumulation

von p53. Somit scheint es in den Zellen auf einem p53-unabhängigen Weg zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase zu kommen. Eine ähnliche Beobachtung wurde auch im KM gemacht, wo in KM-Zelllinien ebenfalls keine Veränderung der p53-Expression nach SOX10-Inhibition festgestellt werden konnte [294].

4.1.3 Analyse verschiedener Signaltransduktionswege nach SOX10-Hemmung

Da die Hemmung von SOX10 in UM-Zellen unabhängig vom Tumorsuppressor p53 zum Zellzyklusarrest und anschließenden Zelltod führte, müssen andere Signalwege an der Vermittlung dieses Effekts beteiligt sein. Sowohl die MAPK- als auch die PI3K/Akt-Achse ist zentral an der Förderung der Proliferation und des Überlebens von Zellen beteiligt [403, 404, 413, 414]. Daher könnte eine Analyse der Aktivität des ERK-, p38- und Akt-Signalweges Aufschluss über eine mögliche Beteiligung an der Induktion des Zellzyklusarrests und der Apoptose nach SOX10-Hemmung geben. Die drei untersuchten UM-Zelllinien wiesen alle Unterschiede der basalen Aktivität der drei Signalwege auf. In der Zelllinie 92.1 war vor allem der ERK-Signalweg aktiv, während in der Zelllinie Mel270 der p38-Signalweg und in der Zelllinie OMM1.5 alle drei untersuchten Signalwege aktiv waren. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass unterschiedliche Mutationen in den typischerweise beim UM veränderten Genen die Aktivität dieser Signalwege beeinflusst. Ein Blick auf bereits publizierte Daten zum Mutationsprofil der Zellen zeigt, dass alle drei UM-Zelllinien eine Mutation im Gen *GNAQ* aufweisen: Bei der UM-Zelllinie 92.1 ist dies die Mutation *GNAQ*^{Q209L} und bei den beiden UM-Zelllinien Mel270 und OMM1.5 die Mutation *GNAQ*^{Q209P}, da beide UM-Zelllinien aus einem Lokalrezidiv des Primärtumors bzw. einer Lebermetastase desselben Patienten generiert wurden [320]. Zusätzlich zur *GNAQ*-Mutation weist die UM-Zelllinie 92.1 auch eine homozygote *EIF1AX*^{G6D}-Mutation auf [48, 329], jedoch keine Mutationen in *BAP1* oder *SF3B1* [325]. In den Zelllinien Mel270 und OMM1.5 wurden keine Mutationen in den Genen *BAP1*, *EIF1AX* und *SF3B1* nachgewiesen [325]. Angesichts dieser geringen Unterschiede ist es jedoch eher unwahrscheinlich, dass die unterschiedlichen Signalwegaktivitäten durch Mutationen der typischerweise im UM veränderten Gene begründet ist. Die beobachtete auffällig starke ERK-Aktivität der KM-Zelllinie 1205Lu wurde bereits in früheren Publikationen von Smalley et al. beschrieben und ist sehr wahrscheinlich auf die *BRAF*^{V600E}-Mutation dieser Zelllinie und die daraus resultierende dauerhafte Aktivierung des BRAF-MEK-ERK-Signalweges zurückzuführen [326, 328].

Da die Hemmung von SOX10 sowohl zum Zellzyklusarrest als auch zur Apoptose führte, war insbesondere die Analyse der Aktivität des p38-Signalweges in den UM-Zelllinien von Interesse. Dieser Signalweg wird vor allem durch Stress aktiviert und ist unter anderem an der Regulation der Apoptose- und Zellzyklusarrestinduktion sowie der Zelldifferenzierung beteiligt [407-409]. So kann es beispielsweise nach dsDNA-Brüchen zu einer Akkumulation der α -Isoform von p38 im Zellkern kommen [410] und die Aktivierung von p38 kann zum Arrest am Übergang von der G1- in die S-Phase führen [409]. Bei der Proteinexpressionsanalyse konnte eine leichte Erhöhung der p38-Phosphorylierung 24h

nach der Transfektion mit SOX10-spezifischen siRNAs beobachtet werden. Für den Progress in die S-Phase ist eine niedrige p38-Aktivität notwendig, da es andernfalls zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase kommt [497]. Dies liegt einerseits an der Wirkung von p38 auf Rb und E2F, da p38 den Tumorsuppressor Rb am N-terminalen Ende phosphorylieren kann und damit an anderen Stellen als die CDKs, wodurch die Bindung an die E2F-Transkriptionsfaktoren verstärkt wird [498]. Die p38-Aktivierung reduziert außerdem die Expression von Cyclin D1 und trägt so zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase bei [499], indem es einerseits den transkriptionellen Repressor *HMG-box protein 1* (HBP1) durch Phosphorylierung stabilisiert und damit die Transkription des für Cyclin D1 codierenden Gens *CCND1* hemmt [500], und andererseits Cyclin D1 an Thr286 phosphoryliert, was die Ubiquitinierung und letztlich den Abbau des Proteins fördert [501]. Daher ist es denkbar, dass der nach SOX10-Hemmung beobachtete G1-Arrest durch eine Aktivierung von p38 mit vermittelt worden sein könnte. Um diese Theorie zu untermauern, könnten in Folgeexperimente Rescue-Versuche mit einem p38-Inhibitor wie etwa Adezmapimod (SB203580) [502] durchgeführt werden, um zu testen, ob eine Hemmung der p38-Aktivität die Apoptoseinduktion nach SOX10-Inhibition verringern kann. Ebenfalls interessant ist in diesem Zusammenhang, dass es zu einer geringfügigen Reduktion der Akt-Phosphorylierung nach SOX10-Hemmung kam. Da Akt pro-proliferativ wirkt [413, 414], könnte eine geringere Aktivierung des Akt-Signalweges zum beobachteten Phänotyp nach SOX10-Hemmung beitragen.

Die ursprünglich aus einer Lebermetastase generierte Zelllinie OMM1.5 wies als einzige der drei untersuchten UM-Zelllinien eine hohe basale Akt-Phosphorylierung auf und unterschied sich damit auch von der Zelllinie Mel270, die aus dem Primärtumor desselben Patienten generiert wurde [320, 325]. Man könnte daher spekulieren, dass eine Aktivierung des Akt-Signalweges zum Krankheitsprogress des UM beigetragen haben könnte. In der Literatur gibt es hierfür Hinweise, die diese Hypothese unterstützen. Saraiva et al. konnten bei der Analyse von 34 UM-Primärtumoren eine Akt-Phosphorylierung in 55,5 % der Proben nach primärer Enukleation und in 56,2 % nach initialer Bestrahlung feststellen und einen signifikanten Zusammenhang mit einem höheren Metastasierungsrisiko aufzeigen [415]. Interessant ist in diesem Zusammenhang zu erwähnen, dass es durch die Hemmung von GNAQ und GNA11 durch Transfektion von spezifischen siRNAs sowohl in *GNAQ/GNA11*-wt als auch mutierten UM-Zellen zu keiner Veränderung der Akt-Signalwegaktivität kommt [79] und *GNAQ*-Mutationen keinen Effekt auf die Aktivierung von mTOR haben, welches funktionell eng mit dem Akt-Signalweg verbunden ist [503].

Eine weitere mögliche Ursache für eine dauerhafte Aktivierung des Akt-Signalweges könnten inaktivierende Mutationen des Tumorsuppressors *PTEN* sein. PTEN dephosphoryliert den *second messenger* PIP₃, welches durch die PI3K-vermittelte Phosphorylierung aus PIP₂ generiert wird, und ist somit ein negativer Regulator des PI3K/Akt-Signalweges [413, 419]. Eine Analyse von 75 UM-Primärtumoren zeigte, dass es bei 72,5 % der Proben zu einem Verlust der Heterozygosität von Chr. 10q23 kam, wo das *PTEN*-Gen lokalisiert ist [504]. Etwa 16 % der untersuchten Tumoren zeigten einen kompletten Verlust von PTEN sowie weitere 43 % eine verringerte PTEN-Expression im Vergleich

zu gesundem Retinagewebe [504]. Der Verlust von PTEN war in dieser Kohorte auch mit einem schlechteren OS assoziiert [504]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PTEN-Expression in den Zelllinien nicht untersucht, allerdings fanden Naus et al. bei einer früheren Analyse keine Mutationen oder Unterschiede in der PTEN-Expression in neun untersuchten UM-Zelllinien, darunter auch in den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien 92.1 und Mel270 [505]. Griewank et al. fanden ebenfalls eine intakte PTEN-Expression in allen von ihnen analysierten *GNAQ*- und *GNA11*-mutierten UM-Zelllinien, darunter auch die in dieser Arbeit untersuchten Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 [320]. Dies spricht eher dafür, dass die höhere basale Akt-Aktivität in der Zelllinie OMM1.5 vermutlich nicht durch einen Verlust der PTEN-Aktivität verursacht wird, sondern andere noch unbekannte Faktoren eine Rolle spielen.

Interessanterweise traten einige Aktivitätsunterschiede von ERK, p38 und Akt zwischen den unbehandelten und den mit der Kontroll-siRNA behandelten Zellen auf. So konnte beispielsweise in den mit der Kontroll-siRNA transfizierten Mel270-Zellen eine ERK-Phosphorylierung nachgewiesen werden, obwohl dies basal nicht der Fall war; ähnliches konnte bezüglich der p38-Phosphorylierung in der Zelllinie 92.1 sowie Akt-Phosphorylierung in den Zelllinien 92.1 und Mel270 gefunden werden. Die Beobachtung, dass es nach der Transfektion von siRNAs zu einem Anstieg der Genexpression kommt, wurde bereits in früheren Studien ausführlich untersucht [506, 507]. Durch die Transfektion von siRNAs kann es als Nebeneffekt zu einer Reduzierung der miRNA-Menge in der Zelle und infolge dessen zu einer Beeinflussung der mRNA-Expression unabhängig von der eigentlichen Ziel-mRNA kommen [506, 507]. Die miRNA-Reduktion ist in diesem Zusammenhang abhängig von der Dosis der transfizierten siRNA und wird über das Protein Ago2 vermittelt, da die transfizierten siRNAs mit den endogenen miRNAs um die Bindung an Ago2 konkurrieren [507]. Konkret führte die Verringerung der miRNAs zu einer Hochregulierung der mRNAs, die eigentlich Ziel dieser miRNAs wären, da die regulatorische Funktion der miRNAs nicht mehr ausgeübt werden kann [506, 507]. Durch diese Veränderungen der Genexpression könnte es also nicht nur zu Unterschieden bezüglich der Expression von ERK, p38 und Akt kommen, sondern möglicherweise auch zu deren Phosphorylierung und damit Aktivitätsänderung. Auf der anderen Seite kann es jedoch auch sekundär zu einer vermehrten posttranslationalen Degradierung von Proteinen durch eine verstärkte Expression von Proteasen infolge aberranter miRNA-Spiegel kommen [507]. Allerdings haben nicht nur siRNAs, die auf ein bestimmtes Gen abzielen, eine Wirkung, sondern auch Kontroll-siRNAs und die verwendeten Transfektionsreagenzien [490]. Kleefeldt et al. konnten beispielsweise in murinen Fibroblasten zeigen, dass das Transfektionsreagenz Lipofectamine® 2000 die Expression mehrerer von den Autoren als „steady-state mRNAs“ bezeichnete Gene wie etwa *Tgfb1-3* und *Tgfb1-3* im Vergleich zu den unbehandelten Zellen beeinflusste; ähnliches konnte nach der Transfektion mit mehreren kommerziell erhältlichen Kontroll-siRNAs beobachtet werden [490]. Daher wäre denkbar, dass die in dieser Arbeit verwendete Kontroll-siRNA und das Transfektionsreagenz Lipofectamine® RNAiMAX möglicherweise bereits die Aktivität der untersuchten Signalwege *per se* moduliert haben.

Die simultane Analyse mehrerer Signalwege mittels Phosphokinase-Array 24h nach der Transfektion mit SOX10-spezifischen siRNAs kam zu dem Ergebnis, dass es zwar zu Aktivitätsveränderungen einiger Proteine bzw. Signalwege kommt, diese Veränderungen insgesamt aber eher schwach ausgeprägt waren und sich kein eindeutiges Aktivierungsmuster herauskristallisierte. Daher konnte mit dieser Analyse kein einzelner Signalweg identifiziert werden, welcher primär durch die SOX10-Hemmung verändert wird. Das Ergebnis des Phosphokinase-Arrays könnte vielmehr als vergleichsweise unkontrollierter Versuch der Kompensation des SOX10-Verlusts gedeutet werden. Limitierend ist in diesem Fall jedoch anzumerken, dass der Phosphokinase-Array nur einmal 24h nach der Transfektion durchgeführt wurde, da zu diesem Zeitpunkt einerseits bereits eine deutlich reduzierte SOX10-Expression und andererseits erste Anzeichen der Apoptoseinduktion wie beispielsweise die Spaltung von PARP und Procaspase 3 in der Zelllinie Mel270 nachgewiesen werden konnten. Da die SOX10-Expression zumindest bei einem Teil der Zelllinien jedoch bereits 12h nach der siRNA-Transfektion vermindert war, ist nicht auszuschließen, dass eine Analyse zu einem anderen Zeitpunkt weitere Hinweise auf Veränderungen der Signalwege liefern würde.

4.1.4 Analyse der globalen Genexpressionsveränderungen mittels RNA-Sequenzierung

Die bioinformatische Auswertung der RNA-Sequenzierungsdaten verdeutlichte eindrücklich die weitreichenden transkriptionellen Veränderungen, die durch die SOX10-Hemmung in den UM-Zelllinien verursacht wurden. Insgesamt wurden 5.914 herabregulierte und 6.537 hochregulierte Gene nach SOX10-Hemmung gefunden, aus denen nach dem Abgleich mit bereits publizierten SOX10-ChIP-Seq-Daten aus Melanozyten von Fufa et al. [346] 395 potenzielle SOX10-Zielgene identifiziert wurden. Als Limitation ist hier zu nennen, dass es sich bei diesen Vergleichszellen nicht um uveale Melanozyten handelte, deren Transkriptom sich möglicherweise von ihrem kutanen Gegenpart unterscheiden kann. Allerdings waren zum Zeitpunkt der Analyse im Jahr 2019 keine publizierten SOX10-ChIP-Seq-Daten verfügbar, weshalb für die Analyse auf die Daten von normalen Melanozyten zurückgegriffen wurde.

Transkriptionsfaktoren können eine immense Anzahl an Genen transkriptionell regulieren, wie etwa Sharov et al. in ihrer Arbeit anhand des Transkriptionsfaktors KLF15 zeigen konnte, für den mithilfe mehrerer ChIP-Seq-Datensets 4.796 regulierte Zielgene in embryonalen Stammzellen identifiziert werden konnten [508]. Die große Anzahl an differenziell exprimierten Genen nach SOX10-Hemmung, die in dieser Arbeit gefunden wurden, ist vermutlich einerseits auf direkte transkriptionelle Veränderungen der Zielgene zurückzuführen und andererseits auf sekundäre Effekte als Folge der veränderten Genexpression dieser Zielgene. In diesem Zusammenhang ist zudem zu bedenken, dass SOX10 auch die Expression anderer Transkriptionsfaktoren wie beispielsweise MITF reguliert, die ihrerseits wiederum eine Vielzahl an Zielgenen transkriptionell regulieren [261, 262, 509], was die Zahl der differenziell exprimierten Gene noch weiter steigert. Hoek et al.

konnten durch die ektope Expression von MITF in der KM-Zelllinie SK-MEL-28 eine signifikante Änderung der Genexpression ($\log_2\text{fold change} \geq |1|$) von 9.890 Genen nachweisen [509]. Da SOX-Proteine alle an das selbe, sehr häufig im Genom vorkommende Konsensusmotiv binden können [248], sind *in silico*-Analysen der DNA-Promotorbereiche nach diesem Motiv auch nur eingeschränkt hilfreich. Dies erschwert die Beantwortung der Frage, welche Gene direkt durch SOX10 im UM transkriptionell reguliert werden und wessen Expression lediglich durch sekundäre Effekte wie z.B. kompensatorische Mechanismen beeinflusst wird. So ist bekannt, dass der eng verwandte Transkriptionsfaktor SOX9 im KM nach Hemmung von SOX10 hochreguliert wird [296]. Im UM gibt es hierzu noch keine Publikationen, allerdings zeigten die RNA-Sequenzierungsdaten und qPCR-Analysen dieser Arbeit, dass auch in den Zelllinien 92.1 und Mel270 eine SOX9-Hochregulation nach SOX10-Hemmung stattfand. Inwieweit solche sekundären Folgen zur proapoptotischen Wirkung der SOX10-Hemmung beitragen oder ihr entgegenwirken, müssen zukünftige Untersuchungen zeigen.

Um zu entschlüsseln, welchen Signalwegen die differenziell exprimierten Gene zuzuordnen sind, wurden *GO Term*-Analysen durchgeführt. Interessanterweise waren die meisten Veränderungen in Genen zu finden, die den Bereichen „axonogenesis“, „peptidyl-tyrosine phosphorylation“ bzw. „peptidyl-tyrosine modification“ und „renal development system“ zugeordnet werden können. Die Häufung von Genen aus dem Bereichen „axonogenesis“, „neuron protection development“, „presynapse assembly“, „presynapse organisation“ und „regulation of synapse assembly“ könnten auf die embryonale Herkunft aus NC-Zellen und die Rolle von SOX10 in Gliazellen und bei der Entwicklung des Nervensystems zurückzuführen sein, die bereits ausführlich untersucht worden ist [252, 254, 264, 266, 283]. Den GO-Terms „peptidyl-tyrosine phosphorylation“ bzw. „peptidyl-tyrosine modification“ werden Veränderungen die Phosphorylierung von Tyr204 bzw. Tyr185 an ERK1 und ERK2 [405, 406] oder von Tyr182 an p38 [408] zugerechnet, die in den Western Blot-Analysen nachgewiesen werden konnten. Interessant war aber vor allem der GO-Term „renal development system“, der so nicht erwartet worden war, da sich die Niere während der Embryonalentwicklung eigentlich aus Zellen des Mesoderms entwickelt und somit nicht von NC-Zellen abstammt [510]. In der Literatur finden sich aber einige wenige Publikationen zu SOX10 in der Niere. SOX10 wird in geringem Maß zwischen der 17. und 25. Entwicklungswoche im fötalen humanen Nierengewebe exprimiert [275] und SOX10-positive Zellen wurden auch in perivaskulären Zellen unter anderem in der Niere nachgewiesen, obwohl diese Zellen entwicklungsbiologisch nicht aus NC-Zellen hervorgehen [511]. Iskander et al. konnten allerdings im Tiermodell zeigen, dass die Schrittmacherzellen des Nierenbeckens von NC-Zellen abstammen und SOX10 exprimieren [512]. Zudem berichteten Li et al. einen Fall eines Patienten mit Waardenburg-Syndrom Typ 2, der eine Deletion im SOX10-Gen (c. 544-557del) und neben Hörstörungen und einer Irisheterochromatie auch eine Nierenfehlbildung in Form einer Hufeisenniere aufwies [513]. Dies könnten Hinweise darauf sein, dass SOX10 bei der Nierenentwicklung doch eine funktionelle Rolle übernimmt. Abgesehen von einer möglichen Beteiligung von SOX10 ist jedoch bekannt, dass die beiden ebenfalls der SoxE-Familie

zugehörigen Transkriptionsfaktoren SOX9 und SOX8 an mehreren Stufen der Nierenentwicklung direkt beteiligt sind, darunter der korrekten Ausbildung der Harnleiter [514]. Da die SOX10-Hemmung in den UM-Zellen zu einer Hochregulation von SOX9 führte, könnten die bei der GO-Term-Analyse identifizierten Veränderungen von Genen aus dem Bereich „renal development system“ also auch als sekundärer Effekt der erhöhten SOX9-Expression interpretiert werden.

Insgesamt zeigen die RNA-Sequenzierungsdaten, dass es keinen alleinigen zentralen Mediator der Effekte oder keine einzelne Signalkaskade gibt, welche durch die Hemmung von SOX10 beeinflusst wird, sondern es sich vermutlich um ein multifaktorielles Geschehen handelt, welches letztlich dazu führt, dass die UM-Zellen nach Hemmung von SOX10 sterben.

4.2 SOX10-Zielgene als potenzielle Mediatoren der Effekte

4.2.1 Genexpression bekannter SOX10-Zielgene

Bisher wurden einige Gene identifiziert, die durch SOX10 direkt transkriptionell reguliert werden [261, 262, 295, 297, 515]. Es war jedoch unklar, ob diese Zielgene im UM überhaupt exprimiert werden und wenn ja, ob sie auch durch SOX10 transkriptionell reguliert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Genexpression der SOX10-Zielgene *MIA*, *PMP2* und *MITF* sowie des nahe verwandten Transkriptionsfaktors SOX9 in verschiedenen UM-Zelllinien nach SOX10-Hemmung analysiert und mit der Expression in der KM-Zelllinie 1205Lu verglichen. Hierbei fielen mehrere Aspekte auf. Alle drei untersuchten UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 wiesen zwar eine ähnlich hohe basale SOX10-Expression auf, allerdings unterschied sich die Expression der SOX10-Zielgene *PMP2* und *MIA* deutlich zwischen den untersuchten UM-Zelllinien. Dies deutet darauf hin, dass abgesehen von SOX10 noch weitere Transkriptionsfaktoren in die transkriptionelle Regulation dieser Gene involviert sein müssen. Auffällig war in diesem Zusammenhang, dass die Zelllinie OMM1.5 eine um den Faktor 300 höhere *PMP2*-Genexpression als etwa die Zelllinien 92.1 und Mel270 zeigten. Die Ursache könnte möglicherweise eventuell mit dem Ursprung der Zelllinie zusammenhängen. Im KM konnte gezeigt werden, dass *PMP2* zur Invasion der Zellen beiträgt [297]. Die Aktivierung der Invasion gehört zu den *hallmarks of cancer* und ist Voraussetzung für die Metastasierung von Tumoren [516]. Die UM-Zelllinie OMM1.5 unterscheidet sich von den Zelllinien 92.1 und Mel270, da sie ursprünglich aus dem Tumorgewebe einer UM-Lebermetastase generiert wurde [325] und daher vermutlich mehr Gene exprimiert, die eine wichtige Rolle bei der Invasion und Metastasierung spielen. Nach SOX10-Hemmung kam es sowohl in OMM1.5 als auch in der Zelllinie Mel270, die eine deutlich geringere *PMP2*-Expression aufwies, zu einer Abnahme der *PMP2*-Genexpression, sodass eine Expressionsregulation durch SOX10 in UM potenziell möglich ist.

Im Gegensatz zu *PMP2* war die Expression von *MIA* in der Zelllinie 92.1 um das mehr als sechsfache höher als in der Zelllinie OMM1.5, veränderte sich aber nach SOX10-

Hemmung nur in dieser Zelllinie. *MIA* wurde von Graf et al. unter anderem in der Zelllinie 1205Lu als direktes Zielgen von SOX10 identifiziert [295]. In dieser Arbeit konnten 24h nach der Transfektion mit SOX10-spezifischen siRNAs keine signifikanten Unterschiede der *MIA*-Genexpression in der Zelllinie 1205Lu beobachtet werden. Da Graf et al. in ihrer Publikation [295] jedoch nur Daten von Western Blot-Analysen zeigen und keine Daten zur Genexpression, bleibt unklar, ob sich die *MIA*-Genexpression erst später als 24h nach der Transfektion änderte oder eine Abnahme der *MIA*-Expression in dieser Arbeit aus anderen Gründen nicht nachgewiesen werden konnte.

Der Transkriptionsfaktor SOX9 besitzt eine große Homologie zu SOX10 und SOX8 [250, 429] und wird im KM nach der Hemmung von SOX10 hochreguliert [296]. Zudem kann eine ektope SOX9-Expression KM-Zellen vor Apoptose infolge einer SOX10-Hemmung bewahren [296], weshalb eine Analyse der SOX9-Expression im UM auch von Interesse war. Die drei in dieser Arbeit untersuchten UM-Zelllinien exprimierten alle deutlich weniger SOX9 als die KM-Zelllinie 1205Lu. Auffällig war in diesem Zusammenhang die inverse Korrelation zwischen der basalen SOX10- und SOX9-Genexpression sowohl bei der KM-Zelllinie 1205Lu als auch bei den drei untersuchten UM-Zelllinien. Nach SOX10-Hemmung kam es analog zu den Beobachtungen im KM von Shakhova et al. [296] zu einer Induktion der SOX9-Genexpression zumindest in zwei der drei untersuchten UM-Zelllinien. Somit scheint auch im UM eine antagonistische Regulation von SOX10 und SOX9 stattzufinden.

4.2.2 MITF als Mediator der Effekte

4.2.2.1 Expression basal und nach Hemmung von SOX10

MITF ist das am besten untersuchte Zielgen von SOX10 [261, 262, 432]. Ähnlich wie SOX10 ist auch MITF bisher erst wenig im Kontext des UM untersucht worden. MITF bei etwa 65 % der UM exprimiert und korreliert negativ mit der Pigmentierung und positiv mit der Proliferationsaktivität [440]. Im Zebrafisch-UM-Modell konnte interessanterweise auch eine Rolle als Tumorsuppressor beschrieben werden [517]. In dieser Arbeit zeigte sich eine signifikante positive Korrelation zwischen der basalen SOX10- und MITF-Expression in den untersuchten UM-Zelllinien. Nur in zwei Zelllinien konnte kaum MITF nachgewiesen werden; dabei handelte es sich um die Zelllinien Mel285 sowie Mel290, die auch keine basale SOX10-Expression aufwiesen. Diese Zelllinie exprimiert auch keine melanozytären Marker wie Melan-A, TYR, TYRP1 und DCT [489]. Da MITF als Master-Regulator der Melanogenese gilt [431], könnte die geringe MITF-Expression eine Erklärung für diesen Befund sein. Die siRNA-vermittelte Hemmung von SOX10 führte in den drei SOX10-exprimierenden Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 zu einer deutlichen Verringerung der MITF-Gen- und Proteinexpression ähnlich zu den Beschreibungen im KM [288]. Im KM konnte gezeigt werden, dass MITF neben den melanozytären Markern TYR [270] und DCT [272] auch die Expression pro- und antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 [441], *Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha* (HIF1α) [518] sowie die der Zellzyklusregulatoren CDK2 [519] oder Cyclin dependent kinase inhibitor 2A (INK4A)

[520] direkt transkriptionell reguliert. Daher könnte MITF ein zentraler Mediator der Effekte der SOX10-Hemmung sein.

4.2.2.2 Auswirkung der MITF-Hemmung auf Zellviabilität, Zellzyklusprogress und Überleben von UM-Zellen

Die Analyse der Zellviabilität zeigte, dass die Hemmung von MITF ähnlich wie die Hemmung von SOX10 zu einer Verringerung der Zellviabilität in UM-Zellen führte. Wie schon nach der SOX10-Hemmung war dieser Effekt am deutlichsten bei den Zelllinien 92.1 und Mel270 zu beobachten, während bei der Zelllinie OMM1.5 erst verzögert nach 72h eine signifikante Verringerung eintrat. Nach 96h sank die Zellviabilität der OMM1.5-Zellen auf etwa 30 %, wohingegen sich die der Zelllinien 92.1 und Mel270 auf etwa 5 % verringerte. Bei der ebenfalls untersuchten KM-Zelllinie 1205Lu verringerte sich die Zellviabilität nach MITF-Hemmung nicht signifikant. Ebenfalls wurden keine Veränderungen der Zellzyklusprogression und keine vermehrte Apoptoseinduktion beobachtet. Dies lässt sich allerdings damit erklären, dass diese Zelllinie basal kaum MITF exprimierte, weshalb eine Transfektion mit MITF-spezifischer siRNA folglich kaum einen Einfluss auf die Zellviabilität ausübte. Bei diesen Versuchen war auffällig, dass die Zellviabilität der mit Kontroll-siRNA behandelten Zellen der Zelllinien 92.1 und Mel270 nach 72h und 96h deutlich geringer war als in den nur mit dem Transfektionsmittel behandelten Zellen, die als Referenz für die Berechnung der Zellviabilität auf 100 % festgesetzt wurde. Dies deutet darauf hin, dass siRNAs selbst die Zellviabilität negativ beeinflussen, auch wenn kein bestimmtes Zielgen ausgeschaltet wird. Ähnliches konnte auch bei den jeweiligen Wiederholungsexperimenten sowie bei den Zellviabilitätsanalysen nach SOX10-Hemmung beobachtet werden. Es ist jedoch wichtig zu betonen, dass durch die Transfektionen mit spezifischen siRNAs insgesamt deutlichere Effekte erzielt wurden im Vergleich zur Transfektion mit der Kontroll-siRNA.

Die Daten der Zellzyklusanalyse nach 48h stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Zellviabilitätsanalyse, die zum selben Zeitpunkt nach der Transfektion durchgeführt wurden. In den Zelllinien 92.1 und Mel270 befand sich nach MITF-Hemmung ein größerer Anteil an Zellen in der G1-Phase verglichen mit den jeweiligen Kontrollzellen, wohingegen bei der Zelllinie OMM1.5 kein Unterschied zu sehen waren. Bei letzterer waren nach 48h jedoch auch noch keine Unterschiede in der Zellviabilität detektierbar. Am deutlichsten war der Zellzyklusarrest in der Zelllinie 92.1 nachweisbar, die nach MITF-Hemmung für 48h nur noch eine Zellviabilität von 35 % im Vergleich zur Kontrolle aufwies. In Western Blot-Analysen konnten eine Rb-Hypophosphorylierung, eine Verringerung der Cyclin D1-Expression und eine geringe Induktion der p21-Expression nachgewiesen werden. Zusammengefasst sprechen diese Daten dafür, dass die Hemmung von MITF analog zur Hemmung von SOX10 zu einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase führt. Interessant ist dabei, dass es parallel auch zu einer Verringerung der p27-Expression kam. Das Protein p27 ist wie p21 ein CDK-Inhibitor, der die Aktivität von Komplexen aus CDKs und verschiedenen Cyclinen inhibieren kann [394]. Eine Verringerung von p27 ist notwendig, damit die Zellen von der G1- in die S-Phase eintreten können [394]. Möglicher-

weise handelt es sich bei der Abnahme der p27-Expression um einen Versuch der Zellen, den durch MITF-Hemmung verursachten Zellzyklus-Arrest in der G1-Phase doch noch zu überwinden. Außerdem wurde die p53-Expression analysiert, allerdings scheint der Zellzyklusarrest nach MITF-Hemmung wie im Falle der SOX10-Hemmung unabhängig von p53 abzulaufen. Zusätzlich zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase des Zellzyklus zeigten die Zelllinien 92.1 und Mel270 eine deutliche Zunahme der Annexin V-positiven Zellen nach MITF-Hemmung. Die Apoptoseinduktion konnte durch weitere Proteinexpressionsanalysen bestätigt werden. Die Verringerung der Expression antiapoptotischer Proteine wie Bcl-2 und Bcl-w sowie die Spaltung der Procaspasen 3 und 9 sowie des Proteins PARP legen den Schluss nahe, dass die Hemmung von MITF in den Zelllinien 92.1 und Mel270 analog zur Inhibition von SOX10 ebenfalls über den intrinsischen Weg zur Apoptoseinduktion führt.

Die Zelllinie OMM1.5 unterschied sich in ihrem Verhalten nach MITF-Hemmung deutlich von den beiden anderen untersuchten UM-Zelllinien. Sowohl die Zellviabilität als auch die Apoptoseinduktion und die Zellzyklusprogression änderte sich 48h nach der Transfektion mit MITF-spezifischer siRNA kaum. Eine Erklärung für die geringere Apoptoseinduktion nach MITF-Hemmung im Vergleich mit 92.1 und Mel270 könnte die vermehrte Aktivität anderer Signalwege wie etwa des Akt-Signalweges in den Zellen darstellen. Durch diese höhere Grundaktivität dieses Signalweges könnten die Zellen möglicherweise in der Lage sein, den Verlust von MITF länger zu kompensieren.

Um einen experimentellen Beweis für die zentrale Beteiligung von MITF an der Zelltodinduktion nach SOX10-Hemmung zu bringen, wurden Rescue-Experimente durchgeführt. Dabei wurde untersucht, ob die ektope Expression vom MITF den Verlust von SOX10 kompensieren und somit die Zellen vor dem Zelltod bewahren kann. Für die Durchführung der Experimente wurden die beiden Zelllinien 92.1 und Mel270 verwendet, da sie im Gegensatz zu OMM1.5 eine deutliche Abnahme der Zellviabilität sowie einen Zellzyklusarrest und Apoptoseinduktion bereits 48h nach SOX10-Hemmung zeigten. Die ektope MITF-Expression wurde bei diesem Experiment durch Transfektion der Zellen mit einem Expressionsplasmid erreicht, welches unter der Kontrolle eines CMV-Promotors SOX10-unabhängig zur Expression eines Myc- und FLAG®-getaggten MITF-Proteins führt. Dadurch konnte die Expression des gebildeten Proteins nicht nur durch MITF-Antikörper, sondern auch durch FLAG® - bzw. Myc-spezifische Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden. Die durchgeführten Proteinexpressionsanalysen zeigten eine höhere Zellviabilität und verringerte Spaltung der Procaspasen 3 und 9 bei gleichzeitiger ektope MITF-Expression und SOX10-Hemmung. Die Expression des neugebildeten MITF ließ sich sowohl durch MITF- als auch Myc- und FLAG® -Tag spezifische Antikörper nachweisen. Dabei war beim Nachweis mit MITF-spezifischen Antikörpern eine Verlagerung der MITF-Bande bei den Zellen zu beobachten, die mit dem MITF-Expressionsplasmid transfiziert worden waren. Dies lässt sich durch die geringfügig größere Proteingröße des bedingt durch den Expressionsvektor mit einem zusätzlichen Myc- und FLAG® -Tag ausgestatteten MITF-Proteins erklären. Bei der Durchführung des Rescue-Versuches musste sowohl die Wahl geeigneter Transfektionsreagenzien, die

Stabilität der ektope MITF-Expression als auch die optimale zeitliche Abfolge der beiden Transfektionen ausgetestet werden, um den Rescue-Effekt tatsächlich beobachten zu können. Die Transfektionsreagenzien sollten dabei idealerweise einerseits eine hohe Transfektionseffizienz haben und andererseits nicht toxisch auf die Zellen wirken. Das Reagenz Lipofectamine® RNAiMAX konnte für die siRNA-Transfektionen beibehalten werden, es ist allerdings nicht für die Transfektion von Plasmiden geeignet [521]. Mit dem standardmäßig für Plasmidtransfektionen in der Arbeitsgruppe verwendete Reagenz FuGENE® 6 (Promega, Madison, Wisconsin, USA) konnte aber nur eine sehr geringe Transfektionseffizienz in den UM-Zelllinien 92.1 und Mel270 erreicht werden, wie Kontrollversuche mit einem GFP-Expressionsplasmid zeigten (Daten nicht in dieser Arbeit gezeigt). Der Einsatz des Reagenzes Lipofectamine™ 3000 erzielte zumindest in der Zelllinie Mel270 ein besseres Resultat, sodass die Rescue-Experimente letztlich nur mit dieser Zelllinie durchgeführt werden konnten. Um die Dauer und Stabilität der ektope MITF-Expression zu untersuchen, wurden Mel270-Zellen mit dem Expressionsplasmid transfiziert und die MITF-Expression im Western Blot nach verschiedenen Zeitpunkten analysiert. Eine starke ektope MITF-Expression war nach 12h und 24h erkennbar und nahm danach wieder ab. MITF war aber auch noch 48h und 72h nach der Plasmidtransfektion deutlich nachweisbar. Dadurch konnte bestätigt werden, dass die ektope MITF-Expression für mindestens 72h und damit für die gesamte Dauer des Rescue-Versuchs anhielt. Für den Nachweis eines Rescue-Effektes durch MITF wurde aufgrund der durchgeführten Vorversuche ein zweizeitiges Transfektionsprotokoll gewählt, bei dem zuerst die Transfektion des MITF-Expressionsplasmids gefolgt von der siRNA-Transfektion im Abstand von 16h durchgeführt wurde. Da bereits 24h nach Transfektion mit einer SOX10-spezifischen siRNA eine deutliche Zunahme an apoptotischen Zellen beobachtbar wurde, hatte eine zeitgleiche Transfektion von SOX10-siRNA und MITF-Expressionsplasmid in den Vorversuchen bereits zum Sterben der Zellen geführt, bevor ein möglicherweise schützender Effekt durch die ektope MITF-Expression eintreten konnte. Zudem konnte durch die Pause von 16h zwischen den beiden Transfektionsschritten eine vermehrte Zelltoxizität aufgrund der Behandlung der Zellen mit den beiden Transfektionsreagenzien minimiert werden.

Insgesamt deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass MITF im UM das Überleben der Zellen fördert und damit protumorigen wirkt. In der Literatur sind bislang nur wenige Arbeiten zur Rolle von MITF im Kontext des UM publiziert worden, die zum Teil zu einem gegenteiligen Ergebnis kamen. Das *MITF*-Gen ist auf Chr. 3 lokalisiert [432, 433], welches eine entscheidende Rolle für die Prognose des UM spielt, da die beim UM gehäuft auftretende Monosomie 3 mit einem hohen Risiko für eine Metastasierung [24, 48], einer höheren Mortalität [75, 192] sowie einem kürzeren RFS assoziiert ist. Daher stellt sich die Frage, ob MITF in diesem Zusammenhang analog zu BAP1 eine Rolle spielt. Mouriaux et al. konnten eine MITF-Expression bei 65 % der UM-Primärtumoren und eine positive Korrelation zwischen der Expression von MITF und dem Proliferationsmarker Ki67 finden [440]. In ihrer Analyse konnten sie aber keinen signifikanten Überlebensunterschied von UM-Patienten mit MITF-positiven im Vergleich mit MITF-negativen Tumoren finden [440]. Ob es einen Zusammenhang zwischen der MITF-Expression und

einer Monosomie 3 gibt, wurde in dieser Arbeit nicht untersucht [440]. Gelmi et al. stellten auf der ARVO-Jahrestagung 2022 in Denver Daten einer Analyse zur MITF-Expression bei 64 UM-Patienten des Universitätsklinikums Leiden vor [522]. Die Forscher konnten einen signifikanten Zusammenhang zwischen einer geringen MITF-Expression und einer Monosomie 3 sowie einer höheren Pigmentierung der Tumoren und einer höheren Expression des *Preferentially expressed antigen in melanoma* (PRAME), allerdings keinen mit dem Überleben der Patienten feststellen [522]. Interessanterweise war in Tumoren mit geringer MITF-Expression eine Hochregulation von Signalwegen zu beobachten, die mit Entzündung assoziiert sind [522]. Es wurden auch die 80 Proben des *TCGA Ocular Melanomas (UVM)*-Datensatz [75, 347] auf diese Aspekte hin analysiert und ähnliche Ergebnisse beobachtet [522]. Aus diesen Erkenntnissen schlossen die Autoren, dass der Verlust von MITF mit einem Fortschreiten der Erkrankung in Verbindung steht [522]. Die Ergebnisse der Arbeit von Phelps et al. [517] gehen in eine ähnliche Richtung und stärken die These, dass der Verlust von MITF die Tumورprogression fördern könnte. Die Autoren nutzten in ihrer Studie ein Zebrafisch-Modell, bei dem das humane *GNAQ*^{Q209L} unter der Kontrolle des *mitfa*-Promotors exprimiert wird [523]. Sie konnten dabei beobachten, dass der Verlust von *mitfa* die *GNAQ*^{Q209L}-vermittelte Tumorentwicklung beschleunigte und MITF im UM im Gegensatz zum KM als Tumorsuppressor fungiert [517]. Somit scheint MITF im UM möglicherweise unterschiedliche Rollen einnehmen zu können und sowohl tumorsupprimierend als -fördernd zu wirken können.

4.3 Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen im Uveamelanom

4.3.1 SOX10 als direkter Angriffspunkt einer zielgerichteten Therapie?

Aufgrund des starken und rasch einsetzenden zytotoxischen Effekte der SOX10-Hemmung auf UM-Zellen einerseits und die geringe Toxizität auf HM andererseits liegt nahe, die gezielte SOX10-Hemmung als neue spezifische Therapie im UM zu nutzen. Für eine pharmakologische Inhibition von Proteinen *in vivo* werden derzeit vor allem spezifische monoklonale Antikörper, die an die Zielstruktur binden oder niedermolekulare Wirkstoffe (*small molecule*-Inhibitoren) eingesetzt, die über eine kompetitive oder allosterische Hemmung die Funktion des Zielproteins modulieren [524, 525]. SOX10 ist ein intrazellulär vorkommender Transkriptionsfaktor, der zwar zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern hin- und herwechseln kann, allerdings weder an der Oberfläche exprimiert noch sezerniert wird [259] und daher nicht als Zielstruktur für therapeutische Antikörper zugänglich ist [524]. *Small molecule*-Inhibitoren hemmen die Funktion ihrer Zielproteine wie z.B. Proteinkinasen, zu denen auch BRAF und MEK zählen, durch kompetitive Hemmung der ATP-Bindungsstelle oder durch eine allosterische Hemmung, indem sie an Proteindomänen binden und damit deren Funktion blockieren [526]. Transkriptionsfaktoren sind im Gegensatz zu Proteinkinasen aufgrund ihres strukturellen Aufbaus pharmakologisch schwerer zu beeinflussen [527]. Sie haben typischerweise keine Bindungstaschen, in die ein Inhibitor binden könnte, sondern besitzen eher große, glatte

Oberflächen ohne spezifische Angriffsflächen [527]. Zudem sind sie aus DNA-Bindedomänen und davon getrennten verschiedenen Effektdomänen aufgebaut, was die Entwicklung eines spezifischen Hemmstoffes beispielsweise nach Vorbild der BRAFi oder MEKi erschwert [527]. Bisher konnte noch kein spezifischer *small molecule*-Inhibitor für SOX10 entwickelt werden [423]. Interessant ist in diesem Zusammenhang jedoch das Flavonoid Astragalin (Kaempferol-3-Glycosid), das natürlicherweise in Pflanzen wie dem Kerzenstrauch (*Cassia alata*) und Teufelszwirn (*Cuscuta chinensis*) vorkommt [528]. You et al. konnten zeigen, dass Astragalin in KM-Zelllinien zur Apoptoseinduktion und Herabregulierung von SOX10 führt und die ektope Expression von SOX10 die Wirkung der Substanz vermindern kann [529]. Wie genau die Expression von SOX10 durch Astragalin beeinflusst wird und welche Signalwege und Faktoren hierbei beteiligt sind, wurde von den Autoren jedoch nicht weiter untersucht [529]. Somit kann Astragalin also nicht als direkter Inhibitor von SOX10 gesehen werden, obwohl die verursachten Effekte auf das Fehlen der SOX10-Funktion zurückgehen.

Eine weitere Möglichkeit der Funktionsbeeinflussung wäre, die posttranslationalen Modifikationen von Transkriptionsfaktoren mithilfe von *small molecules* zu modulieren und auf diese Weise deren transkriptionelle Aktivität zu regulieren, wie Williams et al. für die SOX-Proteine postulieren [527]. SOX10 kann jeweils an mehreren Stellen durch Phosphorylierung und SUMOylierung posttranslational modifiziert werden, was zu einer Veränderung der transkriptionellen Aktivität und Förderung der Degradierung des Proteins führen kann [255, 256, 258]. Welche Proteine an der Ausbildung dieser Modifikationen beteiligt sind, ist bisher jedoch nur wenig erforscht worden. Girard und Goosens konnten zeigen, dass das Ubiquitin-konjugierende Enzym 9 (UBC9) mit SOX10 interagiert und zur SUMOylierung beiträgt [256]. Im KM konnte speziell die SUMOylierung der Aminosäure Lys55 als wichtige Modifikation für die Steuerung der Proteinaktivität identifiziert werden [258]. Han et al. konnten zeigen, dass SOX10 durch die Kinase ERK2 an den Aminosäurepositionen Thr240 und Thr244 phosphoryliert wird und dies die SUMOylierung des Proteins an Position Lys55 verhindert, die für die transkriptionelle Aktivität von SOX10 benötigt wird [258]. Andere Phosphorylierungsstellen im SOX10-Protein könnten laut Abgleich mit vorhergesagten Proteinfunktionsmotiven der *Eukaryotic Linear Motif*-Datenbank möglicherweise durch MAP-Kinasen und CDKs vermittelt werden; ein experimenteller Beweis für diese *in silico*-Vorhersagen steht jedoch noch aus [255].

In vitro ist eine spezifische Inhibition von SOX10 durch die Transfektion der Zellen mit entsprechenden siRNAs vergleichsweise einfach zu bewerkstelligen, wie sie auch in dieser Arbeit angewendet wurde. Da die Zellen bei der Kultivierung *in vitro* als einzellige Schicht vorliegen, kommen sie zwangsläufig direkt in Kontakt mit den Transfektionsreagenzien. Im Gegensatz dazu müssten bei der Anwendung in einem Organismus verschiedene Hürden auf dem Weg von der Applikation bis zum Tumor überwunden werden. Dies betrifft sowohl die Stabilität der RNA und insbesondere die Resistenz gegen den frühzeitigen Abbau im Blut und den Zielzellen, die Akkumulation im Zielgewebe und die Aufnahme in die Zielzellen als auch mögliche Off-Target-Effekte durch unbeabsichtigte Hemmung anderer Gene und das Auslösen einer Immunantwort gegen siRNAs als

mögliche Komplikationen einer solchen Therapie [530]. Chemische Modifikationen der Nukleotide sowie die Entwicklung von Liposomen und Nanopartikeln für die Verpackung der siRNA haben zu Fortschritten im Bereich der Stabilität, des Transports und der Minimierung von Nebeneffekten geführt [530]. Neben siRNAs wurde auch auf dem Gebiet der Antisense-Oligonukleotide (ASO) in den letzten Jahren intensiv geforscht, um diese Hürden zu überwinden. ASO sind lange einzelsträngige Oligonukleotide, bestehend aus chemisch modifizierten Nukleotiden, die komplementär an die jeweilige Ziel-RNA binden [531]. Durch unterschiedliche chemische Modifikationen der Basen kann sowohl Einfluss auf die Stabilität der Moleküle als auch ihre Wirksamkeit und Verträglichkeit im Organismus genommen werden [531]. ASO können je nach Design sowohl den Abbau als auch die Stabilität der mRNA durch Beeinflussung der Translationsmaschinerie an unterschiedlichen Stellen in den Zellen hemmen oder stabilisieren und so die Translation eines Proteins verhindern oder fördern [531]. Allein bis 2021 wurden bereits mehr als 10 auf ASO basierende Medikamente von der FDA zugelassen, darunter vier Medikamente auf siRNA-Basis [531]. Morpholino-ASO gegen *sox10* wurden bereits im Tiermodell in Zebrafischembryos eingesetzt, um die *sox10*-Expression zu inhibieren [532]. Derzeit sind aber keine Studien zu SOX10-ASO auf der Studienverzeichnis-Plattform *clinicaltrials.gov* registriert.

Eine weitere Option könnte theoretisch eine posttranskriptionelle Degradierung von SOX10 durch *proteolysis-targeting chimeras* (PROTAC) darstellen. PROTAC können den Abbau ihres Zielproteins über das Ubiquitin-Proteasom-System induzieren [533]. Sie sind *small molecules* und bestehen aus einem ersten Liganden, der an das Zielprotein bindet und aus einem über einen Linker verbundenen zweiten Liganden, der an eine E3-Ubiquitinligase bindet, wodurch ein Komplex aus dem abzubauenen Zielprotein, dem PROTAC und einer E3-Ligase ausgebildet wird [533, 534]. Dadurch wird das Zielprotein selektiv polyubiquitiniert und anschließend im Proteasom abgebaut [533, 534]. Zu den Vorteilen dieser Technologie zählen, dass (i) ein PROTAC-Molekül den Abbau von gleich mehreren Zielmolekülen induzieren kann, weshalb sie in geringerer Dosierung eingesetzt werden können als *small molecule*-Inhibitoren, dass (ii) eine kompensatorische Hochregulierung der Proteinexpression als Reaktion auf eine Inhibitorbehandlung nicht zur Resistenzbildung führt und dass (iii) „*undruggable*“ Zielproteine wie etwa Transkriptionsfaktoren gezielt abgebaut werden können [533, 534]. Allerdings sind die bisher designten PROTAC mit 1 bis 2 kDa relativ groß, sodass ihre Membrangängigkeit eine große Hürde für die Wirkung darstellt; zudem sind bisher nur PROTAC für Proteine entwickelt worden, für die bereits ein Ligand des Zielproteins und die mit dem Protein assoziierte E3-Ligase bekannt waren [533]. Bislang gibt es noch keine Publikationen zu PROTAC, die SOX10 oder ein anderes SOX-Protein spezifisch degradieren können.

Neben den technischen Herausforderungen einer medikamentösen Tumorthherapie müssen auch potenzielle NW bei einer SOX10-inhibierenden Therapie bedacht werden. Die Versuche in dieser Arbeit haben gezeigt, dass HM eine SOX10-Hemmung sehr gut tolerieren und sich auch nach 96h keine signifikanten Unterschiede in der Zellviabilität

zeigten. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine therapeutische Inhibition nicht doch auch andere SOX10-exprimierende Zellen im Körper negativ beeinflussen könnte, zu denen etwa die Schwann-Zellen im PNS gehören [252, 266]. Bremer et al. konnten in einem konditionalen *Sox10*-Knockout-Mausmodell zeigen, dass es einige Wochen nach Induktion des Knockouts bei adulten Mäusen zur Ausbildung neurologischer Symptome kam, die sich im weiteren Verlauf des Experiments jedoch wieder besserten [535]. Zudem veränderte sich die Fellfarbe der Mäuse fortschreitend von dunkelbraun zu grau [535]. Am Ischiasnerv zeigte sich eine partielle Demyelinisierung, elektrophysiologische Auffälligkeiten wie eine veränderte Amplitude der Aktionspotenziale und eine vermehrte Degeneration der Axone [535]. Somit scheint Sox10 abgesehen von seiner bedeutenden Rolle während der Embryonalentwicklung auch eine wichtige Funktion für die Aufrechterhaltung der Struktur und Funktionsweise von peripheren Nerven im adulten Organismus zu spielen [535]. In reifen Oligodendrozyten, die ebenfalls Sox10 exprimieren, führt der Verlust im Tiermodell jedoch zu keinen Veränderungen der Myelinisierung [536]. Daher könnte eine periphere Neuropathie eine mögliche Komplikation einer systemischen SOX10-Inhibitorthherapie darstellen.

Um die Spezifität einer SOX10-inhibierenden Therapie zu erhöhen und damit Off-target-Effekte zu minimieren, könnte ein Antikörper-Medikamenten-Konjugat eine Möglichkeit darstellen, um einen potenziellen SOX10-Inhibitor gezielt in UM-Zellen einzubringen. Hier könnte beispielsweise eine Kopplung des Therapeutikums an Antikörper gegen das Protein gp100 in Betracht kommen. Dieses Oberflächenmolekül wird bei mehr als 80 % der UM-Patienten auf 75 % bis 100 % aller Tumorzellen exprimiert [537] und ist auch die Zielstruktur des bispezifischen Moleküls Tebentafusp, welches derzeit die einzige zugelassene systemische Therapie ist, die das OS von metastasierten UM-Patienten signifikant verlängern kann [178, 180]. Es ist keine SOX10-Expression in der Leber gefunden worden, in der mehr als 90 % der Metastasen bei UM-Patienten auftreten [133-136, 275]. Daher könnte eine SOX10-inhibierende Therapie möglicherweise mit einem leberspezifischen Verfahren wie der Chemoembolisation oder einem isolierten Perfusionsverfahren kombiniert werden, um die Gefahr von systemischen NW zu minimieren.

4.3.2 SOX10-basiertes *drug repurposing* zur Identifizierung neuer therapeutischer Zielstrukturen im Uveamelanom

Die vorgestellten Daten zeigen, dass sowohl SOX10 als auch sein Zielgen *MITF* essenziell für das Überleben von UM-Zellen sind. Daher könnte sich die Inhibition weiterer Zielstrukturen, die mit SOX10 und MITF funktionell assoziiert sind und pharmakologisch möglicherweise besser als diese beiden Transkriptionsfaktoren moduliert werden können, als potenzielle Option für die Entwicklung neuer Therapien im UM erweisen. Um solche Zielstrukturen zu identifizieren, wurden die Erkenntnisse aus den SOX10-Inhibitionsversuchen mit bioinformatischen Ansätzen verknüpft und die Informationen in einem UM-Protein-Interaktionsnetzwerk gebündelt. Dieser neuartige Ansatz wurde dann verwendet, um *in silico* potenziell interessante Ziele für eine pharmakologische Therapie zu identifizieren, die bisher speziell im UM noch nicht oder nur kaum untersucht wurden.

Insbesondere im Hinblick der Tatsache, dass das UM durch seine relativ geringe Mutationslast und das Auftreten von nur wenigen Treibermutationen charakterisiert ist [46], die sich zudem pharmakologisch bisher nicht gut beeinflussen lassen, könnte sich dieses Vorgehen als vielversprechende Methode zur Identifizierung neuer Zielstrukturen herausstellen. Die Kombination mit weiteren bioinformatischen Analysemöglichkeiten wie etwa mit sogenannten Docking-Simulationen bieten dabei neue Möglichkeiten für die Therapieentwicklung. Bei diesen Simulationen wird die Bindungsaffinität von Molekülen an die gewünschte Zielstruktur, z.B. das zu hemmende Enzym, *in silico* getestet, um bisher unbekannte Interaktionen zwischen Proteinen und pharmakologischen Substanzen zu identifizieren [538]. Dies birgt das Potenzial, möglicherweise bereits in klinischen Phasen getestete oder sogar schon zugelassene Medikamente im Sinne eines *drug repurposing* in einem neuen medizinischen Anwendungsgebiet einsetzen zu können [443, 444].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mithilfe des erstellten UM-Protein-Interaktionsnetzes vier potenzielle Zielstrukturen selektiert, die sich möglicherweise als Angriffspunkte für eine medikamentöse Therapie des UM eignen könnten. Diese wurden dann in *in vitro*-Experimenten weiter charakterisiert. Die vier Kandidatenproteine sind allesamt durch *small molecule*-Inhibitoren oder neutralisierende AK inhibierbar. Das größte Potenzial zeigte hierbei der Einsatz des *small molecule*-Inhibitors und pan-E2Fi HLM006474 [480], der für die Hemmung von E2F1 ausgewählt wurde, da zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente keine selektiver E2F1-Inhibitor kommerziell erhältlich war. Durch HLM006474 kam es bereits bei einer Dosierung im niedrigen mikromolaren Bereich zu einer starken Verringerung der Zellviabilität sowie zur Apoptoseinduktion und zum Zellzyklusarrest.

4.3.2.1 E2F1 und HLM006474 – geeignete Kandidaten für eine medikamentöse Therapie des UM?

E2F1 aus der E2F-Transkriptionsfaktorfamilie ist zentral am Zellzyklusübergang von der G1- in die S-Phase beteiligt [386]. E2F1 bildet in Zellen in der G0/G1-Phase Komplexe mit dem Tumorsuppressorprotein Rb, wodurch es seine Funktion als Transkriptionsfaktor inhibiert wird [386]. Wird Rb durch CDKs hyperphosphoryliert, nimmt seine Bindung zu E2F1 ab, wodurch E2F1 wieder seine Funktion als Transkriptionsfaktor direkt durch Stimulierung der Expression von Genen ausüben kann, die für den Übergang in die S-Phase benötigt werden [384-386]. Im KM wird E2F1 im Vergleich mit gesunder Haut und Nävi vermehrt exprimiert und seine Funktion wurde bereits durch spezifische Hemmung mit siRNAs bzw. durch Einsatz von HLM006474 in KM-Zelllinien experimentell untersucht [448]. Dabei kam es *in vitro* zu einer Verringerung der Zellviabilität, Apoptoseinduktion, p53-induzierten Seneszenzinduktion, einem G2/M-Zellzyklusarrest sowie einem stark verringerten Tumorwachstum im Mausmodell nach der Behandlung mit HLM006474 [448].

Die in dieser Arbeit untersuchten UM-Zelllinien 92.1, Mel270 und OMM1.5 zeigten nach 96h eine deutliche Abnahme der Zellviabilität bei HLM006474-Konzentrationen > 10 µM.

Bei Inkubation der Zellen mit einer Konzentration von 50 μM konnte ein Zellzyklusarrest und eine deutliche Apoptoseinduktion in allen drei Zelllinien beobachtet werden. Anders als nach Hemmung von SOX10 und MITF, bei der jeweils ein G1-Phasen-Arrest induziert wurde, kam es nach Inkubation mit HLM006474 zu einem Anstieg des Anteils an Zellen in der S-Phase. Zu einer Verlängerung der S-Phasen-Dauer kann es einerseits unabhängig vom Replikationsgeschehen kommen, wenn etwa dsDNA-Brüche auftreten (Intra-S-Phasen-Checkpoint), oder wenn das Fortschreiten der Replikationsgabeln während der Replikation beeinträchtigt wird (Replikationscheckpoint) [384, 539]. Letzteres kann beispielsweise durch Hemmung der DNA-Polymerase, durch ein zu geringes dNTP-Angebot oder abweichende DNA-Strukturen verursacht werden, wodurch es zu einer Verlangsamung der DNA-Synthese kommt [539]. Ziel des S-Phasen-Arrest ist dabei, eine unkontrollierte DNA-Replikation zu verhindern und die Reparatur der DNA bzw. Wiederauffüllung des dNTP-Angebotes zu erlauben, bevor es zur Zellteilung kommt [539]. Alle S-Phasen-Checkpoints werden dabei unabhängig vom Tumorsuppressor p53 aktiviert [539], wie es auch nach HLM006474-Inkubation in den drei untersuchten UM-Zelllinien der Fall war.

E2F1 fördert als Transkriptionsfaktor neben regulatorischen Proteinen der G1- und S-Phase wie Cyclin E1, Cyclin A2 und CDK2 auch die Transkription typischer S-Phase-Proteine, die für die Nukleotid- und DNA-Synthese während dieses Zellzyklusabschnitts benötigt werden, darunter die Proteine Thymidinkinase, Thymidylat-Synthase, Dihydrofolat-Reduktase (DHFR), DNA-Polymerase α , *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA) sowie Ribonukleotidreduktase 1 und 2 [482-484]. Eine Herabregulierung dieser Proteine infolge einer Hemmung von E2F1 kann daher den beobachteten Arrest in der S-Phase plausibel erklären. Nach der Behandlung mit HLM006474 nahm auch die E2F1-Expression selbst ab, was darauf zurückgeführt werden kann, dass durch die Hemmung von E2F1 die Verstärkung der eigenen Genexpression wegfällt, die normalerweise in einer positiven Rückkopplungsschleife über E2F-Bindestellen im E2F1-Promotor ausgeübt wird [482, 540].

Einhergehend mit dem S-Phasen-Arrest kam es durch die Inkubation mit HLM006474 in den untersuchten UM-Zelllinien auch zu einer Aktivierung des p38-Signalweges, der vor allem durch Stress aktiviert wird [407-409]. Speziell nach dsDNA-Brüchen kann es zu einer Akkumulation von p38 α im Zellkern kommen, sodass davon ausgegangen wird, dass das Protein beim G2/M-Arrest und der DNA-Reparatur eine Rolle spielt [410]. Zudem kann die Aktivierung von p38 zum Arrest am Übergang von der G1- in die S-Phase führen [409]. Ein Zusammenhang zwischen dem S-Phase-Arrest und der p38-Aktivierung könnte durch das Auftreten von Replikationsstress erklärt werden, der durch Störungen der normalen DNA-Synthese bzw. einen verlangsamten Progress der Replikationsgabeln ausgelöst wird [541]. Durch stillstehende oder verlangsamte Replikationsgabeln und die dadurch entstehende einzelsträngige DNA, die zum Replikationsstress führt, können die Kinasen ATM und ATR aktiviert werden [541]. Außerdem kann die Aktivierung von ATM nach dsDNA-Brüchen zur Aktivierung von p38 führen, wie sie auch in dieser Arbeit nach Inkubation mit HLM006474 beobachtet wurde, wobei ATM selbst p38

nicht direkt phosphoryliert [542]. ATM kann jedoch die MAP-Kinase-Kinase-Kinasen Thousand and one amino acid (TAO1, TAO2 und TAO3) infolge von dsDNA-Brüchen aktivieren, die wiederum die MAP-Kinase-Kinasen MKK3 und MKK6 phosphorylieren, welche schließlich p38 durch Phosphorylierung aktivieren [543]. Die Apoptoseinduktion nach HLM006474-Inkubation ging mit einer Abnahme der Bcl-2-Expression einher, die auf eine Aktivierung des p38-Signalweges, das die Expression von Bcl-2 inhibieren kann [544], zurückgehen könnte. Rouaud et al. konnten darüber hinaus beobachten, dass die Inhibition von E2F1 zur p53-Aktivierung in KM-Zelllinien führt [448]. In den untersuchten UM-Zelllinien kam es jedoch zu keiner Akkumulation von p53 nach HLM006474-Inkubation, sodass davon auszugehen ist, dass die beobachteten Effekte auf den Zellzyklus und den Zelltod im UM unabhängig von p53 vermittelt werden.

Obwohl eigentlich nur E2F1, nicht aber die anderen sieben Mitglieder der E2F-Transkriptionsfaktorfamilie Teil des im Rahmen dieser Arbeit generierten *target selection network* waren, wird auch deren Funktion bei der Inkubation der UM-Zellen mit HLM006474 mit beeinträchtigt, da es sich bei HLM006474 um einen pan-E2Fi handelt [480]. Somit ist mit diesem Inhibitor streng betrachtet keine selektive E2F1-Hemmung im eigentlichen Sinn möglich. Aus therapeutischer Sicht muss die zeitgleiche Hemmung weiterer E2F-Transkriptionsfaktoren allerdings kein zwangsläufiger Nachteil sein, da bekannt ist, dass andere Mitglieder dieser Transkriptionsfaktorfamilie den Funktionsfall einzelner E2Fs kompensieren können [447, 481]. Ursache hierfür ist die starke Homologie der Transkriptionsfaktoren insbesondere im Bereich der DNA-Bindedomänen, weshalb unterschiedliche E2F-Transkriptionsfaktoren an dieselben Promotorbereiche binden können [447]. Es liegt daher nahe, dass die deutliche Abnahme der Zellviabilität nach HLM006474-Exposition nicht nur durch die Hemmung von E2F1, sondern auch anderer E2F-Transkriptionsfaktoren vermittelt wurde. Auch Rouaud et al. konnten im KM Unterschiede zwischen der E2F1-Hemmung mittels siRNAs und der HLM006474-Behandlung der Zellen finden, darunter etwa eine Herabregulation von Bcl-2 und JUN nur nach der Transfektion mit E2F1-siRNAs sowie Unterschiede bei den Phasen, in denen es zum Zellzyklusarrest kam [448]. Interessanterweise führte die SOX10-Hemmung den RNA-Sequenzierungsanalysen nach zu einer Herabregulation fast aller E2F-Transkriptionsfaktoren in den untersuchten UM-Zelllinien 92.1 und Mel270. Dies könnte so interpretiert werden, dass die SOX10-Hemmung ähnlich wie HLM006474 eine Wirkung als pan-E2Fi ausübt. Vor diesem Hintergrund könnte sich eine Fokussierung nur auf eine alleinige Hemmung von E2F1 möglicherweise eventuell gar nicht als zielführend in Hinblick auf die Entwicklung einer zytotoxischen Tumorthherapie im UM erweisen. Cronin et al. konnten nach SOX10-Hemmung im KM eine Verringerung der E2F1-Expression zeigen [294], darüber hinaus gibt es jedoch keine Hinweise in der Literatur, dass SOX10 die Expression von E2F1 beeinflussen kann oder es SOX10-Bindestellen in den Promotorregionen der E2F-Transkriptionsfaktoren gibt.

In der Zusammenschau ergibt sich aus den beobachteten Ergebnissen das in Abb. 45 dargestellte Arbeitsmodell zur HLM006474-Wirkung in UM-Zellen. HLM006474 verhindert die Bindung von E2F1 an die DNA. Dadurch kommt es zur verringerten Expression der S-Phase-Gene und infolge dessen zu Verzögerungen bei der DNA-Replikation, weshalb sich insgesamt der Anteil der Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befindet, erhöht. Der daraus resultierende Replikationsstress könnte durch das Kollabieren von Replikationsgabeln zu dsDNA-Brüchen und der beobachteten erhöhten γ -H2A.X-Expression führen, was bereits bei vielen Genotoxinen als sekundäre Folge ihrer Wirkung beobachtet wurde [400]. Infolgedessen könnten Stresskinasen (möglicherweise ATM, ATR oder TAO) aktiviert werden, die über weitere Kinasen zur Phosphorylierung und damit Aktivierung des stressassoziierten p38-Signalweges führen. Dieser Signalweg wiederum könnte durch die Beeinflussung der p21-, p27- und Bcl-2-Expression maßgeblich an der beobachteten Zelltodinduktion über den intrinsischen Apoptoseweg beteiligt sein.

Abb. 45: Arbeitsmodell der basalen E2F1-Funktion im UM sowie nach Inkubation mit dem pan-E2Fi HLM006474

(A) Normaler Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus ohne E2F1-Hemmung. E2F1 bildet in Zellen in der G0/G1-Phase Komplexe mit dem Tumorsuppressorprotein Rb, wodurch seine Bindung an die DNA inhibiert wird und es transkriptionell inaktiv ist. Nachdem Rb durch die Cyclin-CDK-Komplexe Cyclin D1-CDK4/6 und Cyclin E1-CDK2 in der G1-Phase hyperphosphoryliert wird, nimmt seine Bindung zu E2F1 ab, welches dann seine Funktion als Transkriptionsfaktor direkt durch Stimulierung der Expression von Genen ausüben kann, die für den Übergang in die S-Phase benötigt werden [384-386, 482]. SOX10 scheint die Expression von E2F1 in UM-Zellen positiv zu beeinflussen, ob dies jedoch durch direkte Bindung von SOX10 an den E2F1-Promotor geschieht oder ob hierbei noch andere Mediatoren beteiligt sind, ist derzeit noch unbekannt. p21 kann Komplexe mit den CDKs CDK1, CDK2, CDK3, CDK4 und CDK6 bilden und deren Funktion hemmen [385, 386]. Das Protein p27 ist ebenfalls ein CDK-Inhibitor, der die Aktivität von Komplexen aus CDKs und Cyclin D, Cyclin E, Cyclin A und Cyclin B inhibieren kann [394]. Für die Transition von G1 in die S-Phase ist eine fortschreitende Abnahme der p27-Expression und dadurch die Aufhebung der Inhibition der Komplexe Cyclin E-CDK2 und Cyclin A-CDK2 nötig [394]. (B) Arbeitsmodell der HLM006474-Wirkung im UM. Der pan-E2Fi HLM006474 verhindert die Bindung von E2F1 bzw. anderen Mitgliedern der E2F-Transkriptionsfaktorfamilie an die DNA, wodurch es zu einer Herabregulierung der E2F1-Expression selbst sowie von zahlreichen S-Phase-Genen kommt, die für die DNA-Replikation benötigt werden. Dies resultiert in einer verzögerten DNA-Synthese (S-Phasen-Arrest), die zu vermehrtem replikativen Stress führt (z.B. verlangsamtes Fortschreiten und Kollabieren der Replikationsgabeln, dsDNA-Brüche). Infolgedessen kommt es zur Aktivierung des p38-MAPK-Stresssignalweges durch Phosphorylierung von p38 – mutmaßlich durch Aktivierung von Stresskinasen wie ATM oder TAO -, was zur p21-Induktion, Verringerung der Bcl-2-Expression und Spaltung der Procaspasen 3, 9 und von PARP, also letztendlich zum Zelltod über den intrinsischen Apoptoseweg führt. RRM2: regulatorische Untereinheit M2 der Ribonukleotidreduktase.

Abb. 45 siehe Folgeseite

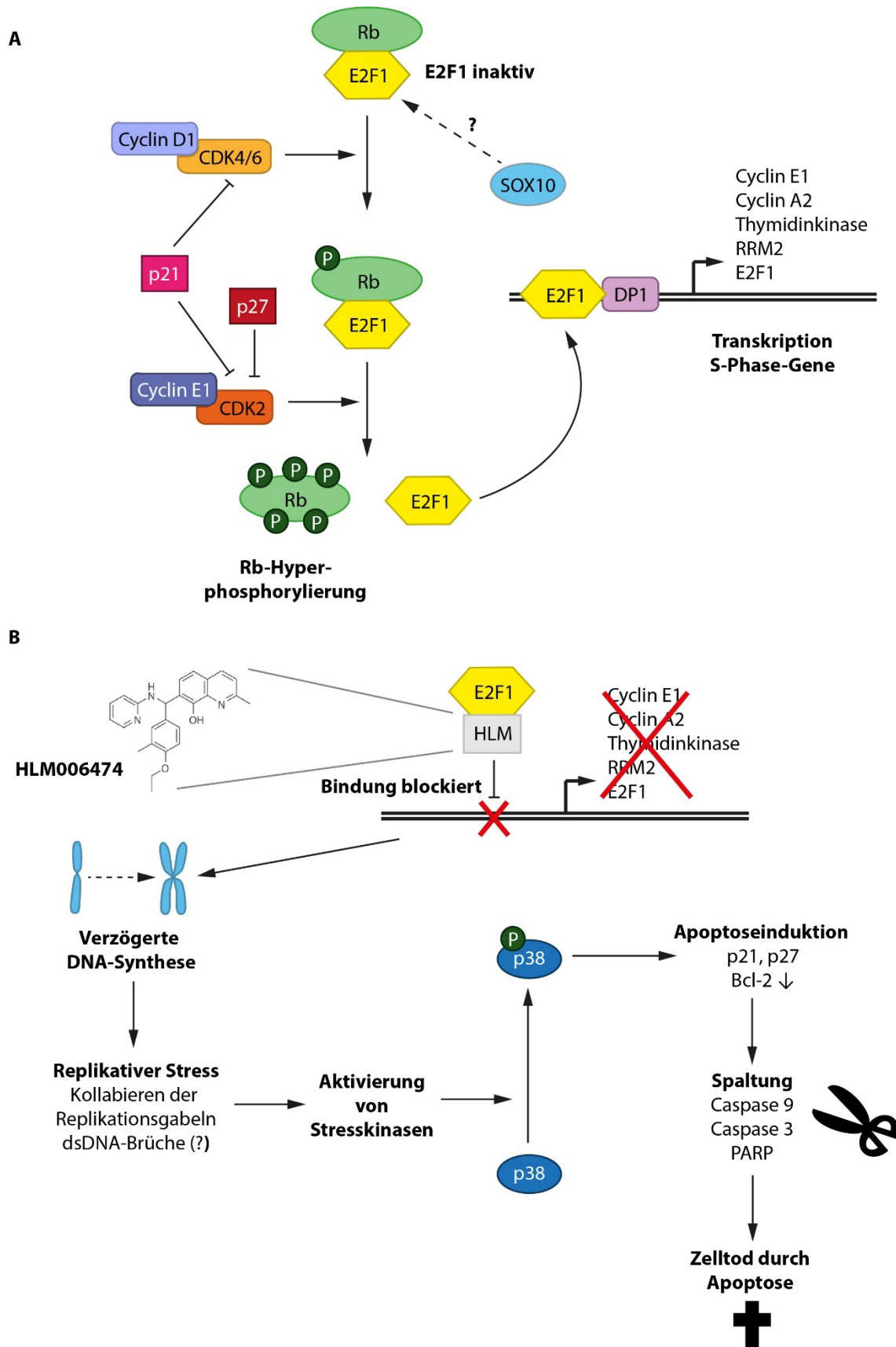


Abb. 45, Beschreibung siehe S. 183

Neben HLM006474 wurde mit dem Nukleosid-Analogon Ly101-4B von Lan et al. ein weiterer pan-E2Fi beschrieben, der die Zellviabilität von Pankreaskarzinomzelllinien verringern konnte [545]. Dieser Inhibitor war zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Arbeit allerdings noch nicht kommerziell erhältlich, weshalb nicht getestet werden konnte, ob dieser auf UM-Zellen einen ähnlichen Effekt ausübt wie HLM006474.

E2F1 wird in zahlreichen Geweben, darunter auch in den verschiedenen Zelltypen der Haut, exprimiert [546, 547], was die Frage nach potenziellen systemischen NW bei einer klinischen Anwendung einer E2F-Inhibitortherapie aufwirft. Interessant ist in diesem Hinblick allerdings, dass HLM006474 die Zellviabilität von humanen Keratinozyten und Melanozyten *in vitro* nicht beeinflusste und bei den damit behandelten Mäusen keine Anzeichen einer Toxizität beobachtet wurden [448]. Ma et al., die den Inhibitor erstmals im Zusammenhang mit E2F-Transkriptionsfaktoren beschrieben, konnten in einem 3D-Hautmodell zwar eine Hemmung der Proliferation der Melanomzelllinie A375 zeigen, aber ebenfalls keine zytotoxischen Effekte auf Keratinozyten sowie auf Fibroblasten erkennen [480]. Bisher gibt es jedoch noch keine Publikationen zum Einsatz in Patienten und es sind derzeit in der Datenbank *clinicaltrials.gov* noch keine klinischen Studien zu HLM006474 oder einem anderen E2Fi registriert.

4.3.2.2 Weitere potenzielle Zielgene: TFRC, FGF9 und EZH2

Neben *E2F1* wurden auch *TFRC*, *EZH2* und *FGF9* als potenzielle Zielstrukturen für eine zielgerichtete Therapie im UM identifiziert und deren Einfluss auf die Zellviabilität von UM-Zellen in ersten *in vitro*-Experimenten untersucht.

Tumorzellen benötigen für das Zellwachstum erhöhte Mengen an Eisen, welches mithilfe des Transferrin-Rezeptors 1 (CD71) in die Zellen aufgenommen wird, der bei einer Vielzahl an Tumorentitäten wie auch dem HCC vermehrt exprimiert wird [459, 463, 466]. Das für CD71 codierende Gen *TFRC* wurde in allen untersuchten UM-Zelllinien exprimiert und die Genexpression von *TFRC* verringerte sich in den Zelllinien 92.1 und Mel270 nach SOX10-Hemmung sowohl in der qPCR- als auch in der RNA-Sequenzierungsanalyse. Allerdings führte die Hemmung von SOX10 in der Zelllinie OMM1.5 zu keinen signifikanten Veränderungen. In dieser Arbeit wurde die Funktion von CD71 durch Inkubation der Zellen mit einem blockierenden anti-CD71-Antikörper gehemmt, um den Einfluss einer CD71-Hemmung auf die Zellviabilität zu testen. In der Zelllinie 92.1 verringerte sich die Zellviabilität nach 7 Tagen der Inkubation mit diesem Antikörper in den höchsten getesteten Konzentrationen von 5 µg/ml und 10 µg/ml. In den beiden anderen getesteten Zelllinien Mel270 und OMM1.5 traten jedoch kaum Effekte auf. Dies könnte möglicherweise daran liegen, dass diese beiden Zelllinien in den Western Blot-Analysen deutlich mehr CD71 exprimierten als die Zelllinie 92.1, sodass die eingesetzte Antikörperkonzentration möglicherweise nicht ausreichend war, um CD71 und damit die Eisenaufnahme effektiv zu blockieren.

In Zellen wird Eisen in Form von Fe³⁺-Ionen im multimeren Protein Ferritin gespeichert, wobei bis zu 4.500 Fe³⁺-Ionen pro Ferritin-Komplex gespeichert werden können [548].

Denkbar wäre daher auch, dass diese beiden Zelllinien möglicherweise über mehr intrazelluläre Eisenvorräte verfügten und daher nicht im selben Maß auf extern über das Zellkulturmedium zugeführte Eisenionen angewiesen waren wie die Zelllinie 92.1. Um diese beiden Hypothesen zu testen, wäre eine Ausdehnung des Versuchs auf eine noch längere Inkubationszeit bzw. eine weitere Erhöhung der eingesetzten Antikörperkonzentration denkbar sowie die Expressionsanalyse weiterer an der Eisenaufnahme und –speicherung beteiligten Proteine wie Divalent Metal Ion Transporter 1 (DMT1) oder Ferritin [459, 549]. Außer durch blockierende Antikörper kann die CD71-Funktion durch Ferristatin (NSC306711) und Ferristatin II (NSC8679, Chlorazolschwarz) moduliert werden [550, 551]. Ferristatin hemmt die Aufnahme von Transferrin, indem es unabhängig von der normalerweise stattfindenden clathrin- und dynamin-abhängigen Endozytose die Internalisierung von ungebundenem CD71 sowie dessen Abbau über lysosomale und proteasomale Abbauwege fördert [551]. Ferristatin II führt wie Ferristatin ebenfalls cholesterin-abhängig zu einer Internalisierung und Degradierung von CD71, allerdings scheint die Bindung von Transferrin an CD71 die Wirkung von Ferristatin II aufheben zu können [550]. *In vivo* konnte in einem Rattenmodell ebenfalls eine Herabregulation von CD71 auf Hepatozyten nach Ferristatin II-Applikation festgestellt werden [550]. Für weitere Analysen der CD71-Funktion im UM wäre es daher auch interessant, die Auswirkungen dieser *small molecules* auf UM-Zellen zu untersuchen.

Die Leber ist zentral an der Eisenhomöostase des Körpers beteiligt, da dort nicht nur essenzielle Proteine des Eisenstoffwechsels wie Hepcidin [552] oder plasmatische Eisen-Transportproteine wie das Transferrin synthetisiert und sezerniert werden [553], sondern das Organ selbst als einer der Haupt-Eisenspeicher des Körpers dient [554]. Vor dem Hintergrund, dass sich die überwiegende Mehrheit der Metastasen bei UM-Patienten in der Leber entwickeln [133-136], stellt sich daher die Frage, ob der Eisenstoffwechsel das Tumorstadium von UM-Zellen möglicherweise fördern kann bzw. das hohe Eisenangebot in der Leber einer der Faktoren ist, der zum außergewöhnlichen Hepatotropismus des UM beiträgt. Die aus einer Lebermetastase generierte UM-Zelllinie OMM1.5 zeigte eine hohe *TFRC*-Gen- bzw. CD71-Proteinexpression, die auf Proteinebene geringfügig und auf Genebene deutlich höher als in der aus dem Primärtumor desselben Patienten generierte Zelllinie Mel270 ausgeprägt war. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass eine erhöhte CD71-Expression im HCC-Tiermodell positiv mit dem Fortschreiten der Erkrankung korreliert ist [468]. Diese Befunde könnten daher erste Hinweise darauf sein, dass CD71 und der Eisenstoffwechsel möglicherweise eine bedeutendere Rolle in UM-Lebermetastasen als in Primärtumoren spielen könnten.

Obwohl es laut der Genexpressionsanalysen zu einer Herabregulation von *TFRC* nach SOX10-Hemmung zumindest in den zwei Zelllinien 92.1 und Mel270 kam, ist anzumerken, dass in den Western Blot-Analysen 48h nach der Transfektion mit SOX10-spezifischen siRNAs keine Veränderungen der CD71-Expression zu beobachten waren. Somit ist davon auszugehen, dass sich die CD71-Proteinexpression in den Zellen durch SOX10-Inhibition nicht veränderte. Bislang finden sich in der Literatur kaum Hinweise zu einem möglichen Zusammenhang von SOX10 und der Transkription von CD71. Cheli et

al. konnten zeigen, dass CD71 für die richtige Entwicklung von Oligodendrozyten wichtig ist, die ebenfalls SOX10-exprimierende Zellen sind, allerdings untersuchten die Autoren nicht, ob SOX10 das *TFRC*-Gen direkt transkriptionell reguliert [555]. Somit bleibt zum jetzigen Zeitpunkt unklar, ob SOX10 die Transkription von *TFRC* direkt moduliert oder nicht bzw. ob eine SOX10-Hemmung wirklich die CD71-Expression nennenswert verringern kann. Dennoch könnte CD71 unabhängig von SOX10 eine wichtige funktionelle Rolle im UM etwa bei der Metastasierung spielen bzw. trotzdem als Zielstruktur für eine zielgerichtete Therapie des UM geeignet sein. Neben der Blockierung der Rezeptorfunktion gäbe es noch andere Ideen zur Nutzung der speziellen Eigenschaften von CD71 für eine therapeutische Anwendung. Dies betrifft insbesondere den Gebrauch des speziellen Internalisierungsmechanismus des Rezeptors, um mithilfe dessen Wirkstoffe gezielt in CD71-hochexprimierende Zellen zu schleusen [467]. Bislang wurden bereits eine Reihe an Transferrin-Medikamenten-Konjugate bzw. CD71-Antikörper-Medikamenten-Konjugate, an welche zytotoxische Substanzen wie etwa Doxorubicin, Mitomycin C, Cisplatin, Diphtherietoxin oder Ricin A gekoppelt wurden, entwickelt und in präklinischen Studien getestet, wo sie in verschiedenen Tumorentitäten teils vielversprechende Ergebnisse erzielten [467]. Erste Medikamente nach diesem Wirkprinzip wurden auch schon in klinischen Studien getestet. Eine Phase-1-Studie mit einem Konjugat aus Transferrin und dem mutierten Diphtherietoxin CRM107 (Tf-CRM107) zeigte bei lokaler Applikation eine Reduzierung der Tumorgroße um 50 % bei neun von 15 behandelten Hirntumorpatienten [556]. In einer Phase-2-Studie konnte Tf-CRM107 fünf CR und sieben PR bei 34 lokal behandelten Gliompatienten erzielen [557]. Zwar wird eine Überexpression von CD71 im Vergleich zum normalen Gewebe in zahlreichen Tumoren gefunden [463], allerdings weisen auch Erythroblasten, die Vorläuferzellen der Erythrozyten, eine hohe CD71-Expression auf [558], sodass vor allem mit dem Auftreten von hämatologischen NW als Folge einer systemischen anti-CD71-Therapie gerechnet wird, wie sie etwa in der Phase-1/2-Studie PROCLAIM-CX-2029 auftraten [559, 560]. Bei letzterer *first-in-human*-Studie wurde die Verträglichkeit des Probody-Wirkstoff-Konjugates CX-2029 getestet, das aus einem maskierten anti-CD71-Antikörper konjugiert mit Monomethylauristatin E besteht und der erst durch die im Tumormikromilieu vorkommenden Proteasen demaskiert wird und so weniger *off-target*-Effekte auf normales Gewebe ausüben soll [560]. Genau diese hemmende Wirkung auf die Erythropoese wäre für die Behandlung der Polycythaemia vera jedoch erwünscht, weshalb in der Phase-1-Studie die Verträglichkeit des humanen monoklonalen CD71-inhibierenden Antikörpers PPMX-T003 getestet wurde [561]. Dabei trat nur bei der höchsten getesteten Dosierung eine Verringerung des Hämoglobingehaltes und bei fünf Teilnehmern eine Verringerung der Retikulozytenzahl auf [561]. An Tag 1 der Antikörperapplikation traten milde bis mittelschwere grippeartige Symptome auf, jedoch keine schwerwiegenden NW [561]. Somit scheint eine Hemmung von CD71 relativ verträglich auch in Hinblick auf die Hemmung der Blutbildung zu sein.

Als weitere Zielstruktur neben E2F1 und CD71 wurde die Histonmethyltransferase EZH2 im *target selection network* identifiziert. EZH2 wurde in allen untersuchten UM-Zelllinien basal exprimiert und war in der RNA-Sequenzierungsanalyse in den Zelllinien 92.1 und

Mel270 geringer exprimiert nach SOX10-Hemmung, dieser Befund konnte jedoch in der Genexpressionsanalyse mittels qPCR nicht bestätigt werden. Ebenso konnten nach SOX10-Hemmung in den Western Blot-Analysen keine Veränderungen der EZH2-Proteinexpression detektiert werden. Die Hemmung von EZH2 mithilfe von Tazemetostat führte nach 96h nur bei der höchsten getesteten Konzentration von 50 μM , die deutlich über der IC_{50} von 11 nM lag [479], zu einer geringfügigen Verringerung der Zellviabilität. Auffällig war in diesem Zusammenhang jedoch, dass bei dieser Konzentration bereits die eingesetzte Menge des Lösungsmittels DMSO zu einer deutlichen Beeinträchtigung der Zellviabilität führte. Es ist daher bei einer weiteren Steigerung der Dosierung davon auszugehen, dass zwar die Zelltoxizität vermutlich noch weiter steigerbar ist, allerdings würde dies nicht unwesentlich auf die erhöhte DMSO-Menge zurückzuführen sein. EZH2 wurde im Kontext des UM bereits untersucht, allerdings mit divergierenden Ergebnissen [456, 457]. Die Ergebnisse dieser Arbeit decken sich mit der Beobachtung von Schoumacher et al., die kaum einen Einfluss von Tazemetostat auf die Kolonienbildung sowie das Zellwachstum von UM-Zelllinien (darunter die BAP1-exprimierende Zelllinie 92.1) beobachten konnten und auch keine Korrelation zwischen dem BAP1-Status und der EZH2-Expression fanden [456]. Abgesehen von Tazemetostat gibt es jedoch noch weitere EZH2-Inhibitoren wie etwa GSK126, welcher die Zellviabilität der Zelllinien 92.1, Mel270, OMM2.3 und OMM-1 verringern konnte, zur Apoptoseinduktion führte sowie das Tumorwachstum im Xenograft-Mausmodell hemmte [457]. Dieser Inhibitor weist mit einer IC_{50} von 9,9 nM eine ähnliche wie Tazemetostat auf [562]. Jin et al. [457] greifen in ihrer Diskussion die Ergebnisse von Schoumacher et al. [456] zwar kurz auf, eine Hypothese zur Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse wie mögliche Unterschiede bezüglich der *off-target*-Effekte der beiden Inhibitoren, die diesen Befund erklären könnten, diskutieren die Autoren jedoch nicht. Zusammengefasst konnten einerseits die Ergebnisse der RNA-Sequenzierung in Bezug auf die Herabregulierung von EZH2 nach SOX10-Hemmung weder in den qPCR- noch in den Western Blot-Analysen reproduziert werden, noch konnte ein zytotoxischer Effekt mit dem EZH2-Inhibitor Tazemetostat beobachtet werden, sodass EZH2 zum jetzigen Zeitpunkt eher kein geeigneter Kandidat für eine therapeutische Inhibition im UM darstellt.

Als vierter möglicher Zielkandidat wurde der Wachstumsfaktor FGF9 für weitere Analysen ausgewählt. Die *FGF9*-Genexpression war mit weitem Abstand am höchsten in der Zelllinie 92.1, allerdings konnten auf Proteinebene nur geringe Unterschiede zwischen den Zelllinien gefunden werden. Nach Hemmung von SOX10 wurde auch nur in dieser Zelllinie eine Abnahme der *FGF9*-Expression beobachtet. Interessanterweise konnte auf Proteinebene bei der Detektion zusätzlich zur bereits bei der basalen Expressionsanalyse detektierten etwa 30 kDa großen Bande eine zweite Bande mit einem etwas geringeren Molekulargewicht in den Zelllinien 92.1 und Mel270 beobachtet werden, deren Intensität nach SOX10-Hemmung zunahm. Bei dieser könnte es sich um die bereits früher beschriebene 29 kDa große Isoform von FGF9 handeln, da FGF9 posttranslational durch N-Glykosylierung im ER modifiziert werden kann und daher Isoformen mit unterschiedlichen Molekulargewichten vorliegen können [477, 478]. Bei der größeren, etwa 30 kDa umfassenden Bande scheint es sich dabei um die N-glykosylierte Form von

FGF9 zu handeln [563]. Die stärkere Ausprägung der kleineren 29 kDa-Bande könnte ein Hinweis darauf sein, dass durch die SOX10-Hemmung möglicherweise die Expression von Enzymen beeinträchtigt wurde, die die N-Glykosylierung vermitteln. Die Hemmung von FGF9 wurde in dieser Arbeit durch Zugabe eines FGF9-neutralisierenden Antikörpers bewirkt, allerdings konnten hier keine Unterschiede in Hinblick auf die Zellviabilität festgestellt werden. Zusammen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass FGF9 im UM einerseits durch SOX10 kaum beeinflusst wird und andererseits für das Überleben der UM-Zellen kaum relevant zu sein scheint. In der Literatur finden sich ebenfalls kaum Hinweise zu FGF9 im UM. Seitz et al. konnten zeigen, dass aktivierte hepatische Sternzellen FGF9 sezernieren und so parakrin die Proliferation von UM-Zellen steigern, so dass die Autoren schlussfolgern, dass FGF9 aus der Tumorumgebung in der Leber zum Hepatotropismus des UM beitragen könnte [476]. Seitz et al. konnten in den von ihnen untersuchten UM-Zelllinien OMM-1, OMM2.5 und Mel270 nur sehr wenig FGF9 nachweisen, insbesondere im Vergleich zu den aktivierten hepatischen Sternzellen ([476] und persönliche Kommunikation mit T. Seitz). Aufgrund dieser geringen Expression von FGF9 und den Beobachtungen dieser Arbeit scheint FGF9 analog zu EZH2 ebenfalls kein geeignetes Ziel für eine zielgerichtete Therapie des UM sein. Dennoch konnten mit E2F1 und TFRC/CD71 zwei Kandidaten mithilfe des *target selection network* identifiziert werden, die sich für eine therapeutische Inhibition im UM prinzipiell eignen und die möglicherweise eine bisher noch unerforschte Rolle beim Krankheitsprogress und der Metastasierung im UM spielen könnten.

4.4 Schlussfolgerung und Ausblick

Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse liefern neue Einblicke in die Tumorbilogie des UM und die Rolle der Transkriptionsfaktoren SOX10 und MITF beim Überleben der Zellen. SOX10 wird im UM exprimiert und ist essenziell für das Überleben von UM-Zellen. Vermittelt wird dieser Effekt unter anderem durch MITF, dessen Transkription direkt durch SOX10 beeinflusst wird. Dieses neue Wissen über die essenzielle Funktion von SOX10 im UM wurde genutzt, um neue Zielstrukturen für eine zielgerichtete Therapie des UM zu finden. Basierend auf den im Rahmen dieser Arbeit generierten RNA-Sequenzierungsdaten nach SOX10-Hemmung und einem bereits existierenden SOX10-Protein-Interaktionsnetzwerk wurde in einem bioinformatischen Ansatz ein neues Netzwerk für die Selektion therapeutisch angreifbarer Zielstrukturen (*target selection network*) generiert. Die daraus ausgewählten ersten vier Kandidaten *E2F1*, *EZH2*, *TFRC* und *FGF9* wurden daraufhin in weiteren *in vitro*-Experimenten untersucht. Besonders E2F1 bzw. der Einsatz des pan-E2Fi HLM006474 zeigte einen deutlichen antiproliferativen Effekt und die Induktion eines Zellzyklusarrests und der Apoptose. Da die hier beschriebenen Experimente im herkömmlich verwendeten zweidimensionalen Zellkultursystem getestet wurden, wäre eine Untersuchung der HLM006474-Wirkung auf UM-Zellen in einem dreidimensionalen System wie etwa Tumorsphäroiden oder im Mausmodell aufschlussreich, bevor über einen Transfer in die klinische Anwendung nachgedacht werden könnte.

Ebenfalls von Interesse wäre auch die weitergehende Analyse von CD71 bzw. der Rolle des Eisenstoffwechsels im UM, insbesondere im Kontext der Metastasierung, beispielsweise durch Behandlung der Zellen mit dem kommerziell erhältlichen *small molecule*-Inhibitor Ferristatin II. Die Resultate der Inhibitionsversuche und Expressionsanalysen mit und ohne SOX10-Hemmung der beiden anderen getesteten Kandidaten EZH2 und FGF9 legen dagegen nahe, dass diese beiden nach derzeitigem Wissensstand keine geeigneten Kandidaten für eine zielgerichtete Therapie des UM darstellen.

Insgesamt liefert diese Arbeit nicht nur neue Erkenntnisse über die Biologie des UM und insbesondere die Rolle der NC-Transkriptionsfaktoren in dieser Tumorentität, sondern demonstriert auch neue Möglichkeiten zur Anwendung des Grundlagenwissens über Transkriptionsfaktoren bei der Entwicklung neuer Therapieansätze für UM-Patienten.

Literaturverzeichnis

1. Singh AD, Bergman L, Seregard S. Uveal melanoma: epidemiologic aspects. *Ophthalmol Clin North Am.* 2005;18(1):75-84, viii.
2. Chang AE, Karnell LH, Menck HR. The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. *Cancer.* 1998;83(8):1664-78.
3. Jager MJ, Shields CL, Cebulla CM, Abdel-Rahman MH, Grossniklaus HE, Stern MH, Carvajal RD, Belfort RN, Jia R, Shields JA, Damato BE. Uveal melanoma. *Nat Rev Dis Primers.* 2020;6(1):24.
4. Shields CL, Furuta M, Thangappan A, Nagori S, Mashayekhi A, Lally DR, Kelly CC, Rudich DS, Nagori AV, Wakade OA, Mehta S, Forte L, Long A, Dellacava EF, Kaplan B, Shields JA. Metastasis of uveal melanoma millimeter-by-millimeter in 8033 consecutive eyes. *Arch Ophthalmol.* 2009;127(8):989-98.
5. Mallone S, De Vries E, Guzzo M, Midena E, Verne J, Coebergh JW, Marcos-Gragera R, Ardanaz E, Martinez R, Chirlaque MD, Navarro C, Virgili G, Rarecare WG. Descriptive epidemiology of malignant mucosal and uveal melanomas and adnexal skin carcinomas in Europe. *Eur J Cancer.* 2012;48(8):1167-75.
6. Singh AD, Turell ME, Topham AK. Uveal melanoma: trends in incidence, treatment, and survival. *Ophthalmology.* 2011;118(9):1881-5.
7. Virgili G, Gatta G, Ciccolallo L, Capocaccia R, Biggeri A, Crocetti E, Lutz JM, Paci E, Group EW. Incidence of uveal melanoma in Europe. *Ophthalmology.* 2007;114(12):2309-15.
8. Stang A, Parkin DM, Ferlay J, Jockel KH. International uveal melanoma incidence trends in view of a decreasing proportion of morphological verification. *Int J Cancer.* 2005;114(1):114-23.
9. Alfaar AS, Saad A, Wiedemann P, Rehak M. The epidemiology of uveal melanoma in Germany: a nationwide report of incidence and survival between 2009 and 2015. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2021.
10. Garbe C, Keim U, Gandini S, Amaral T, Katalinic A, Hollezcek B, Martus P, Flatz L, Leiter U, Whiteman D. Epidemiology of cutaneous melanoma and keratinocyte cancer in white populations 1943-2036. *Eur J Cancer.* 2021;152:18-25.
11. Liu-Smith F, Chiu CY, Johnson DL, Miller PW, Glazer ES, Wu Z, Wilson MW. The Sex Differences in Uveal Melanoma: Potential Roles of EIF1AX, Immune Response and Redox Regulation. *Curr Oncol.* 2021;28(4):2801-11.
12. Stang A, Ahrens W, Anastassiou G, Jockel KH. Phenotypical characteristics, lifestyle, social class and uveal melanoma. *Ophthalmic Epidemiol.* 2003;10(5):293-302.
13. Schmidt-Pokrzywniak A, Jockel KH, Bornfeld N, Sauerwein W, Stang A. Positive interaction between light iris color and ultraviolet radiation in relation to the risk of uveal melanoma: a case-control study. *Ophthalmology.* 2009;116(2):340-8.
14. Houtzagers LE, Wierenga APA, Ruys AAM, Luyten GPM, Jager MJ. Iris Colour and the Risk of Developing Uveal Melanoma. *Int J Mol Sci.* 2020;21(19).
15. Nayman T, Bostan C, Logan P, Burnier MN, Jr. Uveal Melanoma Risk Factors: A Systematic Review of Meta-Analyses. *Curr Eye Res.* 2017;42(8):1085-93.
16. Chien JL, Sioufi K, Surakiatchanukul T, Shields JA, Shields CL. Choroidal nevus: a review of prevalence, features, genetics, risks, and outcomes. *Curr Opin Ophthalmol.* 2017;28(3):228-37.
17. Durante MA, Field MG, Sanchez MI, Covington KR, Decatur CL, Dubovy SR, Harbour JW. Genomic evolution of uveal melanoma arising in ocular melanocytosis. *Cold Spring Harb Mol Case Stud.* 2019;5(4).

18. Abdel-Rahman MH, Pilarski R, Cebulla CM, Massengill JB, Christopher BN, Boru G, Hovland P, Davidorf FH. Germline BAP1 mutation predisposes to uveal melanoma, lung adenocarcinoma, meningioma, and other cancers. *J Med Genet.* 2011;48(12):856-9.
19. Derrien AC, Rodrigues M, Eeckhoutte A, Dayot S, Houy A, Mobuchon L, Gardrat S, Lequin D, Ballet S, Pierron G, Alsafadi S, Mariani O, El-Marjou A, Matet A, Colas C, Cassoux N, Stern MH. Germline MBD4 Mutations and Predisposition to Uveal Melanoma. *J Natl Cancer Inst.* 2021;113(1):80-7.
20. Repo P, Jantti JE, Jarvinen RS, Rantala ES, Tall M, Raivio V, Kivela TT, Turunen JA. Germline loss-of-function variants in MBD4 are rare in Finnish patients with uveal melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2020;33(5):756-62.
21. Singh AD, De Potter P, Fijal BA, Shields CL, Shields JA, Elston RC. Lifetime prevalence of uveal melanoma in white patients with oculo(dermal) melanocytosis. *Ophthalmology.* 1998;105(1):195-8.
22. Shields JA, Shields CL. *Intraocular Tumors: Atlas and Textbook.* 2 ed. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins; 2008. ISBN: 978-0-7817-7580-9.
23. Abdel-Rahman MH, Pilarski R, Ezzat S, Sexton J, Davidorf FH. Cancer family history characterization in an unselected cohort of 121 patients with uveal melanoma. *Fam Cancer.* 2010;9(3):431-8.
24. Harbour JW, Onken MD, Roberson ED, Duan S, Cao L, Worley LA, Council ML, Matatall KA, Helms C, Bowcock AM. Frequent mutation of BAP1 in metastasizing uveal melanomas. *Science.* 2010;330(6009):1410-3.
25. Repo P, Jarvinen RS, Jantti JE, Markkinen S, Tall M, Raivio V, Turunen JA, Kivela TT. Population-based analysis of BAP1 germline variations in patients with uveal melanoma. *Hum Mol Genet.* 2019;28(14):2415-26.
26. Turunen JA, Markkinen S, Wilska R, Saarinen S, Raivio V, Tall M, Lehesjoki AE, Kivela TT. BAP1 Germline Mutations in Finnish Patients with Uveal Melanoma. *Ophthalmology.* 2016;123(5):1112-7.
27. Haugh AM, Njauw CN, Bublely JA, Verzi AE, Zhang B, Kudalkar E, VandenBoom T, Walton K, Swick BL, Kumar R, Rana HQ, Cochrane S, McCormick SR, Shea CR, Tsao H, Gerami P. Genotypic and Phenotypic Features of BAP1 Cancer Syndrome: A Report of 8 New Families and Review of Cases in the Literature. *JAMA Dermatol.* 2017;153(10):999-1006.
28. Rai K, Pilarski R, Boru G, Rehman M, Saqr AH, Massengill JB, Singh A, Marino MJ, Davidorf FH, Cebulla CM, M HA-R. Germline BAP1 alterations in familial uveal melanoma. *Genes Chromosomes Cancer.* 2017;56(2):168-74.
29. Testa JR, Cheung M, Pei J, Below JE, Tan Y, Sementino E, Cox NJ, Dogan AU, Pass HI, Trusa S, Hesdorffer M, Nasu M, Powers A, Rivera Z, Comertpay S, Tanji M, Gaudino G, Yang H, Carbone M. Germline BAP1 mutations predispose to malignant mesothelioma. *Nat Genet.* 2011;43(10):1022-5.
30. Popova T, Hebert L, Jacquemin V, Gad S, Caux-Moncoutier V, Dubois-d'Enghien C, Richaudeau B, Renaudin X, Sellers J, Nicolas A, Sastre-Garau X, Desjardins L, Gyapay G, Raynal V, Sinilnikova OM, Andrieu N, Manie E, de Pauw A, Gesta P, Bonadona V, Maugard CM, Penet C, Avril MF, Barillot E, Cabaret O, Delattre O, Richard S, Caron O, Benfodda M, Hu HH, Soufir N, Bressac-de Pailherets B, Stoppa-Lyonnet D, Stern MH. Germline BAP1 mutations predispose to renal cell carcinomas. *Am J Hum Genet.* 2013;92(6):974-80.
31. Wiesner T, Obenauf AC, Murali R, Fried I, Griewank KG, Ulz P, Windpassinger C, Wackernagel W, Loy S, Wolf I, Viale A, Lash AE, Pirun M, Socci ND, Rutten A, Palmedo G, Abramson D, Offit K, Ott A, Becker JC, Cerroni L, Kutzner H, Bastian BC, Speicher MR. Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nat Genet.* 2011;43(10):1018-21.
32. Singh N, Singh R, Bowen RC, Abdel-Rahman MH, Singh AD. Uveal Melanoma in BAP1 Tumor Predisposition Syndrome: Estimation of Risk. *Am J Ophthalmol.* 2021;224:172-7.
33. Gupta MP, Lane AM, DeAngelis MM, Mayne K, Crabtree M, Gragoudas ES, Kim IK. Clinical Characteristics of Uveal Melanoma in Patients With Germline BAP1 Mutations. *JAMA Ophthalmol.* 2015;133(8):881-7.

34. Aoude LG, Vajdic CM, Krickler A, Armstrong B, Hayward NK. Prevalence of germline BAP1 mutation in a population-based sample of uveal melanoma cases. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013;26(2):278-9.
35. Nathan V, Palmer JM, Johansson PA, Hamilton HR, Warriar SK, Glasson W, McGrath LA, Kahl VFS, Vasireddy RS, Pickett HA, Brooks KM, Pritchard AL, Hayward NK. Loss-of-function variants in POT1 predispose to uveal melanoma. *J Med Genet.* 2021;58(4):234-6.
36. Abdel-Rahman MH, Sample KM, Pilarski R, Walsh T, Grosel T, Kinnamon D, Boru G, Massengill JB, Schoenfield L, Kelly B, Gordon D, Johansson P, DeBenedictis MJ, Singh A, Casadei S, Davidorf FH, White P, Stacey AW, Scarth J, Fewings E, Tischkowitz M, King MC, Hayward NK, Cebulla CM. Whole Exome Sequencing Identifies Candidate Genes Associated with Hereditary Predisposition to Uveal Melanoma. *Ophthalmology.* 2020;127(5):668-78.
37. Thomsen H, Chattopadhyay S, Hoffmann P, Nothen MM, Kalirai H, Coupland SE, Jonas JB, Hemminki K, Forsti A. Genome-wide study on uveal melanoma patients finds association to DNA repair gene TDP1. *Melanoma Res.* 2020;30(2):166-72.
38. Ferguson R, Vogelsang M, Ucisik-Akkaya E, Rai K, Pilarski R, Martinez CN, Rendleman J, Kazlow E, Nagdimov K, Osman I, Klein RJ, Davidorf FH, Cebulla CM, Abdel-Rahman MH, Kirchhoff T. Genetic markers of pigmentation are novel risk loci for uveal melanoma. *Sci Rep.* 2016;6:31191.
39. Sample A, He YY. Mechanisms and prevention of UV-induced melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2018;34(1):13-24.
40. Schadendorf D, van Akkooi ACJ, Berking C, Griewank KG, Gutzmer R, Hauschild A, Stang A, Roesch A, Ugurel S. Melanoma. *Lancet.* 2018;392(10151):971-84.
41. Guenel P, Laforest L, Cyr D, Fevotte J, Sabroe S, Dufour C, Lutz JM, Lynge E. Occupational risk factors, ultraviolet radiation, and ocular melanoma: a case-control study in France. *Cancer Causes Control.* 2001;12(5):451-9.
42. Turaka K, Shields CL, Shah CP, Say EA, Shields JA. Bilateral uveal melanoma in an arc welder. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2011;249(1):141-4.
43. Dixon AJ, Dixon BF. Ultraviolet radiation from welding and possible risk of skin and ocular malignancy. *Med J Aust.* 2004;181(3):155-7.
44. Sliney DH. How light reaches the eye and its components. *Int J Toxicol.* 2002;21(6):501-9.
45. Alexandrov LB, Kim J, Haradhvala NJ, Huang MN, Tian Ng AW, Wu Y, Boot A, Covington KR, Gordenin DA, Bergstrom EN, Islam SMA, Lopez-Bigas N, Klimczak LJ, McPherson JR, Morganella S, Sabarinathan R, Wheeler DA, Mustonen V, Group PMSW, Getz G, Rozen SG, Stratton MR, Consortium P. The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature.* 2020;578(7793):94-101.
46. Johansson PA, Brooks K, Newell F, Palmer JM, Wilmott JS, Pritchard AL, Broit N, Wood S, Carlino MS, Leonard C, Koufariotis LT, Nathan V, Beasley AB, Howie M, Dawson R, Rizos H, Schmidt CW, Long GV, Hamilton H, Kiilgaard JF, Isaacs T, Gray ES, Rolfe OJ, Park JJ, Stark A, Mann GJ, Scolyer RA, Pearson JV, van Baren N, Waddell N, Wadt KW, McGrath LA, Warriar SK, Glasson W, Hayward NK. Whole genome landscapes of uveal melanoma show an ultraviolet radiation signature in iris tumours. *Nat Commun.* 2020;11(1):2408.
47. Furney SJ, Pedersen M, Gentien D, Dumont AG, Rapinat A, Desjardins L, Turajlic S, Piperno-Neumann S, de la Grange P, Roman-Roman S, Stern MH, Marais R. SF3B1 mutations are associated with alternative splicing in uveal melanoma. *Cancer Discov.* 2013;3(10):1122-9.
48. Johnson CP, Kim IK, Esmaeli B, Amin-Mansour A, Treacy DJ, Carter SL, Hodis E, Wagle N, Seepo S, Yu X, Lane AM, Gragoudas ES, Vazquez F, Nickerson E, Cibulskis K, McKenna A, Gabriel SB, Getz G, Van Allen EM, t Hoen PAC, Garraway LA, Woodman SE. Systematic genomic and translational efficiency studies of uveal melanoma. *PLoS One.* 2017;12(6):e0178189.
49. Royer-Bertrand B, Torsello M, Rimoldi D, El Zaoui I, Cisarova K, Pescini-Gobert R, Raynaud F, Zografos L, Schalenbourg A, Speiser D, Nicolas M, Vallat L, Klein R, Leyvraz S, Ciriello G, Riggi N, Moulin AP, Rivolta C. Comprehensive Genetic Landscape of Uveal Melanoma by Whole-Genome Sequencing. *Am J Hum Genet.* 2016;99(5):1190-8.

50. Lutz JM, Cree I, Sabroe S, Kvist TK, Clausen LB, Afonso N, Ahrens W, Ballard TJ, Bell J, Cyr D, Eriksson M, Fevotte J, Guenel P, Hardell L, Jockel KH, Miranda A, Merletti F, Morales-Suarez-Varela MM, Stengrevics A, Lynge E. Occupational risks for uveal melanoma results from a case-control study in nine European countries. *Cancer Causes Control*. 2005;16(4):437-47.
51. Behrens T, Lynge E, Cree I, Lutz JM, Eriksson M, Guenel P, Merletti F, Morales-Suarez-Varela M, Afonso N, Stengrevics A, Fevotte J, Sabroe S, Llopis-Gonzalez A, Gorini G, Hardell L, Stang A, Ahrens W. Pesticide exposure in farming and forestry and the risk of uveal melanoma. *Cancer Causes Control*. 2012;23(1):141-51.
52. Behrens T, Lynge E, Cree I, Lutz JM, Eriksson M, Guenel P, Merletti F, Morales-Suarez-Varela M, Afonso N, Stengrevics A, Stang A, Fevotte J, Sabroe S, Llopis-Gonzalez A, Gorini G, Hardell L, Ahrens W. Occupational exposure to endocrine-disrupting chemicals and the risk of uveal melanoma. *Scand J Work Environ Health*. 2012;38(5):476-83.
53. Kamiyama T, Aoki N, Yuasa Y. B-raf oncogene: activation by rearrangements and assignment to human chromosome 7. *Jpn J Cancer Res*. 1993;84(3):250-6.
54. Mitchell EL, Jones D, White GR, Varley JM, Santibanez Koref MF. Determination of the gene order of the three loci CD2, NGFB, and NRAS at human chromosome band 1p13 and refinement of their localisation at the subband level by fluorescence in situ hybridisation. *Cytogenet Cell Genet*. 1995;70(3-4):183-5.
55. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, Teague J, Woffendin H, Garnett MJ, Bottomley W, Davis N, Dicks E, Ewing R, Floyd Y, Gray K, Hall S, Hawes R, Hughes J, Kosmidou V, Menzies A, Mould C, Parker A, Stevens C, Watt S, Hooper S, Wilson R, Jayatilake H, Gusterson BA, Cooper C, Shipley J, Hargrave D, Pritchard-Jones K, Maitland N, Chenevix-Trench G, Riggins GJ, Bigner DD, Palmieri G, Cossu A, Flanagan A, Nicholson A, Ho JW, Leung SY, Yuen ST, Weber BL, Seigler HF, Darrow TL, Paterson H, Marais R, Marshall CJ, Wooster R, Stratton MR, Futreal PA. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.
56. Burd CE, Liu W, Huynh MV, Waqas MA, Gillahan JE, Clark KS, Fu K, Martin BL, Jeck WR, Souroullas GP, Darr DB, Zedek DC, Miley MJ, Baguley BC, Campbell SL, Sharpless NE. Mutation-specific RAS oncogenicity explains NRAS codon 61 selection in melanoma. *Cancer Discov*. 2014;4(12):1418-29.
57. Lee JH, Choi JW, Kim YS. Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *Br J Dermatol*. 2011;164(4):776-84.
58. Cancer Genome Atlas Network. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015;161(7):1681-96.
59. Larsen AC, Dahl C, Dahmcke CM, Lade-Keller J, Siersma VD, Toft PB, Coupland SE, Prause JU, Guldberg P, Heegaard S. BRAF mutations in conjunctival melanoma: investigation of incidence, clinicopathological features, prognosis and paired premalignant lesions. *Acta Ophthalmol*. 2016;94(5):463-70.
60. Griewank KG, Westekemper H, Murali R, Mach M, Schilling B, Wiesner T, Schimming T, Livingstone E, Sucker A, Grabellus F, Metz C, Susskind D, Hillen U, Speicher MR, Woodman SE, Steuhl KP, Schadendorf D. Conjunctival melanomas harbor BRAF and NRAS mutations and copy number changes similar to cutaneous and mucosal melanomas. *Clin Cancer Res*. 2013;19(12):3143-52.
61. Wallace MR, Marchuk DA, Andersen LB, Letcher R, Odeh HM, Saulino AM, Fountain JW, Brereton A, Nicholson J, Mitchell AL, et al. Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients. *Science*. 1990;249(4965):181-6.
62. Vandenbark GR, deCastro CM, Taylor H, Dew-Knight S, Kaufman RE. Cloning and structural analysis of the human c-kit gene. *Oncogene*. 1992;7(7):1259-66.
63. Meng D, Carvajal RD. KIT as an Oncogenic Driver in Melanoma: An Update on Clinical Development. *Am J Clin Dermatol*. 2019;20(3):315-23.
64. Takata M, Goto Y, Ichii N, Yamaura M, Murata H, Koga H, Fujimoto A, Saida T. Constitutive activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in acral melanomas. *J Invest Dermatol*. 2005;125(2):318-22.

65. Edmunds SC, Cree IA, Di Nicolantonio F, Hungerford JL, Hurren JS, Kelsell DP. Absence of BRAF gene mutations in uveal melanomas in contrast to cutaneous melanomas. *Br J Cancer*. 2003;88(9):1403-5.
66. Johansson P, Aoude LG, Wadt K, Glasson WJ, Warriar SK, Hewitt AW, Kiilgaard JF, Heegaard S, Isaacs T, Franchina M, Ingvar C, Vermeulen T, Whitehead KJ, Schmidt CW, Palmer JM, Symmons J, Gerdes AM, Jonsson G, Hayward NK. Deep sequencing of uveal melanoma identifies a recurrent mutation in PLCB4. *Oncotarget*. 2016;7(4):4624-31.
67. Chalmers ZR, Connelly CF, Fabrizio D, Gay L, Ali SM, Ennis R, Schrock A, Campbell B, Shlien A, Chmielecki J, Huang F, He Y, Sun J, Tabori U, Kennedy M, Lieber DS, Roels S, White J, Otto GA, Ross JS, Garraway L, Miller VA, Stephens PJ, Frampton GM. Analysis of 100,000 human cancer genomes reveals the landscape of tumor mutational burden. *Genome Med*. 2017;9(1):34.
68. Zhang Q, Lin ZN, Chen J, Zheng WX. A multi-omics study on cutaneous and uveal melanoma. *Int J Ophthalmol*. 2021;14(1):32-41.
69. Dong Q, Shenker A, Way J, Haddad BR, Lin K, Hughes MR, McBride OW, Spiegel AM, Battey J. Molecular cloning of human G alpha q cDNA and chromosomal localization of the G alpha q gene (GNAQ) and a processed pseudogene. *Genomics*. 1995;30(3):470-75.
70. Wilkie TM, Gilbert DJ, Olsen AS, Chen XN, Amatruda TT, Korenberg JR, Trask BJ, de Jong P, Reed RR, Simon MI, et al. Evolution of the mammalian G protein alpha subunit multigene family. *Nat Genet*. 1992;1(2):85-91.
71. Van Raamsdonk CD, Bezrookove V, Green G, Bauer J, Gaugler L, O'Brien JM, Simpson EM, Barsh GS, Bastian BC. Frequent somatic mutations of GNAQ in uveal melanoma and blue naevi. *Nature*. 2009;457(7229):599-602.
72. Neves SR, Ram PT, Iyengar R. G protein pathways. *Science*. 2002;296(5573):1636-9.
73. Scholz SL, Moller I, Reis H, Susskind D, van de Nes JAP, Leonardelli S, Schilling B, Livingstone E, Schimming T, Paschen A, Sucker A, Murali R, Steuhl KP, Schadendorf D, Westekemper H, Griewank KG. Frequent GNAQ, GNA11, and EIF1AX Mutations in Iris Melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2017;58(9):3464-70.
74. Moore AR, Ceraudo E, Sher JJ, Guan Y, Shoushtari AN, Chang MT, Zhang JQ, Walczak EG, Kazmi MA, Taylor BS, Huber T, Chi P, Sakmar TP, Chen Y. Recurrent activating mutations of G-protein-coupled receptor CYSLTR2 in uveal melanoma. *Nat Genet*. 2016;48(6):675-80.
75. Robertson AG, Shih J, Yau C, Gibb EA, Oba J, Mungall KL, Hess JM, Uzunangelov V, Walter V, Danilova L, Lichtenberg TM, Kucherlapati M, Kimes PK, Tang M, Penson A, Babur O, Akbani R, Bristow CA, Hoadley KA, Iype L, Chang MT, Network TR, Cherniack AD, Benz C, Mills GB, Verhaak RGW, Griewank KG, Felau I, Zenklusen JC, Gershenwald JE, Schoenfield L, Lazar AJ, Abdel-Rahman MH, Roman-Roman S, Stern MH, Cebulla CM, Williams MD, Jager MJ, Coupland SE, Esmaeli B, Kandoth C, Woodman SE. Integrative Analysis Identifies Four Molecular and Clinical Subsets in Uveal Melanoma. *Cancer Cell*. 2017;32(2):204-20 e15.
76. Van Raamsdonk CD, Griewank KG, Crosby MB, Garrido MC, Vemula S, Wiesner T, Obenaus AC, Wackernagel W, Green G, Bouvier N, Sozen MM, Baimukanova G, Roy R, Heguy A, Dolgalev I, Khanin R, Busam K, Speicher MR, O'Brien J, Bastian BC. Mutations in GNA11 in uveal melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(23):2191-9.
77. Griewank KG, Muller H, Jakkett LA, Emberger M, Moller I, van de Nes JA, Zimmer L, Livingstone E, Wiesner T, Scholz SL, Cosgarea I, Sucker A, Schimming T, Hillen U, Schilling B, Paschen A, Reis H, Mentzel T, Kutzner H, Rutten A, Murali R, Scolyer RA, Schadendorf D. SF3B1 and BAP1 mutations in blue nevus-like melanoma. *Mod Pathol*. 2017;30(7):928-39.
78. Markby DW, Onrust R, Bourne HR. Separate GTP binding and GTPase activating domains of a G alpha subunit. *Science*. 1993;262(5141):1895-901.
79. Khalili JS, Yu X, Wang J, Hayes BC, Davies MA, Lizée G, Esmaeli B, Woodman SE. Combination small molecule MEK and PI3K inhibition enhances uveal melanoma cell death in a mutant GNAQ- and GNA11-dependent manner. *Clin Cancer Res*. 2012;18(16):4345-55.
80. Feng X, Degese MS, Iglesias-Bartolome R, Vaque JP, Molinolo AA, Rodrigues M, Zaidi MR, Ksander BR, Merlino G, Sodhi A, Chen Q, Gutkind JS. Hippo-independent activation of YAP

by the GNAQ uveal melanoma oncogene through a trio-regulated rho GTPase signaling circuitry. *Cancer Cell*. 2014;25(6):831-45.

81. Feng X, Arang N, Rigracciolo DC, Lee JS, Yeerna H, Wang Z, Lubrano S, Kishore A, Pachter JA, Konig GM, Maggiolini M, Kostenis E, Schlaepfer DD, Tamayo P, Chen Q, Ruppin E, Gutkind JS. A Platform of Synthetic Lethal Gene Interaction Networks Reveals that the GNAQ Uveal Melanoma Oncogene Controls the Hippo Pathway through FAK. *Cancer Cell*. 2019;35(3):457-72 e5.

82. Park JJ, Diefenbach RJ, Joshua AM, Kefferd RF, Carlino MS, Rizos H. Oncogenic signaling in uveal melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2018;31(6):661-72.

83. Carvajal RD, Schwartz GK, Tezel T, Marr B, Francis JH, Nathan PD. Metastatic disease from uveal melanoma: treatment options and future prospects. *Br J Ophthalmol*. 2017;101(1):38-44.

84. Field MG, Durante MA, Anbunathan H, Cai LZ, Decatur CL, Bowcock AM, Kurtenbach S, Harbour JW. Punctuated evolution of canonical genomic aberrations in uveal melanoma. *Nat Commun*. 2018;9(1):116.

85. Johnson DB, Roszik J, Shoushtari AN, Eroglu Z, Balko JM, Higham C, Puzanov I, Patel SP, Sosman JA, Woodman SE. Comparative analysis of the GNAQ, GNA11, SF3B1, and EIF1AX driver mutations in melanoma and across the cancer spectrum. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2016;29(4):470-3.

86. Livingstone E, Zaremba A, Horn S, Ugurel S, Casalini B, Schlaak M, Hassel JC, Herbst R, Utikal JS, Weide B, Gutzmer R, Meier F, Koelsche C, Hadaschik E, Sucker A, Reis H, Merkelbach-Bruse S, Siewert M, Sahm F, von Deimling A, Cosgarea I, Zimmer L, Schadendorf D, Schilling B, Griewank KG. GNAQ and GNA11 mutant nonuveal melanoma: a subtype distinct from both cutaneous and uveal melanoma. *Br J Dermatol*. 2020;183(5):928-39.

87. Lapadula D, Farias E, Randolph CE, Purwin TJ, McGrath D, Charpentier TH, Zhang L, Wu S, Terai M, Sato T, Tall GG, Zhou N, Wedegaertner PB, Aplin AE, Aguirre-Ghiso J, Benovic JL. Effects of Oncogenic Gα(q) and Gα(11) Inhibition by FR900359 in Uveal Melanoma. *Mol Cancer Res*. 2019;17(4):963-73.

88. Onken MD, Makepeace CM, Kaltenbronn KM, Choi J, Hernandez-Aya L, Weilbaecher KN, Piggott KD, Rao PK, Yuede CM, Dixon AJ, Osei-Owusu P, Cooper JA, Blumer KJ. Targeting primary and metastatic uveal melanoma with a G protein inhibitor. *J Biol Chem*. 2021;296:100403.

89. Kostenis E, Pfeil EM, Annala S. Heterotrimeric G(q) proteins as therapeutic targets? *J Biol Chem*. 2020;295(16):5206-15.

90. Switzer B, Piperno-Neumann S, Lyon J, Buchbinder E, Puzanov I. Evolving Management of Stage IV Melanoma. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 2023(43):e397478.

91. Jensen DE, Proctor M, Marquis ST, Gardner HP, Ha SI, Chodosh LA, Ishov AM, Tommerup N, Vissing H, Sekido Y, Minna J, Borodovsky A, Schultz DC, Wilkinson KD, Maul GG, Barlev N, Berger SL, Prendergast GC, Rauscher FJ, 3rd. BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene*. 1998;16(9):1097-112.

92. Masclef L, Ahmed O, Estavoyer B, Larrivee B, Labrecque N, Nijnik A, Affar EB. Roles and mechanisms of BAP1 deubiquitinase in tumor suppression. *Cell Death Differ*. 2021;28(2):606-25.

93. Pan H, Jia R, Zhang L, Xu S, Wu Q, Song X, Zhang H, Ge S, Xu XL, Fan X. BAP1 regulates cell cycle progression through E2F1 target genes and mediates transcriptional silencing via H2A monoubiquitination in uveal melanoma cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 2015;60:176-84.

94. Matatall KA, Agapova OA, Onken MD, Worley LA, Bowcock AM, Harbour JW. BAP1 deficiency causes loss of melanocytic cell identity in uveal melanoma. *BMC Cancer*. 2013;13:371.

95. Manes G, Hebrard M, Bocquet B, Meunier I, Coustes-Chazalette D, Senechal A, Bolland-Auge A, Zelenika D, Hamel CP. A novel locus (CORD12) for autosomal dominant cone-rod dystrophy on chromosome 2q24.2-2q33.1. *BMC Med Genet*. 2011;12:54.

96. Maji D, Grossfield A, Kielkopf CL. Structures of SF3b1 reveal a dynamic Achilles heel of spliceosome assembly: Implications for cancer-associated abnormalities and drug discovery. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech.* 2019;1862(11-12):194440.
97. Martin M, Masshofer L, Temming P, Rahmann S, Metz C, Bornfeld N, van de Nes J, Klein-Hitpass L, Hinnebusch AG, Horsthemke B, Lohmann DR, Zeschnigk M. Exome sequencing identifies recurrent somatic mutations in EIF1AX and SF3B1 in uveal melanoma with disomy 3. *Nat Genet.* 2013;45(8):933-6.
98. Harbour JW, Roberson ED, Anbunathan H, Onken MD, Worley LA, Bowcock AM. Recurrent mutations at codon 625 of the splicing factor SF3B1 in uveal melanoma. *Nat Genet.* 2013;45(2):133-5.
99. Bigot J, Lalanne AI, Lucibello F, Gueguen P, Houy A, Dayot S, Ganier O, Gilet J, Tosello J, Nemati F, Pierron G, Waterfall JJ, Barnhill R, Gardrat S, Piperno-Neumann S, Popova T, Masson V, Loew D, Mariani P, Cassoux N, Amigorena S, Rodrigues M, Alsafadi S, Stern MH, Lantz O. Splicing Patterns in SF3B1-Mutated Uveal Melanoma Generate Shared Immunogenic Tumor-Specific Neopeptides. *Cancer Discov.* 2021;11(8):1938-51.
100. Pestova TV, Borukhov SI, Hellen CU. Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature.* 1998;394(6696):854-9.
101. Mitchell SF, Lorsch JR. Should I stay or should I go? Eukaryotic translation initiation factors 1 and 1A control start codon recognition. *J Biol Chem.* 2008;283(41):27345-9.
102. Singh RK, Gupta S, Dastidar S, Ray A. Cysteinyl leukotrienes and their receptors: molecular and functional characteristics. *Pharmacology.* 2010;85(6):336-49.
103. Ceraudo E, Horioka M, Mattheisen JM, Hitchman TD, Moore AR, Kazmi MA, Chi P, Chen Y, Sakmar TP, Huber T. Direct evidence that the GPCR CysLTR2 mutant causative of uveal melanoma is constitutively active with highly biased signaling. *J Biol Chem.* 2021;296:100163.
104. Alvarez RA, Ghalayini AJ, Xu P, Hardcastle A, Bhattacharya S, Rao PN, Pettenati MJ, Anderson RE, Baehr W. cDNA sequence and gene locus of the human retinal phosphoinositide-specific phospholipase-C beta 4 (PLCB4). *Genomics.* 1995;29(1):53-61.
105. Cocco L, Follo MY, Manzoli L, Suh PG. Phosphoinositide-specific phospholipase C in health and disease. *J Lipid Res.* 2015;56(10):1853-60.
106. Martelli AM, Evangelisti C, Nyakern M, Manzoli FA. Nuclear protein kinase C. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1761(5-6):542-51.
107. Owusu Obeng E, Rusciano I, Marvi MV, Fazio A, Ratti S, Follo MY, Xian J, Manzoli L, Billi AM, Mongiorgi S, Ramazzotti G, Cocco L. Phosphoinositide-Dependent Signaling in Cancer: A Focus on Phospholipase C Isozymes. *Int J Mol Sci.* 2020;21(7).
108. Phan HTN, Kim NH, Wei W, Tall GG, Smrcka AV. Uveal melanoma-associated mutations in PLCbeta4 are constitutively activating and promote melanocyte proliferation and tumorigenesis. *Sci Signal.* 2021;14(713):eabj4243.
109. Sjolund AB, Senejani AG, Sweasy JB. MBD4 and TDG: multifaceted DNA glycosylases with ever expanding biological roles. *Mutat Res.* 2013;743-744:12-25.
110. Rodrigues M, Mobuchon L, Houy A, Fievet A, Gardrat S, Barnhill RL, Popova T, Servois V, Rampanou A, Mouton A, Dayot S, Raynal V, Galut M, Putterman M, Tick S, Cassoux N, Roman-Roman S, Bidard FC, Lantz O, Mariani P, Piperno-Neumann S, Stern MH. Outlier response to anti-PD1 in uveal melanoma reveals germline MBD4 mutations in hypermutated tumors. *Nat Commun.* 2018;9(1):1866.
111. Johansson PA, Stark A, Palmer JM, Bigby K, Brooks K, Rolfe O, Pritchard AL, Whitehead K, Warrier S, Glasson W, Hayward NK. Prolonged stable disease in a uveal melanoma patient with germline MBD4 nonsense mutation treated with pembrolizumab and ipilimumab. *Immunogenetics.* 2019;71(5-6):433-6.
112. Rodrigues M, Mobuchon L, Houy A, Alsafadi S, Baulande S, Mariani O, Marande B, Ait Rais K, Van der Kooij MK, Kapiteijn E, Gassama S, Gardrat S, Barnhill RL, Servois V, Dendale R, Putterman M, Tick S, Piperno-Neumann S, Cassoux N, Pierron G, Waterfall JJ, Roman-Roman S, Mariani P, Stern MH. Evolutionary Routes in Metastatic Uveal Melanomas Depend on MBD4 Alterations. *Clin Cancer Res.* 2019;25(18):5513-24.

113. Horsman DE, White VA. Cytogenetic analysis of uveal melanoma. Consistent occurrence of monosomy 3 and trisomy 8q. *Cancer*. 1993;71(3):811-9.
114. Kilic E, van Gils W, Lodder E, Beverloo HB, van Til ME, Mooy CM, Paridaens D, de Klein A, Luyten GP. Clinical and cytogenetic analyses in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006;47(9):3703-7.
115. Aalto Y, Eriksson L, Seregard S, Larsson O, Knuutila S. Concomitant loss of chromosome 3 and whole arm losses and gains of chromosome 1, 6, or 8 in metastasizing primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2001;42(2):313-7.
116. Onken MD, Worley LA, Ehlers JP, Harbour JW. Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death. *Cancer Res*. 2004;64(20):7205-9.
117. Onken MD, Ehlers JP, Worley LA, Makita J, Yokota Y, Harbour JW. Functional gene expression analysis uncovers phenotypic switch in aggressive uveal melanomas. *Cancer Res*. 2006;66(9):4602-9.
118. Karlsson J, Nilsson LM, Mitra S, Alsen S, Shelke GV, Sah VR, Forsberg EMV, Stierner U, All-Eriksson C, Einarsdottir B, Jespersen H, Ny L, Lindner P, Larsson E, Olofsson Bagge R, Nilsson JA. Molecular profiling of driver events in metastatic uveal melanoma. *Nat Commun*. 2020;11(1):1894.
119. Steeb T, Wessely A, Alter M, Bayerl C, Bender A, Bruning G, Dabrowski E, Debus D, Devereux N, Dippel E, Drexler K, Ducker P, Dummer R, Emmert S, Elsner P, Enk A, Gebhardt C, Gesierich A, Goebeler M, Goerdts S, Goetze S, Gutzmer R, Haferkamp S, Hansel G, Hassel JC, Heinzerling L, Kahler KC, Kaume KM, Krapf W, Kreuzberg N, Lehmann P, Livingstone E, Loffler H, Loquai C, Mauch C, Mangana J, Meier F, Meissner M, Moritz RKC, Maul LV, Muller V, Mohr P, Navarini A, Van Nguyen A, Pfeiffer C, Pfohler C, Posch C, Richtig E, Rompel R, Sachse MM, Sauder S, Schadendorf D, Schatton K, Schulze HJ, Schultz E, Schilling B, Schmuth M, Simon JC, Streit M, Terheyden P, Thiem A, Tuting T, Welzel J, Weyandt G, Wesselmann U, Wollina U, Ziemer M, Zimmer L, Zutt M, Berking C, Schlaak M, Heppt MV, German Dermatologic Cooperative Oncology G. Patterns of care and follow-up care of patients with uveal melanoma in German-speaking countries: a multinational survey of the German Dermatologic Cooperative Oncology Group (DeCOG). *J Cancer Res Clin Oncol*. 2021;147(6):1763-71.
120. Bechrakis NE, Bornfeld N, Heindl LM, Skoetz N, Leyvraz S, Jousseaume AM. Uveal Melanoma - Standardised Procedure in Diagnosis, Therapy and Surveillance. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2021;238(7):761-72.
121. Damato EM, Damato BE. Detection and time to treatment of uveal melanoma in the United Kingdom: an evaluation of 2,384 patients. *Ophthalmology*. 2012;119(8):1582-9.
122. Frizziero L, Midena E, Trainiti S, Londei D, Bonaldi L, Bini S, Parrozzani R. Uveal Melanoma Biopsy: A Review. *Cancers (Basel)*. 2019;11(8).
123. Bagger MM. Intraocular biopsy of uveal melanoma Risk assessment and identification of genetic prognostic markers. *Acta Ophthalmol*. 2018;96 Suppl A112:1-28.
124. Griewank KG, Murali R. Pathology and genetics of uveal melanoma. *Pathology*. 2013;45(1):18-27.
125. American Joint Committee on Cancer (AJCC). *AJCC Cancer Staging Manual* (8th edition): Springer International Publishing; 2017. ISBN: 978-3-319-40617-6.
126. Wilkinson DA, Kolar M, Fleming PA, Singh AD. Dosimetric comparison of 106Ru and 125I plaques for treatment of shallow (≤ 5 mm) choroidal melanoma lesions. *Br J Radiol*. 2008;81(970):784-9.
127. Buonanno F, Conson M, de Almeida Ribeiro C, Oliviero C, Itta F, Liuzzi R, Pacelli R, Cella L, Clemente S. Local tumor control and treatment related toxicity after plaque brachytherapy for uveal melanoma: A systematic review and a data pooled analysis. *Radiother Oncol*. 2022;166:15-25.
128. Eibl-Lindner K, Furweger C, Nentwich M, Foerster P, Wowra B, Schaller U, Muacevic A. Robotic radiosurgery for the treatment of medium and large uveal melanoma. *Melanoma Res*. 2016;26(1):51-7.

129. Schmelter V, Heidorn S, Muacevic A, Priglinger SG, Foerster P, Liegl R. Robotic assisted CyberKnife radiosurgery for the treatment of iris melanoma. *Sci Rep*. 2021;11(1):5685.
130. Groenewald C, Konstantinidis L, Damato B. Effects of radiotherapy on uveal melanomas and adjacent tissues. *Eye (Lond)*. 2013;27(2):163-71.
131. Chattopadhyay C, Kim DW, Gombos DS, Oba J, Qin Y, Williams MD, Esmaeli B, Grimm EA, Wargo JA, Woodman SE, Patel SP. Uveal melanoma: From diagnosis to treatment and the science in between. *Cancer*. 2016;122(15):2299-312.
132. Collaborative Ocular Melanoma Study Group. The COMS randomized trial of iodine 125 brachytherapy for choroidal melanoma: V. Twelve-year mortality rates and prognostic factors: COMS report No. 28. *Arch Ophthalmol*. 2006;124(12):1684-93.
133. Lorigan JG, Wallace S, Mavligit GM. The prevalence and location of metastases from ocular melanoma: imaging study in 110 patients. *AJR Am J Roentgenol*. 1991;157(6):1279-81.
134. Garg G, Finger PT, Kivela TT, Simpson ER, Gallie BL, Saakyan S, Amiryan AG, Valskiy V, Chin KJ, Semenova E, Seregard S, Fili M, Wilson M, Haik B, Caminal JM, Catala-Mora J, Gutierrez C, Pelayes DE, Folgar AM, Jager MJ, Dogrusoz M, Luyten GPM, Singh AD, Suzuki S, Force AOOT. Patients presenting with metastases: stage IV uveal melanoma, an international study. *Br J Ophthalmol*. 2022;106(4):510-7.
135. Kujala E, Makitie T, Kivela T. Very long-term prognosis of patients with malignant uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(11):4651-9.
136. Collaborative Ocular Melanoma Study Group. Assessment of metastatic disease status at death in 435 patients with large choroidal melanoma in the Collaborative Ocular Melanoma Study (COMS): COMS report no. 15. *Arch Ophthalmol*. 2001;119(5):670-6.
137. Wu X, Zhou J, Rogers AM, Janne PA, Benedettini E, Loda M, Hodi FS. c-Met, epidermal growth factor receptor, and insulin-like growth factor-1 receptor are important for growth in uveal melanoma and independently contribute to migration and metastatic potential. *Melanoma Res*. 2012;22(2):123-32.
138. Van den Eynden GG, Majeed AW, Illemann M, Vermeulen PB, Bird NC, Hoyer-Hansen G, Eefsen RL, Reynolds AR, Brodt P. The multifaceted role of the microenvironment in liver metastasis: biology and clinical implications. *Cancer Res*. 2013;73(7):2031-43.
139. Nemeth E, Baird AW, O'Farrelly C. Microanatomy of the liver immune system. *Semin Immunopathol*. 2009;31(3):333-43.
140. Gao B, Jeong WI, Tian Z. Liver: An organ with predominant innate immunity. *Hepatology*. 2008;47(2):729-36.
141. Mariani P, Piperno-Neumann S, Servois V, Berry MG, Dorval T, Plancher C, Couturier J, Levy-Gabriel C, Lumbroso-Le Rouic L, Desjardins L, Salmon RJ. Surgical management of liver metastases from uveal melanoma: 16 years' experience at the Institut Curie. *Eur J Surg Oncol*. 2009;35(11):1192-7.
142. Lee EW, Thakor AS, Tafti BA, Liu DM. Y90 selective internal radiation therapy. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015;24(1):167-85.
143. Alexander H, Wen D, Chu M, Han C, Hadden P, Thomas R, Bartlett A. Selective internal radiation therapy for hepatic metastases of uveal melanoma: a systematic review. *Br J Radiol*. 2022;95(1129):20210200.
144. Izzo F, Granata V, Grassi R, Fusco R, Palaia R, Delrio P, Carrafiello G, Azoulay D, Petrillo A, Curley SA. Radiofrequency Ablation and Microwave Ablation in Liver Tumors: An Update. *Oncologist*. 2019;24(10):e990-e1005.
145. Mariani P, Almubarak MM, Kollen M, Wagner M, Plancher C, Audollent R, Piperno-Neumann S, Cassoux N, Servois V. Radiofrequency ablation and surgical resection of liver metastases from uveal melanoma. *Eur J Surg Oncol*. 2016;42(5):706-12.
146. Servois V, Bouhadiba T, Dureau S, Da Costa C, Almubarak MM, Foucher R, Savignoni A, Cassoux N, Pierron G, Mariani P. Iterative treatment with surgery and radiofrequency ablation of uveal melanoma liver metastasis: Retrospective analysis of a series of very long-term survivors. *Eur J Surg Oncol*. 2019;45(9):1717-22.

147. Puippe G, Pfammatter T, Schaefer N. Arterial Therapies of Non-Colorectal Liver Metastases. *Viszeralmedizin*. 2015;31(6):414-22.
148. Vogl T, Eichler K, Zangos S, Herzog C, Hammerstingl R, Balzer J, Gholami A. Preliminary experience with transarterial chemoembolization (TACE) in liver metastases of uveal malignant melanoma: local tumor control and survival. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2007;133(3):177-84.
149. Schuster R, Lindner M, Wacker F, Krossin M, Bechrakis N, Foerster MH, Thiel E, Keilholz U, Schmittel A. Transarterial chemoembolization of liver metastases from uveal melanoma after failure of systemic therapy: toxicity and outcome. *Melanoma Res*. 2010;20(3):191-6.
150. Agarwala SS, Panikkar R, Kirkwood JM. Phase I/II randomized trial of intrahepatic arterial infusion chemotherapy with cisplatin and chemoembolization with cisplatin and polyvinyl sponge in patients with ocular melanoma metastatic to the liver. *Melanoma Res*. 2004;14(3):217-22.
151. Huppert PE, Fierlbeck G, Pereira P, Schanz S, Duda SH, Wietholtz H, Rozeik C, Claussen CD. Transarterial chemoembolization of liver metastases in patients with uveal melanoma. *Eur J Radiol*. 2010;74(3):e38-44.
152. Alexander HR, Jr., Butler CC. Development of isolated hepatic perfusion via the operative and percutaneous techniques for patients with isolated and unresectable liver metastases. *Cancer J*. 2010;16(2):132-41.
153. Broman KK, Zager JS. Intra-arterial perfusion-based therapies for regionally metastatic cutaneous and uveal melanoma. *Melanoma Manag*. 2019;6(3):MMT26.
154. Hughes MS, Zager J, Faries M, Alexander HR, Royal RE, Wood B, Choi J, McCluskey K, Whitman E, Agarwala S, Siskin G, Nutting C, Toomey MA, Webb C, Beresnev T, Pingpank JF. Results of a Randomized Controlled Multicenter Phase III Trial of Percutaneous Hepatic Perfusion Compared with Best Available Care for Patients with Melanoma Liver Metastases. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(4):1309-19.
155. Pingpank JF, Libutti SK, Chang R, Wood BJ, Neeman Z, Kam AW, Figg WD, Zhai S, Beresneva T, Seidel GD, Alexander HR. Phase I study of hepatic arterial melphalan infusion and hepatic venous hemofiltration using percutaneously placed catheters in patients with unresectable hepatic malignancies. *J Clin Oncol*. 2005;23(15):3465-74.
156. Karydis I, Gangi A, Wheeler MJ, Choi J, Wilson I, Thomas K, Pearce N, Takhar A, Gupta S, Hardman D, Sileno S, Stedman B, Zager JS, Ottensmeier C. Percutaneous hepatic perfusion with melphalan in uveal melanoma: A safe and effective treatment modality in an orphan disease. *J Surg Oncol*. 2018;117(6):1170-8.
157. Ben-Shabat I, Belgrano V, Ny L, Nilsson J, Lindner P, Olofsson Bagge R. Long-Term Follow-Up Evaluation of 68 Patients with Uveal Melanoma Liver Metastases Treated with Isolated Hepatic Perfusion. *Ann Surg Oncol*. 2016;23(4):1327-34.
158. Bethlehem MS, Katsarelis D, Olofsson Bagge R. Meta-Analysis of Isolated Hepatic Perfusion and Percutaneous Hepatic Perfusion as a Treatment for Uveal Melanoma Liver Metastases. *Cancers (Basel)*. 2021;13(18).
159. Rizell M, Mattson J, Cahlin C, Hafstrom L, Lindner P, Olausson M. Isolated hepatic perfusion for liver metastases of malignant melanoma. *Melanoma Res*. 2008;18(2):120-6.
160. Leyvraz S, Piperno-Neumann S, Suci S, Baurain JF, Zdzienicki M, Testori A, Marshall E, Scheulen M, Jouary T, Negrier S, Vermorken JB, Kaempgen E, Durando X, Schadendorf D, Gurunath RK, Keilholz U. Hepatic intra-arterial versus intravenous fotemustine in patients with liver metastases from uveal melanoma (EORTC 18021): a multicentric randomized trial. *Ann Oncol*. 2014;25(3):742-6.
161. Peters S, Voelter V, Zografos L, Pampallona S, Popescu R, Gillet M, Bosshard W, Fiorentini G, Lotem M, Weitzen R, Keilholz U, Humblet Y, Piperno-Neumann S, Stupp R, Leyvraz S. Intra-arterial hepatic fotemustine for the treatment of liver metastases from uveal melanoma: experience in 101 patients. *Ann Oncol*. 2006;17(4):578-83.
162. Voelter V, Schalenbourg A, Pampallona S, Peters S, Halkic N, Denys A, Goitein G, Zografos L, Leyvraz S. Adjuvant intra-arterial hepatic fotemustine for high-risk uveal melanoma patients. *Melanoma Res*. 2008;18(3):220-4.

163. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, Gonzalez R, Robert C, Schadendorf D, Hassel JC, Akerley W, van den Eertwegh AJ, Lutzky J, Lorigan P, Vaubel JM, Linette GP, Hogg D, Ottensmeier CH, Lebbe C, Peschel C, Quirt I, Clark JI, Wolchok JD, Weber JS, Tian J, Yellin MJ, Nichol GM, Hoos A, Urban WJ. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010;363(8):711-23.
164. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, Hassel JC, Rutkowski P, McNeil C, Kalinka-Warchoła E, Savage KJ, Hernberg MM, Lebbe C, Charles J, Mihalciou C, Chiarion-Sileni V, Mauch C, Cognetti F, Arance A, Schmidt H, Schadendorf D, Gogas H, Lundgren-Eriksson L, Horak C, Sharkey B, Waxman IM, Atkinson V, Ascierto PA. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med*. 2015;372(4):320-30.
165. Larkin J, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Cowey CL, Lao CD, Schadendorf D, Dummer R, Smylie M, Rutkowski P, Ferrucci PF, Hill A, Wagstaff J, Carlino MS, Haanen JB, Maio M, Marquez-Rodas I, McArthur GA, Ascierto PA, Long GV, Callahan MK, Postow MA, Grossmann K, Szolnoki M, Dreno B, Bastholt L, Yang A, Rollin LM, Horak C, Hodi FS, Wolchok JD. Combined Nivolumab and Ipilimumab or Monotherapy in Untreated Melanoma. *N Engl J Med*. 2015;373(1):23-34.
166. Wolchok JD, Chiarion-Sileni V, Gonzalez R, Grob JJ, Rutkowski P, Lao CD, Cowey CL, Schadendorf D, Wagstaff J, Dummer R, Ferrucci PF, Smylie M, Butler MO, Hill A, Marquez-Rodas I, Haanen JB, Guidoboni M, Maio M, Schoffski P, Carlino MS, Lebbe C, McArthur GA, Ascierto PA, Daniels GA, Long GV, Bas T, Ritchings C, Larkin J, Hodi FS. Long-Term Outcomes With Nivolumab Plus Ipilimumab or Nivolumab Alone Versus Ipilimumab in Patients With Advanced Melanoma. *J Clin Oncol*. 2022;40(2):127-37.
167. Heppt MV, Steeb T, Schlager JG, Rosumeck S, Dressler C, Ruzicka T, Nast A, Berking C. Immune checkpoint blockade for unresectable or metastatic uveal melanoma: A systematic review. *Cancer Treat Rev*. 2017;60:44-52.
168. Wessely A, Steeb T, Erdmann M, Heinzerling L, Vera J, Schlaak M, Berking C, Heppt MV. The Role of Immune Checkpoint Blockade in Uveal Melanoma. *Int J Mol Sci*. 2020;21(3).
169. Piulats JM, Espinosa E, de la Cruz Merino L, Varela M, Alonso Carrion L, Martin-Algarra S, Lopez Castro R, Curiel T, Rodriguez-Abreu D, Redrado M, Goma M, Rullan AJ, Calvo Gonzalez A, Berrocal-Jaime A. Nivolumab Plus Ipilimumab for Treatment-Naive Metastatic Uveal Melanoma: An Open-Label, Multicenter, Phase II Trial by the Spanish Multidisciplinary Melanoma Group (GEM-1402). *J Clin Oncol*. 2021;39(6):586-98.
170. Pelster MS, Gruschus SK, Bassett R, Gombos DS, Shephard M, Posada L, Glover MS, Simien R, Diab A, Hwu P, Carter BW, Patel SP. Nivolumab and Ipilimumab in Metastatic Uveal Melanoma: Results From a Single-Arm Phase II Study. *J Clin Oncol*. 2021;39(6):599-607.
171. Javed A, Arguello D, Johnston C, Gatalica Z, Terai M, Weight RM, Orloff M, Mastrangelo MJ, Sato T. PD-L1 expression in tumor metastasis is different between uveal melanoma and cutaneous melanoma. *Immunotherapy*. 2017;9(16):1323-30.
172. Pires da Silva I, Lo S, Quek C, Gonzalez M, Carlino MS, Long GV, Menzies AM. Site-specific response patterns, pseudoprogression, and acquired resistance in patients with melanoma treated with ipilimumab combined with anti-PD-1 therapy. *Cancer*. 2020;126(1):86-97.
173. Koch EAT, Petzold A, Wessely A, Dippel E, Gesierich A, Gutzmer R, Hassel JC, Haferkamp S, Hohenberger B, Kahler KC, Knorr H, Kreuzberg N, Leiter U, Loquai C, Meier F, Meissner M, Mohr P, Pfohler C, Rahimi F, Schadendorf D, Schell B, Schlaak M, Terheyden P, Thoms KM, Schuler-Thurner B, Ugurel S, Ulrich J, Utikal J, Weichenthal M, Ziller F, Berking C, Heppt MV, On Behalf Of The German Dermatologic Cooperative Oncology Group De COGCOM. Immune Checkpoint Blockade for Metastatic Uveal Melanoma: Patterns of Response and Survival According to the Presence of Hepatic and Extrahepatic Metastasis. *Cancers (Basel)*. 2021;13(13).
174. Carvajal RD, Piperno-Neumann S, Kapiteijn E, Chapman PB, Frank S, Joshua AM, Piulats JM, Wolter P, Cocquyt V, Chmielowski B, Evans TRJ, Gastaud L, Linette G, Berking C, Schachter J, Rodrigues MJ, Shoushtari AN, Clemett D, Ghiorghiu D, Mariani G, Spratt S, Lovick S, Barker P, Kilgour E, Lai Z, Schwartz GK, Nathan P. Selumetinib in Combination With Dacarbazine in Patients With Metastatic Uveal Melanoma: A Phase III, Multicenter, Randomized Trial (SUMIT). *J Clin Oncol*. 2018;36(12):1232-9.

175. Steeb T, Wessely A, Ruzicka T, Heppt MV, Berking C. How to MEK the best of uveal melanoma: A systematic review on the efficacy and safety of MEK inhibitors in metastatic or unresectable uveal melanoma. *Eur J Cancer*. 2018;103:41-51.
176. A Phase Ib/II, Open-label, Multicenter Study of AEB071 and MEK162 in Adult Patients With Metastatic Uveal Melanoma (NCT01801358). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/results/NCT01801358>. Aufruf am 27.04.2023.
177. Shoushtari AN, Kudchadkar RR, Panageas K, Murthy RK, Jung M, Shah R, O'Donnell B, Khawaja TT, Shames Y, Prempeh-Keteku NA, Ambrosini G, Chen HX, Chapman PB, Schwartz GK, Carvajal RD, Patel SP. A randomized phase 2 study of trametinib with or without GSK2141795 in patients with advanced uveal melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2016;34(15_suppl):9511-.
178. Nathan P, Hassel JC, Rutkowski P, Baurain JF, Butler MO, Schlaak M, Sullivan RJ, Ochsenreither S, Dummer R, Kirkwood JM, Joshua AM, Sacco JJ, Shoushtari AN, Orloff M, Piulats JM, Milhem M, Salama AKS, Curti B, Demidov L, Gastaud L, Mauch C, Yushak M, Carvajal RD, Hamid O, Abdullah SE, Holland C, Goodall H, Piperno-Neumann S, Investigators IM-. Overall Survival Benefit with Tebentafusp in Metastatic Uveal Melanoma. *N Engl J Med*. 2021;385(13):1196-206.
179. European Medicines Agency (EMA). New medicine for rare type of eye cancer [Pressemitteilung]. 25.02.2022.
180. Liddy N, Bossi G, Adams KJ, Lissina A, Mahon TM, Hassan NJ, Gavarret J, Bianchi FC, Pumphrey NJ, Ladell K, Gostick E, Sewell AK, Lissin NM, Harwood NE, Molloy PE, Li Y, Cameron BJ, Sami M, Baston EE, Todorov PT, Paston SJ, Dennis RE, Harper JV, Dunn SM, Ashfield R, Johnson A, McGrath Y, Plesa G, June CH, Kalos M, Price DA, Vuidepot A, Williams DD, Sutton DH, Jakobsen BK. Monoclonal TCR-redirectioned tumor cell killing. *Nat Med*. 2012;18(6):980-7.
181. Nunes JM, Buhler S, Roessli D, Sanchez-Mazas A, collaboration HL-n. The HLA-net GENE[RATE] pipeline for effective HLA data analysis and its application to 145 population samples from Europe and neighbouring areas. *Tissue Antigens*. 2014;83(5):307-23.
182. Schmidt AH, Baier D, Solloch UV, Stahr A, Cereb N, Wassmuth R, Ehninger G, Rutt C. Estimation of high-resolution HLA-A, -B, -C, -DRB1 allele and haplotype frequencies based on 8862 German stem cell donors and implications for strategic donor registry planning. *Hum Immunol*. 2009;70(11):895-902.
183. Boudousquie C, Bossi G, Hurst JM, Rygiel KA, Jakobsen BK, Hassan NJ. Polyfunctional response by ImmTAC (IMCgp100) redirected CD8(+) and CD4(+) T cells. *Immunology*. 2017;152(3):425-38.
184. Carvajal RD, Butler MO, Shoushtari AN, Hassel JC, Ikeguchi A, Hernandez-Aya L, Nathan P, Hamid O, Piulats JM, Rioth M, Johnson DB, Luke JJ, Espinosa E, Leyvraz S, Collins L, Goodall HM, Ranade K, Holland C, Abdullah SE, Sacco JJ, Sato T. Clinical and molecular response to tebentafusp in previously treated patients with metastatic uveal melanoma: a phase 2 trial. *Nat Med*. 2022;28(11):2364-73.
185. Schuler-Thurner B, Bartz-Schmidt KU, Bornfeld N, Cursiefen C, Fuisting B, Grisanti S, Heindl LM, Holbach L, Kaseru M, Knorr H, Koch K, Kruse F, Meiller R, Metz C, Meyer-ter-Vehn T, Much M, Reinsberg M, Schliep S, Seitz B, Schuler G, Susskind D, Viestenz A, Wagenfeld L, Zeschnigk M. Immuntherapie beim Aderhautmelanom: Vakzination gegen Krebs. Multizentrische adjuvante Phase-III-Impfstudie mit Tumor-RNA-beladenen dendritischen Zellen bei neu diagnostizierten, grossen Uveamelanomen. *Ophthalmologe*. 2015;112(12):1017-21.
186. Bol KF, Mensink HW, Aarntzen EH, Schreibelt G, Keunen JE, Coulie PG, de Klein A, Punt CJ, Paridaens D, Figdor CG, de Vries IJ. Long overall survival after dendritic cell vaccination in metastatic uveal melanoma patients. *Am J Ophthalmol*. 2014;158(5):939-47.
187. Bol KF, van den Bosch T, Schreibelt G, Mensink HW, Keunen JE, Kilic E, Japing WJ, Geul KW, Westdorp H, Boudewijns S, Croockewit SA, van Rossum MM, de Goede AL, Naus NC, van der Graaf WT, Gerritsen WR, de Klein A, Punt CJ, Figdor CG, Cohen VM, Paridaens D, de Vries IJ. Adjuvant Dendritic Cell Vaccination in High-Risk Uveal Melanoma. *Ophthalmology*. 2016;123(10):2265-7.
188. Chandran SS, Somerville RPT, Yang JC, Sherry RM, Klebanoff CA, Goff SL, Wunderlich JR, Danforth DN, Zlott D, Paria BC, Sabesan AC, Srivastava AK, Xi L, Pham TH, Raffeld M, White

- DE, Toomey MA, Rosenberg SA, Kammula US. Treatment of metastatic uveal melanoma with adoptive transfer of tumour-infiltrating lymphocytes: a single-centre, two-stage, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol.* 2017;18(6):792-802.
189. Shields CL, Kaliki S, Furuta M, Fulco E, Alarcon C, Shields JA. American Joint Committee on Cancer Classification of Uveal Melanoma (Anatomic Stage) Predicts Prognosis in 7,731 Patients: The 2013 Zimmerman Lecture. *Ophthalmology.* 2015;122(6):1180-6.
190. Rantala ES, Hernberg M, Kivela TT. Overall survival after treatment for metastatic uveal melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Melanoma Res.* 2019;29(6):561-8.
191. Lane AM, Kim IK, Gragoudas ES. Survival Rates in Patients After Treatment for Metastasis From Uveal Melanoma. *JAMA Ophthalmol.* 2018;136(9):981-6.
192. Damato B, Dopierala JA, Coupland SE. Genotypic profiling of 452 choroidal melanomas with multiplex ligation-dependent probe amplification. *Clin Cancer Res.* 2010;16(24):6083-92.
193. Ewens KG, Lalonde E, Richards-Yutz J, Shields CL, Ganguly A. Comparison of Germline versus Somatic BAP1 Mutations for Risk of Metastasis in Uveal Melanoma. *BMC Cancer.* 2018;18(1):1172.
194. Brouwer NJ, Gezgin G, Wierenga APA, Bronkhorst IHG, Marinkovic M, Luyten GPM, Versluis M, Kroes WGM, van der Velden PA, Verdijk RM, Jager MJ. Tumour Angiogenesis in Uveal Melanoma Is Related to Genetic Evolution. *Cancers (Basel).* 2019;11(7).
195. Regan S, Judge HE, Gragoudas ES, Egan KM. Iris color as a prognostic factor in ocular melanoma. *Arch Ophthalmol.* 1999;117(6):811-4.
196. Passeron T, Coelho SG, Miyamura Y, Takahashi K, Hearing VJ. Immunohistochemistry and in situ hybridization in the study of human skin melanocytes. *Exp Dermatol.* 2007;16(3):162-70.
197. Hu DN. Photobiology of ocular melanocytes and melanoma. *Photochem Photobiol.* 2005;81(3):506-9.
198. Goldgeier MH, Klein LE, Klein-Angerer S, Moellmann G, Nordlund JJ. The distribution of melanocytes in the leptomeninges of the human brain. *J Invest Dermatol.* 1984;82(3):235-8.
199. Plonka PM, Passeron T, Brenner M, Tobin DJ, Shibahara S, Thomas A, Slominski A, Kadakara AL, Herschkovitz D, Peters E, Nordlund JJ, Abdel-Malek Z, Takeda K, Paus R, Ortonne JP, Hearing VJ, Schallreuter KU. What are melanocytes really doing all day long...? *Exp Dermatol.* 2009;18(9):799-819.
200. Hilding DA, Ginzberg RD. Pigmentation of the stria vascularis. The contribution of neural crest melanocytes. *Acta Otolaryngol.* 1977;84(1-2):24-37.
201. Mjaatvedt CH, Kern CB, Norris RA, Fairey S, Cave CL. Normal distribution of melanocytes in the mouse heart. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 2005;285(2):748-57.
202. Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature.* 2007;445(7130):843-50.
203. Sitiwin E, Madigan MC, Gratton E, Cherepanoff S, Conway RM, Whan R, Macmillan A. Shedding light on melanins within in situ human eye melanocytes using 2-photon microscopy profiling techniques. *Sci Rep.* 2019;9(1):18585.
204. Wakamatsu K, Hu DN, McCormick SA, Ito S. Characterization of melanin in human iridal and choroidal melanocytes from eyes with various colored irides. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008;21(1):97-105.
205. Hu DN, Savage HE, Roberts JE. Uveal melanocytes, ocular pigment epithelium, and Muller cells in culture: in vitro toxicology. *Int J Toxicol.* 2002;21(6):465-72.
206. Videira IF, Moura DF, Magina S. Mechanisms regulating melanogenesis. *An Bras Dermatol.* 2013;88(1):76-83.
207. Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tyminska A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol.* 2013;30(1):30-41.
208. D'Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int J Mol Sci.* 2016;17(7).

209. Hu F, Mah K, Teramura DJ. Theophylline effects on normal uveal melanocytes in culture: an ultrastructural study. *Pigment Cell Res.* 1987;1(2):104-10.
210. Rennie IG. Don't it make my blue eyes brown: heterochromia and other abnormalities of the iris. *Eye (Lond).* 2012;26(1):29-50.
211. Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, D'Orazio J, Fung CY, Schanbacher CF, Granter SR, Fisher DE. Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. *Cell.* 2007;128(5):853-64.
212. Hadley ME, Haskell-Luevano C. The proopiomelanocortin system. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;885:1-21.
213. D'Orazio JA, Nobuhisa T, Cui R, Arya M, Spry M, Wakamatsu K, Igras V, Kunisada T, Granter SR, Nishimura EK, Ito S, Fisher DE. Topical drug rescue strategy and skin protection based on the role of Mc1r in UV-induced tanning. *Nature.* 2006;443(7109):340-4.
214. Price ER, Horstmann MA, Wells AG, Weilbaecher KN, Takemoto CM, Landis MW, Fisher DE. alpha-Melanocyte-stimulating hormone signaling regulates expression of microphthalmia, a gene deficient in Waardenburg syndrome. *J Biol Chem.* 1998;273(49):33042-7.
215. Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, Bertolotto C. Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2010;23(1):27-40.
216. Hu DN, Simon JD, Sarna T. Role of ocular melanin in ophthalmic physiology and pathology. *Photochem Photobiol.* 2008;84(3):639-44.
217. Prota G, Hu DN, Vincensi MR, McCormick SA, Napolitano A. Characterization of melanins in human irides and cultured uveal melanocytes from eyes of different colors. *Exp Eye Res.* 1998;67(3):293-9.
218. Li L, Hu DN, Zhao H, McCormick SA, Nordlund JJ, Boissy RE. Uveal melanocytes do not respond to or express receptors for alpha-melanocyte-stimulating hormone. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(10):4507-12.
219. Hu DN. Regulation of growth and melanogenesis of uveal melanocytes. *Pigment Cell Res.* 2000;13 Suppl 8:81-6.
220. Lindsey JD, Jones HL, Hewitt EG, Angert M, Weinreb RN. Induction of tyrosinase gene transcription in human iris organ cultures exposed to latanoprost. *Arch Ophthalmol.* 2001;119(6):853-60.
221. Albert DM, Gangnon RE, Zimbric ML, Damico CM, Fisher MR, Gleiser J, Grossniklaus HE, Green WR. A study of iridectomy histopathologic features of latanoprost- and non-latanoprost-treated patients. *Arch Ophthalmol.* 2004;122(11):1680-5.
222. Stjernschantz JW, Albert DM, Hu DN, Drago F, Wistrand PJ. Mechanism and clinical significance of prostaglandin-induced iris pigmentation. *Surv Ophthalmol.* 2002;47 Suppl 1:S162-75.
223. Tressler CS, Wiseman RL, Dombi TM, Jessen B, Huang K, Kwok KK, Wirosko BM. Lack of evidence for a link between latanoprost use and malignant melanoma: an analysis of safety databases and a review of the literature. *Br J Ophthalmol.* 2011;95(11):1490-5.
224. Shibuya H, Watanabe R, Maeno A, Ichimura K, Tamura M, Wakana S, Shiroishi T, Ohba K, Takeda K, Tomita H, Shibahara S, Yamamoto H. Melanocytes contribute to the vasculature of the choroid. *Genes Genet Syst.* 2018;93(2):51-8.
225. Kaufman CK, Mosimann C, Fan ZP, Yang S, Thomas AJ, Ablain J, Tan JL, Fogley RD, van Rooijen E, Hagedorn EJ, Ciarlo C, White RM, Matos DA, Puller AC, Santoriello C, Liao EC, Young RA, Zon LI. A zebrafish melanoma model reveals emergence of neural crest identity during melanoma initiation. *Science.* 2016;351(6272):aad2197.
226. Diener J, Sommer L. Reemergence of neural crest stem cell-like states in melanoma during disease progression and treatment. *Stem Cells Transl Med.* 2021;10(4):522-33.
227. Mort RL, Jackson IJ, Patton EE. The melanocyte lineage in development and disease. *Development.* 2015;142(4):620-32.
228. Vandamme N, Berx G. From neural crest cells to melanocytes: cellular plasticity during development and beyond. *Cell Mol Life Sci.* 2019;76(10):1919-34.

229. Mayor R, Theveneau E. The neural crest. *Development*. 2013;140(11):2247-51.
230. O'Rahilly R, Muller F. Neurulation in the normal human embryo. *Ciba Found Symp*. 1994;181:70-82; discussion -9.
231. Williams AL, Bohnsack BL. The Ocular Neural Crest: Specification, Migration, and Then What? *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:595896.
232. Theveneau E, Mayor R. Neural crest delamination and migration: from epithelium-to-mesenchyme transition to collective cell migration. *Dev Biol*. 2012;366(1):34-54.
233. Wessely A, Steeb T, Berking C, Heppt MV. How Neural Crest Transcription Factors Contribute to Melanoma Heterogeneity, Cellular Plasticity, and Treatment Resistance. *Int J Mol Sci*. 2021;22(11).
234. Aoki Y, Saint-Germain N, Gyda M, Magner-Fink E, Lee YH, Credidio C, Saint-Jeannet JP. Sox10 regulates the development of neural crest-derived melanocytes in *Xenopus*. *Dev Biol*. 2003;259(1):19-33.
235. Harris ML, Baxter LL, Loftus SK, Pavan WJ. Sox proteins in melanocyte development and melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010;23(4):496-513.
236. Southard-Smith EM, Kos L, Pavan WJ. Sox10 mutation disrupts neural crest development in *Dom Hirschsprung* mouse model. *Nat Genet*. 1998;18(1):60-4.
237. Thomas AJ, Erickson CA. The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008;21(6):598-610.
238. McMenamin PG, Shields GT, Seyed-Razavi Y, Kalirai H, Insall RH, Machesky LM, Coupland SE. Melanoblasts Populate the Mouse Choroid Earlier in Development Than Previously Described. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2020;61(10):33.
239. Singh V. *Textbook Of Clinical Neuroanatomy* (2nd Edition): Elsevier; 2009. ISBN: 9788131223079.
240. Williams AL, Bohnsack BL. Neural crest derivatives in ocular development: discerning the eye of the storm. *Birth Defects Res C Embryo Today*. 2015;105(2):87-95.
241. Mund ML, Rodrigues MM, Fine BS. Light and electron microscopic observations on the pigmented layers of the developing human eye. *Am J Ophthalmol*. 1972;73(2):167-82.
242. Smith-Thomas L, Richardson P, Thody AJ, Graham A, Palmer I, Flemming L, Parsons MA, Rennie IG, MacNeil S. Human ocular melanocytes and retinal pigment epithelial cells differ in their melanogenic properties in vivo and in vitro. *Curr Eye Res*. 1996;15(11):1079-91.
243. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev*. 2005;85(3):845-81.
244. Strauss O. Das Retinale Pigmentepithel. *Ophthalmologe*. 2009;106(4):297-8.
245. Parver LM, Auker C, Carpenter DO. Choroidal blood flow as a heat dissipating mechanism in the macula. *Am J Ophthalmol*. 1980;89(5):641-6.
246. Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C. Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol*. 2011;21 Suppl 6:S3-9.
247. Weigele J, Bohnsack BL. Genetics Underlying the Interactions between Neural Crest Cells and Eye Development. *J Dev Biol*. 2020;8(4).
248. Wegner M. All purpose Sox: The many roles of Sox proteins in gene expression. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010;42(3):381-90.
249. Wright EM, Snopek B, Koopman P. Seven new members of the Sox gene family expressed during mouse development. *Nucleic Acids Res*. 1993;21(3):744.
250. Pusch C, Hustert E, Pfeifer D, Sudbeck P, Kist R, Roe B, Wang Z, Balling R, Blin N, Scherer G. The SOX10/Sox10 gene from human and mouse: sequence, expression, and transactivation by the encoded HMG domain transcription factor. *Hum Genet*. 1998;103(2):115-23.
251. Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Goerich DE, Prehu MO, Puliti A, Herbarth B, Hermans-Borgmeyer I, Legius E, Matthijs G, Amiel J, Lyonnet S, Ceccherini I, Romeo G, Smith

- JC, Read AP, Wegner M, Goossens M. SOX10 mutations in patients with Waardenburg-Hirschsprung disease. *Nat Genet.* 1998;18(2):171-3.
252. Kuhlbrodt K, Herbarth B, Sock E, Hermans-Borgmeyer I, Wegner M. Sox10, a novel transcriptional modulator in glial cells. *J Neurosci.* 1998;18(1):237-50.
253. Wissmuller S, Kosian T, Wolf M, Finzsch M, Wegner M. The high-mobility-group domain of Sox proteins interacts with DNA-binding domains of many transcription factors. *Nucleic Acids Res.* 2006;34(6):1735-44.
254. Peirano RI, Wegner M. The glial transcription factor Sox10 binds to DNA both as monomer and dimer with different functional consequences. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(16):3047-55.
255. Cronin JC, Loftus SK, Baxter LL, Swatkoski S, Gucek M, Pavan WJ. Identification and functional analysis of SOX10 phosphorylation sites in melanoma. *PLoS One.* 2018;13(1):e0190834.
256. Girard M, Goossens M. Sumoylation of the SOX10 transcription factor regulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* 2006;580(6):1635-41.
257. Taylor KM, Labonne C. SoxE factors function equivalently during neural crest and inner ear development and their activity is regulated by SUMOylation. *Dev Cell.* 2005;9(5):593-603.
258. Han S, Ren Y, He W, Liu H, Zhi Z, Zhu X, Yang T, Rong Y, Ma B, Purwin TJ, Ouyang Z, Li C, Wang X, Wang X, Yang H, Zheng Y, Aplin AE, Liu J, Shao Y. ERK-mediated phosphorylation regulates SOX10 sumoylation and targets expression in mutant BRAF melanoma. *Nat Commun.* 2018;9(1):28.
259. Rehberg S, Lischka P, Glaser G, Stamminger T, Wegner M, Rosorius O. Sox10 is an active nucleocytoplasmic shuttle protein, and shuttling is crucial for Sox10-mediated transactivation. *Mol Cell Biol.* 2002;22(16):5826-34.
260. Herbarth B, Pingault V, Bondurand N, Kuhlbrodt K, Hermans-Borgmeyer I, Puliti A, Lemort N, Goossens M, Wegner M. Mutation of the Sry-related Sox10 gene in Dominant megacolon, a mouse model for human Hirschsprung disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(9):5161-5.
261. Bondurand N, Pingault V, Goerich DE, Lemort N, Sock E, Le Caignec C, Wegner M, Goossens M. Interaction among SOX10, PAX3 and MITF, three genes altered in Waardenburg syndrome. *Hum Mol Genet.* 2000;9(13):1907-17.
262. Potterf SB, Furumura M, Dunn KJ, Arnheiter H, Pavan WJ. Transcription factor hierarchy in Waardenburg syndrome: regulation of MITF expression by SOX10 and PAX3. *Hum Genet.* 2000;107(1):1-6.
263. Verastegui C, Bille K, Ortonne JP, Ballotti R. Regulation of the microphthalmia-associated transcription factor gene by the Waardenburg syndrome type 4 gene, SOX10. *J Biol Chem.* 2000;275(40):30757-60.
264. Mollaaghababa R, Pavan WJ. The importance of having your SOX on: role of SOX10 in the development of neural crest-derived melanocytes and glia. *Oncogene.* 2003;22(20):3024-34.
265. Agnarsdottir M, Sooman L, Bolander A, Stromberg S, Rexhepaj E, Bergqvist M, Ponten F, Gallagher W, Lennartsson J, Ekman S, Uhlen M, Hedstrand H. SOX10 expression in superficial spreading and nodular malignant melanomas. *Melanoma Res.* 2010;20(6):468-78.
266. Nonaka D, Chiriboga L, Rubin BP. Sox10: a pan-schwannian and melanocytic marker. *Am J Surg Pathol.* 2008;32(9):1291-8.
267. Harris ML, Buac K, Shakhova O, Hakami RM, Wegner M, Sommer L, Pavan WJ. A dual role for SOX10 in the maintenance of the postnatal melanocyte lineage and the differentiation of melanocyte stem cell progenitors. *PLoS Genet.* 2013;9(7):e1003644.
268. Alghamdi SA, Zoroquai P, Dias AB, Alhumaid SR, Aldrees S, Burnier MN, Jr. Diagnostic value of SOX-10 immunohistochemical staining for the detection of uveal melanoma. *Ecancermedalscience.* 2015;9:566.

269. Mori T, Sukeda A, Sekine S, Shibata S, Ryo E, Okano H, Suzuki S, Hiraoka N. SOX10 Expression as Well as BRAF and GNAQ/11 Mutations Distinguish Pigmented Ciliary Epithelium Neoplasms From Uveal Melanomas. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017;58(12):5445-51.
270. Murisier F, Guichard S, Beermann F. The tyrosinase enhancer is activated by Sox10 and Mitf in mouse melanocytes. *Pigment Cell Res.* 2007;20(3):173-84.
271. Murisier F, Guichard S, Beermann F. A conserved transcriptional enhancer that specifies Tyrp1 expression to melanocytes. *Dev Biol.* 2006;298(2):644-55.
272. Jiao Z, Mollaaghababa R, Pavan WJ, Antonellis A, Green ED, Hornyak TJ. Direct interaction of Sox10 with the promoter of murine Dopachrome Tautomerase (Dct) and synergistic activation of Dct expression with Mitf. *Pigment Cell Res.* 2004;17(4):352-62.
273. Potterf SB, Mollaaghababa R, Hou L, Southard-Smith EM, Hornyak TJ, Arnheiter H, Pavan WJ. Analysis of SOX10 function in neural crest-derived melanocyte development: SOX10-dependent transcriptional control of dopachrome tautomerase. *Dev Biol.* 2001;237(2):245-57.
274. Simon JD, Peles D, Wakamatsu K, Ito S. Current challenges in understanding melanogenesis: bridging chemistry, biological control, morphology, and function. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2009;22(5):563-79.
275. Bondurand N, Kobetz A, Pingault V, Lemort N, Encha-Razavi F, Couly G, Goerich DE, Wegner M, Abitbol M, Goossens M. Expression of the SOX10 gene during human development. *FEBS Lett.* 1998;432(3):168-72.
276. Dravis C, Spike BT, Harrell JC, Johns C, Trejo CL, Southard-Smith EM, Perou CM, Wahl GM. Sox10 Regulates Stem/Progenitor and Mesenchymal Cell States in Mammary Epithelial Cells. *Cell Rep.* 2015;12(12):2035-48.
277. Ohtomo R, Mori T, Shibata S, Tsuta K, Maeshima AM, Akazawa C, Watabe Y, Honda K, Yamada T, Yoshimoto S, Asai M, Okano H, Kanai Y, Tsuda H. SOX10 is a novel marker of acinus and intercalated duct differentiation in salivary gland tumors: a clue to the histogenesis for tumor diagnosis. *Mod Pathol.* 2013;26(8):1041-50.
278. Read AP, Newton VE. Waardenburg syndrome. *J Med Genet.* 1997;34(8):656-65.
279. Shah KN, Dalal SJ, Desai MP, Sheth PN, Joshi NC, Ambani LM. White forelock, pigmentary disorder of irides, and long segment Hirschsprung disease: possible variant of Waardenburg syndrome. *J Pediatr.* 1981;99(3):432-5.
280. Bondurand N, Dastot-Le Moal F, Stanchina L, Collot N, Baral V, Marlin S, Attie-Bitach T, Giurgea I, Skopinski L, Reardon W, Toutain A, Sarda P, Echaieb A, Lackmy-Port-Lis M, Touraine R, Amiel J, Goossens M, Pingault V. Deletions at the SOX10 gene locus cause Waardenburg syndrome types 2 and 4. *Am J Hum Genet.* 2007;81(6):1169-85.
281. Pingault V, Guiochon-Mantel A, Bondurand N, Faure C, Lacroix C, Lyonnet S, Goossens M, Landrieu P. Peripheral neuropathy with hypomyelination, chronic intestinal pseudo-obstruction and deafness: a developmental "neural crest syndrome" related to a SOX10 mutation. *Ann Neurol.* 2000;48(4):671-6.
282. Pingault V, Bodereau V, Baral V, Marcos S, Watanabe Y, Chaoui A, Fouveaut C, Leroy C, Verier-Mine O, Francannet C, Dupin-Deguine D, Archambeaud F, Kurtz FJ, Young J, Bertherat J, Marlin S, Goossens M, Hardelin JP, Dode C, Bondurand N. Loss-of-function mutations in SOX10 cause Kallmann syndrome with deafness. *Am J Hum Genet.* 2013;92(5):707-24.
283. Pingault V, Zerad L, Bertani-Torres W, Bondurand N. SOX10: 20 years of phenotypic plurality and current understanding of its developmental function. *J Med Genet.* 2022;59(2):105-14.
284. Lane PW, Liu HM. Association of megacolon with a new dominant spotting gene (Dom) in the mouse. *J Hered.* 1984;75(6):435-9.
285. Stevenson RE, Vincent V, Spellicy CJ, Friez MJ, Chaubey A. Biallelic deletions of the Waardenburg II syndrome gene, SOX10, cause a recognizable arthrogryposis syndrome. *Am J Med Genet A.* 2018;176(9):1968-71.
286. LeBel DP, 2nd, Wolff DJ, Batalis NI, Ellingham T, Matics N, Patwardhan SC, Znoyko IY, Schandl CA. First Report of Prenatal Ascertainment of a Fetus With Homozygous Loss of the

- SOX10 Gene and Phenotypic Correlation by Autopsy Examination. *Pediatr Dev Pathol.* 2018;21(6):561-7.
287. Blochin E, Nonaka D. Diagnostic value of Sox10 immunohistochemical staining for the detection of metastatic melanoma in sentinel lymph nodes. *Histopathology.* 2009;55(5):626-8.
288. Shakhova O, Zingg D, Schaefer SM, Hari L, Civenni G, Blunsch J, Claudinot S, Okoniewski M, Beermann F, Mihic-Probst D, Moch H, Wegner M, Dummer R, Barrandon Y, Cinelli P, Sommer L. Sox10 promotes the formation and maintenance of giant congenital naevi and melanoma. *Nat Cell Biol.* 2012;14(8):882-90.
289. Gambichler T, Petig AL, Stockfleth E, Stucker M. Expression of SOX10, ABCB5 and CD271 in melanocytic lesions and correlation with survival data of patients with melanoma. *Clin Exp Dermatol.* 2016;41(7):709-16.
290. Tang Y, Cao Y. SOX10 Knockdown Inhibits Melanoma Cell Proliferation via Notch Signaling Pathway. *Cancer Manag Res.* 2021;13:7225-34.
291. Bakos RM, Maier T, Besch R, Mestel DS, Ruzicka T, Sturm RA, Berking C. Nestin and SOX9 and SOX10 transcription factors are coexpressed in melanoma. *Exp Dermatol.* 2010;19(8):e89-94.
292. Capparelli C, Purwin TJ, Glasheen M, Caksa S, Tiago M, Wilski N, Pomante D, Rosenbaum S, Nguyen MQ, Cai W, Franco-Barraza J, Zheng R, Kumar G, Chervoneva I, Shimada A, Rebecca VW, Snook AE, Hookim K, Xu X, Cukierman E, Herlyn M, Aplin AE. Targeting SOX10-deficient cells to reduce the dormant-invasive phenotype state in melanoma. *Nat Commun.* 2022;13(1):1381.
293. Blokzijl A, Chen LE, Gustafsdottir SM, Vuu J, Ullenhag G, Kampe O, Landegren U, Kamali-Moghaddam M, Hedstrand H. Elevated Levels of SOX10 in Serum from Vitiligo and Melanoma Patients, Analyzed by Proximity Ligation Assay. *PLoS One.* 2016;11(4):e0154214.
294. Cronin JC, Watkins-Chow DE, Incao A, Hasskamp JH, Schonewolf N, Aoude LG, Hayward NK, Bastian BC, Dummer R, Loftus SK, Pavan WJ. SOX10 ablation arrests cell cycle, induces senescence, and suppresses melanomagenesis. *Cancer Res.* 2013;73(18):5709-18.
295. Graf SA, Busch C, Bosserhoff AK, Besch R, Berking C. SOX10 promotes melanoma cell invasion by regulating melanoma inhibitory activity. *J Invest Dermatol.* 2014;134(8):2212-20.
296. Shakhova O, Cheng P, Mishra PJ, Zingg D, Schaefer SM, Debbache J, Hausel J, Matter C, Guo T, Davis S, Meltzer P, Mihic-Probst D, Moch H, Wegner M, Merlino G, Levesque MP, Dummer R, Santoro R, Cinelli P, Sommer L. Antagonistic cross-regulation between Sox9 and Sox10 controls an anti-tumorigenic program in melanoma. *PLoS Genet.* 2015;11(1):e1004877.
297. Graf SA, Heppt MV, Wessely A, Krebs S, Kammerbauer C, Hornig E, Strieder A, Blum H, Bosserhoff AK, Berking C. The myelin protein PMP2 is regulated by SOX10 and drives melanoma cell invasion. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019;32(3):424-34.
298. Rosenbaum SR, Tiago M, Caksa S, Capparelli C, Purwin TJ, Kumar G, Glasheen M, Pomante D, Kotas D, Chervoneva I, Aplin AE. SOX10 requirement for melanoma tumor growth is due, in part, to immune-mediated effects. *Cell Rep.* 2021;37(10):110085.
299. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, Haanen JB, Ascierto P, Larkin J, Dummer R, Garbe C, Testori A, Maio M, Hogg D, Lorigan P, Lebbe C, Jouary T, Schadendorf D, Ribas A, O'Day SJ, Sosman JA, Kirkwood JM, Eggermont AM, Dreno B, Nolop K, Li J, Nelson B, Hou J, Lee RJ, Flaherty KT, McArthur GA, Group B-S. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011;364(26):2507-16.
300. Long GV, Stroyakovskiy D, Gogas H, Levchenko E, de Braud F, Larkin J, Garbe C, Jouary T, Hauschild A, Grob JJ, Chiarion Sileni V, Lebbe C, Mandala M, Millward M, Arance A, Bondarenko I, Haanen JB, Hansson J, Utikal J, Ferraresi V, Kovalenko N, Mohr P, Probst V, Schadendorf D, Nathan P, Robert C, Ribas A, DeMarini DJ, Irani JG, Casey M, Ouellet D, Martin AM, Le N, Patel K, Flaherty K. Combined BRAF and MEK inhibition versus BRAF inhibition alone in melanoma. *N Engl J Med.* 2014;371(20):1877-88.
301. Long GV, Fung C, Menzies AM, Pupo GM, Carlino MS, Hyman J, Shahheydari H, Tembe V, Thompson JF, Saw RP, Howle J, Hayward NK, Johansson P, Scolyer RA, Kefford RF, Rizos H. Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma. *Nat Commun.* 2014;5:5694.

302. Sun C, Wang L, Huang S, Heynen GJ, Prahallad A, Robert C, Haanen J, Blank C, Wesseling J, Willems SM, Zecchin D, Hobor S, Bajpe PK, Liefink C, Mateus C, Vagner S, Grernrum W, Hofland I, Schlicker A, Wessels LF, Beijersbergen RL, Bardelli A, Di Nicolantonio F, Eggermont AM, Bernards R. Reversible and adaptive resistance to BRAF(V600E) inhibition in melanoma. *Nature*. 2014;508(7494):118-22.
303. Yokoyama S, Takahashi A, Kikuchi R, Nishibu S, Lo JA, Hejna M, Moon WM, Kato S, Zhou Y, Hodi FS, Song JS, Sakurai H, Fisher DE, Hayakawa Y. SOX10 Regulates Melanoma Immunogenicity through an IRF4-IRF1 Axis. *Cancer Res*. 2021;81(24):6131-41.
304. Cronin JC, Wunderlich J, Loftus SK, Prickett TD, Wei X, Ridd K, Vemula S, Burrell AS, Agrawal NS, Lin JC, Banister CE, Buckhaults P, Rosenberg SA, Bastian BC, Pavan WJ, Samuels Y. Frequent mutations in the MITF pathway in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2009;22(4):435-44.
305. Kordes U, Hagel C. Expression of SOX9 and SOX10 in central neuroepithelial tumor. *J Neurooncol*. 2006;80(2):151-5.
306. Tozbikian GH, Zynger DL. A combination of GATA3 and SOX10 is useful for the diagnosis of metastatic triple-negative breast cancer. *Hum Pathol*. 2019;85:221-7.
307. Cimino-Mathews A, Subhawong AP, Elwood H, Warzecha HN, Sharma R, Park BH, Taube JM, Illei PB, Argani P. Neural crest transcription factor Sox10 is preferentially expressed in triple-negative and metaplastic breast carcinomas. *Hum Pathol*. 2013;44(6):959-65.
308. Klaric KA, Riaz N, Asleh K, Wang XQ, Atalla T, Strickland S, Nielsen TO, Kos Z. SRY-box transcription factor 10 is a highly specific biomarker of basal-like breast cancer. *Histopathology*. 2022;80(3):589-97.
309. Yin H, Qin C, Zhao Y, Du Y, Sheng Z, Wang Q, Song Q, Chen L, Liu C, Xu T. SOX10 is over-expressed in bladder cancer and contributes to the malignant bladder cancer cell behaviors. *Clin Transl Oncol*. 2017;19(8):1035-44.
310. Zhou D, Bai F, Zhang X, Hu M, Zhao G, Zhao Z, Liu R. SOX10 is a novel oncogene in hepatocellular carcinoma through Wnt/beta-catenin/TCF4 cascade. *Tumour Biol*. 2014;35(10):9935-40.
311. Kwon AY, Heo I, Lee HJ, Kim G, Kang H, Heo JH, Kim TH, An HJ. Sox10 expression in ovarian epithelial tumors is associated with poor overall survival. *Virchows Arch*. 2016;468(5):597-605.
312. Fodor K, Sipos E, Dobos N, Nagy J, Steiber Z, Mehes G, Dull K, Szekvolgyi L, Schally AV, Halmos G. Correlation between the Expression of Angiogenic Factors and Stem Cell Markers in Human Uveal Melanoma. *Life (Basel)*. 2020;10(12).
313. Stalhammar G, Seregard S, Grossniklaus HE. Expression of immune checkpoint receptors Indoleamine 2,3-dioxygenase and T cell Ig and ITIM domain in metastatic versus nonmetastatic choroidal melanoma. *Cancer Med*. 2019;8(6):2784-92.
314. Kalirai H, Damato BE, Coupland SE. Uveal melanoma cell lines contain stem-like cells that self-renew, produce differentiated progeny, and survive chemotherapy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(11):8458-66.
315. An M, Henion PD. The zebrafish sf3b1b460 mutant reveals differential requirements for the sf3b1 pre-mRNA processing gene during neural crest development. *Int J Dev Biol*. 2012;56(4):223-37.
316. Das D, Kaur I, Ali MJ, Biswas NK, Das S, Kumar S, Honavar SG, Maitra A, Chakrabarti S, Majumder PP. Exome sequencing reveals the likely involvement of SOX10 in uveal melanoma. *Optom Vis Sci*. 2014;91(7):e185-92.
317. Ding X, Wang L, Chen M, Wu Y, Ge S, Li J, Fan X, Lin M. Sperm-Specific Glycolysis Enzyme Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Regulated by Transcription Factor SOX10 to Promote Uveal Melanoma Tumorigenesis. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9:610683.
318. Maat W, Kilic E, Luyten GP, de Klein A, Jager MJ, Gruis NA, Van der Velden PA. Pyrophosphorolysis detects B-RAF mutations in primary uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(1):23-7.

319. Folberg R, Kadkol SS, Frenkel S, Valyi-Nagy K, Jager MJ, Pe'er J, Maniotis AJ. Authenticating cell lines in ophthalmic research laboratories. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49(11):4697-701.
320. Griewank KG, Yu X, Khalili J, Sozen MM, Stempke-Hale K, Bernatchez C, Wardell S, Bastian BC, Woodman SE. Genetic and molecular characterization of uveal melanoma cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2012;25(2):182-7.
321. International Cell Line Authentication Committee (ICLAC). Register of Misidentified Cell Lines, Version 11. 2021. updated 08.09.2021. <https://iclac.org/databases/cross-contaminations/>. Aufruf am 21.09.2022.
322. Ma Y, Wang L, He F, Yang J, Ding Y, Ge S, Fan X, Zhou Y, Xu X, Jia R. LACTB suppresses melanoma progression by attenuating PP1A and YAP interaction. *Cancer Lett*. 2021;506:67-82.
323. Hohenauer T, Berking C, Schmidt A, Haferkamp S, Senft D, Kammerbauer C, Fraschka S, Graf SA, Irmeler M, Beckers J, Flaig M, Aigner A, Hobel S, Hoffmann F, Hermeking H, Rothenfusser S, Endres S, Ruzicka T, Besch R. The neural crest transcription factor Brn3a is expressed in melanoma and required for cell cycle progression and survival. *EMBO Mol Med*. 2013;5(6):919-34.
324. Heppt MV, Wang JX, Hristova DM, Wei Z, Li L, Evans B, Beqiri M, Zaman S, Zhang J, Irmeler M, Berking C, Besch R, Beckers J, Rauscher FJ, 3rd, Sturm RA, Fisher DE, Herlyn M, Fukunaga-Kalabis M. MSX1-Induced Neural Crest-Like Reprogramming Promotes Melanoma Progression. *J Invest Dermatol*. 2018;138(1):141-9.
325. Jager MJ, Magner JA, Ksander BR, Dubovy SR. Uveal Melanoma Cell Lines: Where do they come from? (An American Ophthalmological Society Thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc*. 2016;114:T5.
326. Smalley KS, Contractor R, Nguyen TK, Xiao M, Edwards R, Muthusamy V, King AJ, Flaherty KT, Bosenberg M, Herlyn M, Nathanson KL. Identification of a novel subgroup of melanomas with KIT/cyclin-dependent kinase-4 overexpression. *Cancer Res*. 2008;68(14):5743-52.
327. Yang G, Rajadurai A, Tsao H. Recurrent patterns of dual RB and p53 pathway inactivation in melanoma. *J Invest Dermatol*. 2005;125(6):1242-51.
328. Smalley KS, Lioni M, Dalla Palma M, Xiao M, Desai B, Egyhazi S, Hansson J, Wu H, King AJ, Van Belle P, Elder DE, Flaherty KT, Herlyn M, Nathanson KL. Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E-mutated melanomas. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(9):2876-83.
329. Amirouchene-Angelozzi N, Nemati F, Gentien D, Nicolas A, Dumont A, Carita G, Camonis J, Desjardins L, Cassoux N, Piperno-Neumann S, Mariani P, Sastre X, Decaudin D, Roman-Roman S. Establishment of novel cell lines recapitulating the genetic landscape of uveal melanoma and preclinical validation of mTOR as a therapeutic target. *Mol Oncol*. 2014;8(8):1508-20.
330. Chen PW, Murray TG, Uno T, Salgaller ML, Reddy R, Ksander BR. Expression of MAGE genes in ocular melanoma during progression from primary to metastatic disease. *Clin Exp Metastasis*. 1997;15(5):509-18.
331. Juhasz I, Albelda SM, Elder DE, Murphy GF, Adachi K, Herlyn D, Valyi-Nagy IT, Herlyn M. Growth and invasion of human melanomas in human skin grafted to immunodeficient mice. *Am J Pathol*. 1993;143(2):528-37.
332. Han H. RNA Interference to Knock Down Gene Expression. *Methods Mol Biol*. 2018;1706:293-302.
333. Sontheimer EJ. Assembly and function of RNA silencing complexes. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6(2):127-38.
334. Martinez J, Tuschl T. RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev*. 2004;18(9):975-80.

335. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001;411(6836):494-8.
336. Foged C. siRNA delivery with lipid-based systems: promises and pitfalls. *Curr Top Med Chem*. 2012;12(2):97-107.
337. Roche Diagnostics GmbH, Sigma-Aldrich. Expand Reverse Transcriptase - Datasheet, Version 13. 2020. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/158/741/ertrob.pdf>. Aufruf am 27.01.2022.
338. Arya M, Shergill IS, Williamson M, Gommersall L, Arya N, Patel HR. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Rev Mol Diagn*. 2005;5(2):209-19.
339. Roche Diagnostics GmbH. RealTime ready Universal ProbeLibrary: Redefining and revolutionizing real-time qPCR assays. 2009. <https://lifescience.roche.com/documents/RealTime-ready-Universal-ProbeLibrary.pdf>. Aufruf am 28.01.2022.
340. Jiang H, Lei R, Ding SW, Zhu S. Skewer: a fast and accurate adapter trimmer for next-generation sequencing paired-end reads. *BMC Bioinformatics*. 2014;15:182.
341. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):550.
342. Pagès H, Carlson M, Falcon S, Li N. AnnotationDbi: Manipulation of SQLite-based annotations in Bioconductor. R package version 1.60.0. 2022. <https://bioconductor.org/packages/AnnotationDbi>.
343. Frankish A, Diekhans M, Jungreis I, Lagarde J, Loveland JE, Mudge JM, Sisu C, Wright JC, Armstrong J, Barnes I, Berry A, Bignell A, Boix C, Carbonell Sala S, Cunningham F, Di Domenico T, Donaldson S, Fiddes IT, Garcia Giron C, Gonzalez JM, Grego T, Hardy M, Hourlier T, Howe KL, Hunt T, Izuogu OG, Johnson R, Martin FJ, Martinez L, Mohanan S, Muir P, Navarro FCP, Parker A, Pei B, Pozo F, Riera FC, Ruffier M, Schmitt BM, Stapleton E, Suner MM, Sycheva I, Uszczynska-Ratajczak B, Wolf MY, Xu J, Yang YT, Yates A, Zerbino D, Zhang Y, Choudhary JS, Gerstein M, Guigo R, Hubbard TJP, Kellis M, Paten B, Tress ML, Flicek P. Gencode 2021. *Nucleic Acids Res*. 2021;49(D1):D916-D23.
344. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15-21.
345. Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014;30(7):923-30.
346. Fufa TD, Harris ML, Watkins-Chow DE, Levy D, Gorkin DU, Gildea DE, Song L, Safi A, Crawford GE, Sviderskaya EV, Bennett DC, McCallion AS, Loftus SK, Pavan WJ. Genomic analysis reveals distinct mechanisms and functional classes of SOX10-regulated genes in melanocytes. *Hum Mol Genet*. 2015;24(19):5433-50.
347. The Cancer Genome Atlas (TCGA) [Internet]. Datenbank: <https://www.cancer.gov/tcga>.
348. Goldman MJ, Craft B, Hastie M, Repecka K, McDade F, Kamath A, Banerjee A, Luo Y, Rogers D, Brooks AN, Zhu J, Haussler D. Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nat Biotechnol*. 2020;38(6):675-8.
349. University of California Santa Cruz. Xena Functional Genomics Explorer (UCSC Xena). 2016. <https://xenabrowser.net/>. Aufruf am 26.09.22.
350. Babicki S, Arndt D, Marcu A, Liang Y, Grant JR, Maciejewski A, Wishart DS. Heatmapper: web-enabled heat mapping for all. *Nucleic Acids Res*. 2016;44(W1):W147-53.
351. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*. 1985;150(1):76-85.
352. Thermo Fisher Scientific. Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Version B.0. 2020. <https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS->

Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FMAN0011430_Pierce_BCA_Protein_Asy_UG.pdf. Aufruf am 28.01.2022.

353. Jensen EC. The basics of western blotting. *Anat Rec (Hoboken)*. 2012;295(3):369-71.
354. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting: an introduction. *Methods Mol Biol*. 2015;1312:17-30.
355. Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szewczyk NJ, Smith K, Atherton PJ. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports*. 2017;27(1):4-25.
356. R&D Systems Inc. Proteome Profiler™ Array Human Phospho-Kinase Array Kit. 2014. https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/ary003b.pdf?v=20220128&_ga=2.84092889.196319183.1643366194-1472274522.1641996974. Aufruf am 28.01.2022.
357. Promega Corporation. CellTiter-Blue® Cell Viability Assay Technical Bulletin. 2016. <https://www.promega.de/resources/protocols/technical-bulletins/101/celltiter-blue-cell-viability-assay-protocol/>. Aufruf am 31.01.2022.
358. van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry*. 1998;31(1):1-9.
359. Bratton DL, Fadok VA, Richter DA, Kailey JM, Guthrie LA, Henson PM. Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem*. 1997;272(42):26159-65.
360. Roche Diagnostics GmbH. Annexin-V-FLUOS, fluorescence-conjugated anticoagulant for the detection of phosphatidylserine on the outer leaflet of apoptotic cells, Version 10. 2020. <https://www.sigmaaldrich.com/deepweb/assets/sigmaaldrich/product/documents/387/878/11828681001bul.pdf>. Aufruf am 31.01.2022.
361. Abcam. Flow cytometric analysis of cell cycle with propidium iodide DNA staining. 2022. <https://www.abcam.com/protocols/flow-cytometric-analysis-of-cell-cycle-with-propidium-iodide-dna-staining>. Aufruf am 02.12.2022.
362. Darzynkiewicz Z, Huang X, Zhao H. Analysis of Cellular DNA Content by Flow Cytometry. *Curr Protoc Immunol*. 2017;119:5 7 1-5 7 20.
363. Reactome Database. 2022. <https://reactome.org/>. Aufruf am 05.12.2022.
364. Gillespie M, Jassal B, Stephan R, Milacic M, Rothfels K, Senff-Ribeiro A, Griss J, Sevilla C, Matthews L, Gong C, Deng C, Varusai T, Ragueneau E, Haider Y, May B, Shamovsky V, Weiser J, Brunson T, Sanati N, Beckman L, Shao X, Fabregat A, Sidiropoulos K, Murillo J, Viteri G, Cook J, Shorser S, Bader G, Demir E, Sander C, Haw R, Wu G, Stein L, Hermjakob H, D'Eustachio P. The reactome pathway knowledgebase 2022. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D687-D92.
365. Funahashi A, Matsuoka Y, Jouraku A, Morohashi M, Kikuchi N, Kitano H. CellDesigner 3.5: A Versatile Modeling Tool for Biochemical Networks. *Proceedings of the IEEE*. 2008;96(8):1254-65.
366. Amaro A, Gangemi R, Piaggio F, Angelini G, Barisione G, Ferrini S, Pfeffer U. The biology of uveal melanoma. *Cancer Metastasis Rev*. 2017;36(1):109-40.
367. Singh M, Durairaj P, Yeung J. Uveal Melanoma: A Review of the Literature. *Oncol Ther*. 2018;6(1):87-104.
368. Piaggio F, Tozzo V, Bernardi C, Croce M, Puzone R, Viaggi S, Patrone S, Barla A, Coviello D, Jager MJ, van der Velden PA, Zeschnigk M, Cangelosi D, Eva A, Pfeffer U, Amaro A. Secondary Somatic Mutations in G-Protein-Related Pathways and Mutation Signatures in Uveal Melanoma. *Cancers (Basel)*. 2019;11(11).
369. Basile MS, Mazzon E, Fagone P, Longo A, Russo A, Fallico M, Bonfiglio V, Nicoletti F, Avitabile T, Reibaldi M. Immunobiology of Uveal Melanoma: State of the Art and Therapeutic Targets. *Front Oncol*. 2019;9:1145.

370. Rossi E, Schinzari G, Zizzari IG, Maiorano BA, Pagliara MM, Sammarco MG, Fiorentino V, Petrone G, Cassano A, Rindi G, Bria E, Blasi MA, Nuti M, Tortora G. Immunological Backbone of Uveal Melanoma: Is There a Rationale for Immunotherapy? *Cancers (Basel)*. 2019;11(8).
371. ISBLab School of Life and Health Sciences and Warshel Institute for Computational Biology. miRTarBase: The experimentally validated microRNA-target interactions database. 2022. https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/index.php. Aufruf am 05.12.2022.
372. Huang HY, Lin YC, Cui S, Huang Y, Tang Y, Xu J, Bao J, Li Y, Wen J, Zuo H, Wang W, Li J, Ni J, Ruan Y, Li L, Chen Y, Xie Y, Zhu Z, Cai X, Chen X, Yao L, Chen Y, Luo Y, LuXu S, Luo M, Chiu CM, Ma K, Zhu L, Cheng GJ, Bai C, Chiang YC, Wang L, Wei F, Lee TY, Huang HD. miRTarBase update 2022: an informative resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D222-D30.
373. Xiao F, Zuo Z, Cai G, Kang S, Gao X, Li T. miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(Database issue):D105-10.
374. Bovolenta LA, Acencio ML, Lemke N. HTRIdb: an open-access database for experimentally verified human transcriptional regulation interactions. *BMC Genomics*. 2012;13:405.
375. Matys V, Kel-Margoulis OV, Fricke E, Liebich I, Land S, Barre-Dirrie A, Reuter I, Chekmenev D, Krull M, Hornischer K, Voss N, Stegmaier P, Lewicki-Potapov B, Saxel H, Kel AE, Wingender E. TRANSFAC and its module TRANSCompel: transcriptional gene regulation in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(Database issue):D108-10.
376. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003;13(11):2498-504.
377. Cantone M, Kuspert M, Reiprich S, Lai X, Eberhardt M, Gottle P, Beyer F, Azim K, Kury P, Wegner M, Vera J. A gene regulatory architecture that controls region-independent dynamics of oligodendrocyte differentiation. *Glia*. 2019;67(5):825-43.
378. Laurent C, Valet F, Planque N, Silveri L, Maacha S, Anezo O, Hupe P, Plancher C, Reyes C, Albaud B, Rapinat A, Gentien D, Couturier J, Sastre-Garau X, Desjardins L, Thierry JP, Roman-Roman S, Asselain B, Barillot E, Piperno-Neumann S, Saule S. High PTP4A3 phosphatase expression correlates with metastatic risk in uveal melanoma patients. *Cancer Res*. 2011;71(3):666-74.
379. Barrett T, Wilhite SE, Ledoux P, Evangelista C, Kim IF, Tomashevsky M, Marshall KA, Phillippy KH, Sherman PM, Holko M, Yefanov A, Lee H, Zhang N, Robertson CL, Serova N, Davis S, Soboleva A. NCBI GEO: archive for functional genomics data sets--update. *Nucleic Acids Res*. 2013;41(Database issue):D991-5.
380. Yates AD, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, Azov AG, Bennett R, Bhai J, Billis K, Boddu S, Marugan JC, Cummins C, Davidson C, Dodiya K, Fatima R, Gall A, Giron CG, Gil L, Grego T, Haggerty L, Haskell E, Hourlier T, Izuogu OG, Janacek SH, Juettemann T, Kay M, Lavidas I, Le T, Lemos D, Martinez JG, Maurel T, McDowall M, McMahon A, Mohanan S, Moore B, Nuhn M, Oheh DN, Parker A, Parton A, Patricio M, Sakthivel MP, Abdul Salam AI, Schmitt BM, Schuilenburg H, Sheppard D, Sycheva M, Szuba M, Taylor K, Thormann A, Threadgold G, Vullo A, Walts B, Winterbottom A, Zadissa A, Chakiachvili M, Flint B, Frankish A, Hunt SE, G II, Kostadima M, Langridge N, Loveland JE, Martin FJ, Morales J, Mudge JM, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Trevanion SJ, Cunningham F, Howe KL, Zerbino DR, Flicek P. Ensembl 2020. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D682-D8.
381. Rinnone F, Micale G, Bonnici V, Bader GD, Shasha D, Ferro A, Pulvirenti A, Giugno R. NetMatchStar: an enhanced Cytoscape network querying app. *F1000Res*. 2015;4:479.
382. Khan FM, Marquardt S, Gupta SK, Knoll S, Schmitz U, Spitschak A, Engelmann D, Vera J, Wolkenhauer O, Putzer BM. Unraveling a tumor type-specific regulatory core underlying E2F1-mediated epithelial-mesenchymal transition to predict receptor protein signatures. *Nat Commun*. 2017;8(1):198.
383. Roocks R. Computing Pareto Frontiers and Database Preferences with the rPref Package. *R Journal*. 2016;8(2):393-404.

384. Schafer KA. The cell cycle: a review. *Vet Pathol.* 1998;35(6):461-78.
385. Pietenpol JA, Stewart ZA. Cell cycle checkpoint signaling: cell cycle arrest versus apoptosis. *Toxicology.* 2002;181-182:475-81.
386. Engeland K. Cell cycle regulation: p53-p21-RB signaling. *Cell Death Differ.* 2022;29(5):946-60.
387. Chen J. The Cell-Cycle Arrest and Apoptotic Functions of p53 in Tumor Initiation and Progression. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016;6(3):a026104.
388. Chen J. The Roles of MDM2 and MDMX Phosphorylation in Stress Signaling to p53. *Genes Cancer.* 2012;3(3-4):274-82.
389. el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.* 1994;54(5):1169-74.
390. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D. p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature.* 1993;366(6456):701-4.
391. Kim EM, Jung CH, Kim J, Hwang SG, Park JK, Um HD. The p53/p21 Complex Regulates Cancer Cell Invasion and Apoptosis by Targeting Bcl-2 Family Proteins. *Cancer Res.* 2017;77(11):3092-100.
392. Nakano K, Vousden KH. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Mol Cell.* 2001;7(3):683-94.
393. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995;80(2):293-9.
394. Razavipour SF, Harikumar KB, Slingerland JM. p27 as a Transcriptional Regulator: New Roles in Development and Cancer. *Cancer Res.* 2020;80(17):3451-8.
395. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972;26(4):239-57.
396. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
397. D'Arcy MS. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. *Cell Biol Int.* 2019;43(6):582-92.
398. Bertheloot D, Latz E, Franklin BS. Necroptosis, pyroptosis and apoptosis: an intricate game of cell death. *Cell Mol Immunol.* 2021;18(5):1106-21.
399. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(1):49-63.
400. Rothkamm K, Barnard S, Moquet J, Ellender M, Rana Z, Burdak-Rothkamm S. DNA damage foci: Meaning and significance. *Environ Mol Mutagen.* 2015;56(6):491-504.
401. Ismail IH, Hendzel MJ. The gamma-H2A.X: is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more? *Environ Mol Mutagen.* 2008;49(1):73-82.
402. Stiff T, O'Driscoll M, Rief N, Iwabuchi K, Lobrich M, Jeggo PA. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 2004;64(7):2390-6.
403. Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis. *Exp Ther Med.* 2020;19(3):1997-2007.
404. Mebratu Y, Tesfaigzi Y. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle.* 2009;8(8):1168-75.
405. Payne DM, Rossomando AJ, Martino P, Erickson AK, Her JH, Shabanowitz J, Hunt DF, Weber MJ, Sturgill TW. Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.* 1991;10(4):885-92.
406. Yoon S, Seger R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors.* 2006;24(1):21-44.

407. Roux PP, Blenis J. ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68(2):320-44.
408. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J.* 2010;429(3):403-17.
409. Wagner EF, Nebreda AR. Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat Rev Cancer.* 2009;9(8):537-49.
410. Wood CD, Thornton TM, Sabio G, Davis RA, Rincon M. Nuclear localization of p38 MAPK in response to DNA damage. *Int J Biol Sci.* 2009;5(5):428-37.
411. Mahalingam M, Cooper JA. Phosphorylation of mammalian eIF4E by Mnk1 and Mnk2: tantalizing prospects for a role in translation. *Prog Mol Subcell Biol.* 2001;27:132-42.
412. Junttila MR, Li SP, Westermarck J. Phosphatase-mediated crosstalk between MAPK signaling pathways in the regulation of cell survival. *FASEB J.* 2008;22(4):954-65.
413. Porta C, Paglino C, Mosca A. Targeting PI3K/Akt/mTOR Signaling in Cancer. *Front Oncol.* 2014;4:64.
414. Ersahin T, Tuncbag N, Cetin-Atalay R. The PI3K/AKT/mTOR interactive pathway. *Mol Biosyst.* 2015;11(7):1946-54.
415. Saraiva VS, Caissie AL, Segal L, Edelstein C, Burnier MN, Jr. Immunohistochemical expression of phospho-Akt in uveal melanoma. *Melanoma Res.* 2005;15(4):245-50.
416. Babchia N, Calipel A, Mouriaux F, Faussat AM, Mascarelli F. The PI3K/Akt and mTOR/P70S6K signaling pathways in human uveal melanoma cells: interaction with B-Raf/ERK. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2010;51(1):421-9.
417. Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase B α . *Curr Biol.* 1997;7(4):261-9.
418. Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 2005;307(5712):1098-101.
419. Chen CY, Chen J, He L, Stiles BL. PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2018;9:338.
420. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell.* 1997;91(2):231-41.
421. Cardone MH, Roy N, Stennicke HR, Salvesen GS, Franke TF, Stanbridge E, Frisch S, Reed JC. Regulation of cell death protease caspase-9 by phosphorylation. *Science.* 1998;282(5392):1318-21.
422. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007;129(7):1261-74.
423. Yu L, Peng F, Dong X, Chen Y, Sun D, Jiang S, Deng C. Sex-Determining Region Y Chromosome-Related High-Mobility-Group Box 10 in Cancer: A Potential Therapeutic Target. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:564740.
424. Ringner M. What is principal component analysis? *Nat Biotechnol.* 2008;26(3):303-4.
425. Majava V, Polverini E, Mazzini A, Nanekar R, Knoll W, Peters J, Natali F, Baumgartel P, Kursula I, Kursula P. Structural and functional characterization of human peripheral nervous system myelin protein P2. *PLoS One.* 2010;5(4):e10300.
426. Bosserhoff AK, Buettner R. Expression, function and clinical relevance of MIA (melanoma inhibitory activity). *Histol Histopathol.* 2002;17(1):289-300.
427. Tatzel J, Poser I, Schroeder J, Bosserhoff AK. Inhibition of melanoma inhibitory activity (MIA) expression in melanoma cells leads to molecular and phenotypic changes. *Pigment Cell Res.* 2005;18(2):92-101.
428. Bosserhoff AK, Echtenacher B, Hein R, Buettner R. Functional role of melanoma inhibitory activity in regulating invasion and metastasis of malignant melanoma cells in vivo. *Melanoma Res.* 2001;11(4):417-21.

429. Ming Z, Vining B, Bagheri-Fam S, Harley V. SOX9 in organogenesis: shared and unique transcriptional functions. *Cell Mol Life Sci.* 2022;79(10):522.
430. Hemesath TJ, Steingrimsson E, McGill G, Hansen MJ, Vaught J, Hodgkinson CA, Arnheiter H, Copeland NG, Jenkins NA, Fisher DE. microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. *Genes Dev.* 1994;8(22):2770-80.
431. Levy C, Khaled M, Fisher DE. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol Med.* 2006;12(9):406-14.
432. Goding CR, Arnheiter H. MITF-the first 25 years. *Genes Dev.* 2019;33(15-16):983-1007.
433. Wellbrock C, Arozarena I. Microphthalmia-associated transcription factor in melanoma development and MAP-kinase pathway targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015;28(4):390-406.
434. Fuse N, Yasumoto K, Suzuki H, Takahashi K, Shibahara S. Identification of a melanocyte-type promoter of the microphthalmia-associated transcription factor gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;219(3):702-7.
435. Huber WE, Price ER, Widlund HR, Du J, Davis IJ, Wegner M, Fisher DE. A tissue-restricted cAMP transcriptional response: SOX10 modulates alpha-melanocyte-stimulating hormone-triggered expression of microphthalmia-associated transcription factor in melanocytes. *J Biol Chem.* 2003;278(46):45224-30.
436. Watanabe K, Takeda K, Yasumoto K, Udono T, Saito H, Ikeda K, Takasaka T, Takahashi K, Kobayashi T, Tachibana M, Shibahara S. Identification of a distal enhancer for the melanocyte-specific promoter of the MITF gene. *Pigment Cell Res.* 2002;15(3):201-11.
437. Gelmi MC, Houtzagers LE, Strub T, Krossa I, Jager MJ. MITF in Normal Melanocytes, Cutaneous and Uveal Melanoma: A Delicate Balance. *Int J Mol Sci.* 2022;23(11).
438. Cheli Y, Giuliano S, Botton T, Rocchi S, Hofman V, Hofman P, Bahadoran P, Bertolotto C, Ballotti R. Mitf is the key molecular switch between mouse or human melanoma initiating cells and their differentiated progeny. *Oncogene.* 2011;30(20):2307-18.
439. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, Beroukhim R, Milner DA, Granter SR, Du J, Lee C, Wagner SN, Li C, Golub TR, Rimm DL, Meyerson ML, Fisher DE, Sellers WR. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature.* 2005;436(7047):117-22.
440. Mouriaux F, Vincent S, Kherrouche Z, Maurage CA, Planque N, Monte D, Labalette P, Saule S. Microphthalmia transcription factor analysis in posterior uveal melanomas. *Exp Eye Res.* 2003;76(6):653-61.
441. McGill GG, Horstmann M, Widlund HR, Du J, Motyckova G, Nishimura EK, Lin YL, Ramaswamy S, Avery W, Ding HF, Jordan SA, Jackson IJ, Korsmeyer SJ, Golub TR, Fisher DE. Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability. *Cell.* 2002;109(6):707-18.
442. Strub T, Giuliano S, Ye T, Bonet C, Keime C, Kobi D, Le Gras S, Cormont M, Ballotti R, Bertolotto C, Davidson I. Essential role of microphthalmia transcription factor for DNA replication, mitosis and genomic stability in melanoma. *Oncogene.* 2011;30(20):2319-32.
443. Pushpakom S, Iorio F, Eyers PA, Escott KJ, Hopper S, Wells A, Doig A, Williams T, Latimer J, McNamee C, Norris A, Sanseau P, Cavalla D, Pirmohamed M. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Rev Drug Discov.* 2019;18(1):41-58.
444. Ekins S, Williams AJ, Krasowski MD, Freundlich JS. In silico repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. *Drug Discov Today.* 2011;16(7-8):298-310.
445. Kent LN, Leone G. The broken cycle: E2F dysfunction in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2019;19(6):326-38.
446. Takahashi Y, Rayman JB, Dynlacht BD. Analysis of promoter binding by the E2F and pRB families in vivo: distinct E2F proteins mediate activation and repression. *Genes Dev.* 2000;14(7):804-16.

447. Xu X, Bieda M, Jin VX, Rabinovich A, Oberley MJ, Green R, Farnham PJ. A comprehensive ChIP-chip analysis of E2F1, E2F4, and E2F6 in normal and tumor cells reveals interchangeable roles of E2F family members. *Genome Res.* 2007;17(11):1550-61.
448. Rouaud F, Hamouda-Tekaya N, Cerezo M, Abbe P, Zangari J, Hofman V, Ohanna M, Mograbi B, El-Hachem N, Benfodda Z, Lebeau A, Tulic MK, Hofman P, Bertolotto C, Passeron T, Annicotte JS, Ballotti R, Rocchi S. E2F1 inhibition mediates cell death of metastatic melanoma. *Cell Death Dis.* 2018;9(5):527.
449. Duan R, Du W, Guo W. EZH2: a novel target for cancer treatment. *J Hematol Oncol.* 2020;13(1):104.
450. Simon JA, Lange CA. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res.* 2008;647(1-2):21-9.
451. Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K. EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J.* 2003;22(20):5323-35.
452. Tiffen J, Gallagher SJ, Hersey P. EZH2: an emerging role in melanoma biology and strategies for targeted therapy. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2015;28(1):21-30.
453. Cheng Y, Li Y, Huang X, Wei W, Qu Y. Expression of EZH2 in uveal melanomas patients and associations with prognosis. *Oncotarget.* 2017;8(44):76423-31.
454. Hoy SM. Tazemetostat: First Approval. *Drugs.* 2020;80(5):513-21.
455. LaFave LM, Beguelin W, Koche R, Teater M, Spitzer B, Chramiec A, Papalexi E, Keller MD, Hricik T, Konstantinoff K, Micol JB, Durham B, Knutson SK, Campbell JE, Blum G, Shi X, Doud EH, Krivtsov AV, Chung YR, Khodos I, de Stanchina E, Ouerfelli O, Adusumilli PS, Thomas PM, Kelleher NL, Luo M, Keilhack H, Abdel-Wahab O, Melnick A, Armstrong SA, Levine RL. Loss of BAP1 function leads to EZH2-dependent transformation. *Nat Med.* 2015;21(11):1344-9.
456. Schoumacher M, Le Corre S, Houy A, Mulugeta E, Stern MH, Roman-Roman S, Margueron R. Uveal melanoma cells are resistant to EZH2 inhibition regardless of BAP1 status. *Nat Med.* 2016;22(6):577-8.
457. Jin B, Zhang P, Zou H, Ye H, Wang Y, Zhang J, Yang H, Pan J. Verification of EZH2 as a druggable target in metastatic uveal melanoma. *Mol Cancer.* 2020;19(1):52.
458. Kashuba VI, Gizatullin RZ, Protopopov AI, Allikmets R, Korolev S, Li J, Boldog F, Tory K, Zabarovska V, Marcsek Z, Sumegi J, Klein G, Zabarovsky ER, Kisselev L. NotI linking/jumping clones of human chromosome 3: mapping of the TFRC, RAB7 and HAUSP genes to regions rearranged in leukemia and deleted in solid tumors. *FEBS Lett.* 1997;419(2-3):181-5.
459. Crielgaard BJ, Lammers T, Rivella S. Targeting iron metabolism in drug discovery and delivery. *Nat Rev Drug Discov.* 2017;16(6):400-23.
460. Jabara HH, Boyden SE, Chou J, Ramesh N, Massaad MJ, Benson H, Bainter W, Fraulino D, Rahimov F, Sieff C, Liu ZJ, Alshemmari SH, Al-Ramadi BK, Al-Dhekri H, Arnaout R, Abu-Shukair M, Vatsayan A, Silver E, Ahuja S, Davies EG, Sola-Visner M, Ohsumi TK, Andrews NC, Notarangelo LD, Fleming MD, Al-Herz W, Kunkel LM, Geha RS. A missense mutation in TFRC, encoding transferrin receptor 1, causes combined immunodeficiency. *Nat Genet.* 2016;48(1):74-8.
461. Kawabata H. Transferrin and transferrin receptors update. *Free Radic Biol Med.* 2019;133:46-54.
462. Aisen P. Transferrin receptor 1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004;36(11):2137-43.
463. Shen Y, Li X, Dong D, Zhang B, Xue Y, Shang P. Transferrin receptor 1 in cancer: a new sight for cancer therapy. *Am J Cancer Res.* 2018;8(6):916-31.
464. Dixon SJ, Lemberg KM, Lamprecht MR, Skouta R, Zaitsev EM, Gleason CE, Patel DN, Bauer AJ, Cantley AM, Yang WS, Morrison B, 3rd, Stockwell BR. Ferroptosis: an iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell.* 2012;149(5):1060-72.
465. Lu Y, Yang Q, Su Y, Ji Y, Li G, Yang X, Xu L, Lu Z, Dong J, Wu Y, Bei JX, Pan C, Gu X, Li B. MYCN mediates TFRC-dependent ferroptosis and reveals vulnerabilities in neuroblastoma. *Cell Death Dis.* 2021;12(6):511.

466. Holmstrom P, Gafvels M, Eriksson LC, Dzikaite V, Hultcrantz R, Eggertsen G, Stal P. Expression of iron regulatory genes in a rat model of hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* 2006;26(8):976-85.
467. Daniels TR, Bernabeu E, Rodriguez JA, Patel S, Kozman M, Chiappetta DA, Holler E, Ljubimova JY, Helguera G, Penichet ML. The transferrin receptor and the targeted delivery of therapeutic agents against cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1820(3):291-317.
468. Takahashi M, Shibutani M, Woo GH, Inoue K, Fujimoto H, Igarashi K, Kanno J, Hirose M, Nishikawa A. Cellular distributions of molecules with altered expression specific to the tumor promotion process from the early stage in a rat two-stage hepatocarcinogenesis model. *Carcinogenesis.* 2008;29(11):2218-26.
469. Habashy HO, Powe DG, Staka CM, Rakha EA, Ball G, Green AR, Aleskandarany M, Paish EC, Douglas Macmillan R, Nicholson RI, Ellis IO, Gee JM. Transferrin receptor (CD71) is a marker of poor prognosis in breast cancer and can predict response to tamoxifen. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;119(2):283-93.
470. Zhang H, Jin C, Zhang L, Peng B, Zhang Y, Liu Y, Li L, Ye M, Xiong W, Tan W. CD71-Specific Aptamer Conjugated with Monomethyl Auristatin E for the Treatment of Uveal Melanoma. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2022;14(1):32-40.
471. Ornitz DM, Itoh N. The Fibroblast Growth Factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2015;4(3):215-66.
472. Gong SG. Isoforms of receptors of fibroblast growth factors. *J Cell Physiol.* 2014;229(12):1887-95.
473. Plotnikov AN, Hubbard SR, Schlessinger J, Mohammadi M. Crystal structures of two FGF-FGFR complexes reveal the determinants of ligand-receptor specificity. *Cell.* 2000;101(4):413-24.
474. Vainikka S, Partanen J, Bellosta P, Coulier F, Birnbaum D, Basilico C, Jaye M, Alitalo K. Fibroblast growth factor receptor-4 shows novel features in genomic structure, ligand binding and signal transduction. *EMBO J.* 1992;11(12):4273-80.
475. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem.* 1996;271(25):15292-7.
476. Seitz T, John N, Sommer J, Dietrich P, Thasler WE, Hartmann A, Evert K, Lang SA, Bosserhoff A, Hellerbrand C. Role of Fibroblast Growth Factors in the Crosstalk of Hepatic Stellate Cells and Uveal Melanoma Cells in the Liver Metastatic Niche. *Int J Mol Sci.* 2022;23(19).
477. Naruo K, Seko C, Kuroshima K, Matsutani E, Sasada R, Kondo T, Kurokawa T. Novel secretory heparin-binding factors from human glioma cells (glia-activating factors) involved in glial cell growth. Purification and biological properties. *J Biol Chem.* 1993;268(4):2857-64.
478. Revest JM, DeMoerloose L, Dickson C. Fibroblast growth factor 9 secretion is mediated by a non-cleaved amino-terminal signal sequence. *J Biol Chem.* 2000;275(11):8083-90.
479. Selleck Chemicals. Tazemetostat (EPZ-6438). 2023. <https://www.selleckchem.com/datasheet/epz-6438-S712817-DataSheet.html>. Aufruf am 31.03.2023.
480. Ma Y, Kurtyka CA, Boyapalle S, Sung SS, Lawrence H, Guida W, Cress WD. A small-molecule E2F inhibitor blocks growth in a melanoma culture model. *Cancer Res.* 2008;68(15):6292-9.
481. Kong LJ, Chang JT, Bild AH, Nevins JR. Compensation and specificity of function within the E2F family. *Oncogene.* 2007;26(3):321-7.
482. DeGregori J, Kowalik T, Nevins JR. Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol.* 1995;15(8):4215-24.
483. Ishida S, Huang E, Zuzan H, Spang R, Leone G, West M, Nevins JR. Role for E2F in control of both DNA replication and mitotic functions as revealed from DNA microarray analysis. *Mol Cell Biol.* 2001;21(14):4684-99.

484. Kalma Y, Marash L, Lamed Y, Ginsberg D. Expression analysis using DNA microarrays demonstrates that E2F-1 up-regulates expression of DNA replication genes including replication protein A2. *Oncogene*. 2001;20(11):1379-87.
485. Sun Y, Tang S, Jin X, Zhang C, Zhao W, Xiao X. Involvement of the p38 MAPK signaling pathway in S-phase cell-cycle arrest induced by Furazolidone in human hepatoma G2 cells. *J Appl Toxicol*. 2013;33(12):1500-5.
486. Ohsie SJ, Sarantopoulos GP, Cochran AJ, Binder SW. Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol*. 2008;35(5):433-44.
487. Delamere NA. Ciliary Body and Ciliary Epithelium. *Adv Organ Biol*. 2005;10:127-48.
488. Sukeda A, Mori T, Suzuki S, Ochiai A. Adenocarcinoma of the pigmented ciliary epithelium. *BMJ Case Rep*. 2014;2014.
489. van Dinten LC, Pul N, van Nieuwpoort AF, Out CJ, Jager MJ, van den Elsen PJ. Uveal and cutaneous melanoma: shared expression characteristics of melanoma-associated antigens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(1):24-30.
490. Kleefeldt JM, Pozarska A, Nardiello C, Pfeffer T, Vadasz I, Herold S, Seeger W, Morty RE. Commercially available transfection reagents and negative control siRNA are not inert. *Anal Biochem*. 2020;606:113828.
491. Regulski MJ. Cellular Senescence: What, Why, and How. *Wounds*. 2017;29(6):168-74.
492. Munoz-Espin D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(7):482-96.
493. Chapman JR, Taylor MR, Boulton SJ. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell*. 2012;47(4):497-510.
494. Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem*. 2000;275(13):9390-5.
495. Mukherjee B, Kessinger C, Kobayashi J, Chen BP, Chen DJ, Chatterjee A, Burma S. DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)*. 2006;5(5):575-90.
496. Sun Y, Tran BN, Worley LA, Delston RB, Harbour JW. Functional analysis of the p53 pathway in response to ionizing radiation in uveal melanoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005;46(5):1561-4.
497. Whitaker RH, Cook JG. Stress Relief Techniques: p38 MAPK Determines the Balance of Cell Cycle and Apoptosis Pathways. *Biomolecules*. 2021;11(10).
498. Gubern A, Joaquin M, Marques M, Maseres P, Garcia-Garcia J, Amat R, Gonzalez-Nunez D, Oliva B, Real FX, de Nadal E, Posas F. The N-Terminal Phosphorylation of RB by p38 Bypasses Its Inactivation by CDKs and Prevents Proliferation in Cancer Cells. *Mol Cell*. 2016;64(1):25-36.
499. Lavoie JN, L'Allemain G, Brunet A, Muller R, Pouyssegur J. Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/p44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J Biol Chem*. 1996;271(34):20608-16.
500. Yee AS, Paulson EK, McDevitt MA, Rieger-Christ K, Summerhayes I, Berasi SP, Kim J, Huang CY, Zhang X. The HBP1 transcriptional repressor and the p38 MAP kinase: unlikely partners in G1 regulation and tumor suppression. *Gene*. 2004;336(1):1-13.
501. Casanovas O, Miro F, Estanyol JM, Itarte E, Agell N, Bachs O. Osmotic stress regulates the stability of cyclin D1 in a p38SAPK2-dependent manner. *J Biol Chem*. 2000;275(45):35091-7.
502. Cuenda A, Rouse J, Doza YN, Meier R, Cohen P, Gallagher TF, Young PR, Lee JC. SB 203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Lett*. 1995;364(2):229-33.
503. Populo H, Tavares S, Faustino A, Nunes JB, Lopes JM, Soares P. GNAQ and BRAF mutations show differential activation of the mTOR pathway in human transformed cells. *PeerJ*. 2013;1:e104.

504. Abdel-Rahman MH, Yang Y, Zhou XP, Craig EL, Davidorf FH, Eng C. High frequency of submicroscopic hemizygous deletion is a major mechanism of loss of expression of PTEN in uveal melanoma. *J Clin Oncol*. 2006;24(2):288-95.
505. Naus NC, Zuidervaart W, Rayman N, Slater R, van Drunen E, Ksander B, Luyten GP, Klein A. Mutation analysis of the PTEN gene in uveal melanoma cell lines. *Int J Cancer*. 2000;87(1):151-3.
506. Khan AA, Betel D, Miller ML, Sander C, Leslie CS, Marks DS. Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat Biotechnol*. 2009;27(6):549-55.
507. Liang XH, Hart CE, Crooke ST. Transfection of siRNAs can alter miRNA levels and trigger non-specific protein degradation in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1829(5):455-68.
508. Sharov AA, Nakatake Y, Wang W. Atlas of regulated target genes of transcription factors (ART-TF) in human ES cells. *BMC Bioinformatics*. 2022;23(1):377.
509. Hoek KS, Schlegel NC, Eichhoff OM, Widmer DS, Praetorius C, Einarsson SO, Valgeirsdottir S, Bergsteinsdottir K, Schepsky A, Dummer R, Steingrimsdottir E. Novel MITF targets identified using a two-step DNA microarray strategy. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2008;21(6):665-76.
510. McMahon AP. Development of the Mammalian Kidney. *Curr Top Dev Biol*. 2016;117:31-64.
511. Wang D, Wu F, Yuan H, Wang A, Kang GJ, Truong T, Chen L, McCallion AS, Gong X, Li S. Sox10(+) Cells Contribute to Vascular Development in Multiple Organs-Brief Report. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2017;37(9):1727-31.
512. Iskander SM, Feeney MM, Yee K, Rosenblum ND. Protein Kinase 2beta Is Expressed in Neural Crest-Derived Urinary Pacemaker Cells and Required for Pyeloureteric Contraction. *J Am Soc Nephrol*. 2018;29(4):1198-209.
513. Li S, Qin M, Mao S, Mei L, Cai X, Feng Y, He C, Song J. A comprehensive genotype-phenotype evaluation of eight Chinese probands with Waardenburg syndrome. *BMC Med Genomics*. 2022;15(1):230.
514. Reginensi A, Clarkson M, Neirijnck Y, Lu B, Ohyama T, Groves AK, Sock E, Wegner M, Costantini F, Chaboissier MC, Schedl A. SOX9 controls epithelial branching by activating RET effector genes during kidney development. *Hum Mol Genet*. 2011;20(6):1143-53.
515. Peirano RI, Goerich DE, Riethmacher D, Wegner M. Protein zero gene expression is regulated by the glial transcription factor Sox10. *Mol Cell Biol*. 2000;20(9):3198-209.
516. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
517. Phelps GB, Hagen HR, Amsterdam A, Lees JA. MITF deficiency accelerates GNAQ-driven uveal melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2022;119(19):e2107006119.
518. Busca R, Berra E, Gaggioli C, Khaled M, Bille K, Marchetti B, Thyss R, Fitsialos G, Larribere L, Bertolotto C, Virolle T, Barbry P, Pouyssegur J, Ponzio G, Ballotti R. Hypoxia-inducible factor 1{alpha} is a new target of microphthalmia-associated transcription factor (MITF) in melanoma cells. *J Cell Biol*. 2005;170(1):49-59.
519. Du J, Widlund HR, Horstmann MA, Ramaswamy S, Ross K, Huber WE, Nishimura EK, Golub TR, Fisher DE. Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell*. 2004;6(6):565-76.
520. Loercher AE, Tank EM, Delston RB, Harbour JW. MITF links differentiation with cell cycle arrest in melanocytes by transcriptional activation of INK4A. *J Cell Biol*. 2005;168(1):35-40.
521. Invitrogen by Life Technologies, Thermo Fisher Scientific. Lipofectamine™ RNAiMAX Reagent - Manual. 2023. https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FLipofectamine_RNAiMAX_Reag_protocol.pdf. Aufruf am 16.02.2023.

522. Gelmi M, Marinkovic M, Vu THK, van der Velden PA, Luyten GPM, Jager MJ. MITF: a progression marker in uveal melanoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2022;63(7):2353 – A0022-2353 – A0022.
523. Perez DE, Henle AM, Amsterdam A, Hagen HR, Lees JA. Uveal melanoma driver mutations in GNAQ/11 yield numerous changes in melanocyte biology. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2018;31(5):604-13.
524. Castelli MS, McGonigle P, Hornby PJ. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Pharmacol Res Perspect*. 2019;7(6):e00535.
525. Panicker RC, Chattopadhyaya S, Coyne AG, Srinivasan R. Allosteric Small-Molecule Serine/Threonine Kinase Inhibitors. *Adv Exp Med Biol*. 2019;1163:253-78.
526. Zhong L, Li Y, Xiong L, Wang W, Wu M, Yuan T, Yang W, Tian C, Miao Z, Wang T, Yang S. Small molecules in targeted cancer therapy: advances, challenges, and future perspectives. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):201.
527. Williams CAC, Soufi A, Pollard SM. Post-translational modification of SOX family proteins: Key biochemical targets in cancer? *Semin Cancer Biol*. 2020;67(Pt 1):30-8.
528. Riaz A, Rasul A, Hussain G, Zahoor MK, Jabeen F, Subhani Z, Younis T, Ali M, Sarfraz I, Selamoglu Z. Astragalin: A Bioactive Phytochemical with Potential Therapeutic Activities. *Adv Pharmacol Sci*. 2018;2018:9794625.
529. You OH, Shin EA, Lee H, Kim JH, Sim DY, Kim JH, Kim Y, Khil JH, Baek NI, Kim SH. Apoptotic Effect of Astragalin in Melanoma Skin Cancers via Activation of Caspases and Inhibition of Sry-related HMg-Box Gene 10. *Phytother Res*. 2017;31(10):1614-20.
530. Gavrillov K, Saltzman WM. Therapeutic siRNA: principles, challenges, and strategies. *Yale J Biol Med*. 2012;85(2):187-200.
531. Crooke ST, Baker BF, Crooke RM, Liang XH. Antisense technology: an overview and prospectus. *Nat Rev Drug Discov*. 2021;20(6):427-53.
532. Asad Z, Pandey A, Babu A, Sun Y, Shevade K, Kapoor S, Ullah I, Ranjan S, Scaria V, Bajpai R, Sachidanandan C. Rescue of neural crest-derived phenotypes in a zebrafish CHARGE model by Sox10 downregulation. *Hum Mol Genet*. 2016;25(16):3539-54.
533. Li X, Pu W, Zheng Q, Ai M, Chen S, Peng Y. Proteolysis-targeting chimeras (PROTACs) in cancer therapy. *Mol Cancer*. 2022;21(1):99.
534. Madan J, Ahuja VK, Dua K, Samajdar S, Ramchandra M, Giri S. PROTACs: Current Trends in Protein Degradation by Proteolysis-Targeting Chimeras. *BioDrugs*. 2022;36(5):609-23.
535. Bremer M, Frob F, Kichko T, Reeh P, Tamm ER, Suter U, Wegner M. Sox10 is required for Schwann-cell homeostasis and myelin maintenance in the adult peripheral nerve. *Glia*. 2011;59(7):1022-32.
536. Turnescu T, Arter J, Reiprich S, Tamm ER, Waisman A, Wegner M. Sox8 and Sox10 jointly maintain myelin gene expression in oligodendrocytes. *Glia*. 2018;66(2):279-94.
537. de Vries TJ, Trancikova D, Ruiter DJ, van Muijen GN. High expression of immunotherapy candidate proteins gp100, MART-1, tyrosinase and TRP-1 in uveal melanoma. *Br J Cancer*. 1998;78(9):1156-61.
538. Mullins JGL. Drug repurposing in silico screening platforms. *Biochem Soc Trans*. 2022;50(2):747-58.
539. Bartek J, Lukas C, Lukas J. Checking on DNA damage in S phase. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5(10):792-804.
540. Neuman E, Flemington EK, Sellers WR, Kaelin WG, Jr. Transcription of the E2F-1 gene is rendered cell cycle dependent by E2F DNA-binding sites within its promoter. *Mol Cell Biol*. 1994;14(10):6607-15.
541. Zeman MK, Cimprich KA. Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol*. 2014;16(1):2-9.
542. Thornton TM, Rincon M. Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. *Int J Biol Sci*. 2009;5(1):44-51.

543. Raman M, Earnest S, Zhang K, Zhao Y, Cobb MH. TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage. *EMBO J.* 2007;26(8):2005-14.
544. Trouillas M, Saucourt C, Duval D, Gauthereau X, Thibault C, Dembele D, Feraud O, Menager J, Rallu M, Pradier L, Boeuf H. Bcl2, a transcriptional target of p38alpha, is critical for neuronal commitment of mouse embryonic stem cells. *Cell Death Differ.* 2008;15(9):1450-9.
545. Lan W, Bian B, Xia Y, Dou S, Gayet O, Bigonnet M, Santofimia-Castano P, Cong M, Peng L, Dusetti N, Iovanna J. E2F signature is predictive for the pancreatic adenocarcinoma clinical outcome and sensitivity to E2F inhibitors, but not for the response to cytotoxic-based treatments. *Sci Rep.* 2018;8(1):8330.
546. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson A, Kampf C, Sjostedt E, Asplund A, Olsson I, Edlund K, Lundberg E, Navani S, Szgyarto CA, Odeberg J, Djureinovic D, Takanen JO, Hober S, Alm T, Edqvist PH, Berling H, Tegel H, Mulder J, Rockberg J, Nilsson P, Schwenk JM, Hamsten M, von Feilitzen K, Forsberg M, Persson L, Johansson F, Zwahlen M, von Heijne G, Nielsen J, Ponten F. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 2015;347(6220):1260419.
547. E2F1, The Human Protein Atlas, Version 22.0. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000101412-E2F1/tissue>. Aufruf am 10.03.2023.
548. Watt RK. The many faces of the octahedral ferritin protein. *Biometals.* 2011;24(3):489-500.
549. Vogt AS, Arsiwala T, Mohsen M, Vogel M, Manolova V, Bachmann MF. On Iron Metabolism and Its Regulation. *Int J Mol Sci.* 2021;22(9).
550. Byrne SL, Buckett PD, Kim J, Luo F, Sanford J, Chen J, Enns C, Wessling-Resnick M. Ferristatin II promotes degradation of transferrin receptor-1 in vitro and in vivo. *PLoS One.* 2013;8(7):e70199.
551. Horonchik L, Wessling-Resnick M. The small-molecule iron transport inhibitor ferristatin/NSC306711 promotes degradation of the transferrin receptor. *Chem Biol.* 2008;15(7):647-53.
552. Park CH, Valore EV, Waring AJ, Ganz T. Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. *J Biol Chem.* 2001;276(11):7806-10.
553. Huggenvik JI, Craven CM, Idzerda RL, Bernstein S, Kaplan J, McKnight GS. A splicing defect in the mouse transferrin gene leads to congenital atransferrinemia. *Blood.* 1989;74(1):482-6.
554. Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. *Int J Hematol.* 2008;88(1):7-15.
555. Cheli VT, Santiago Gonzalez DA, Wan R, Rosenblum SL, Denaroso GE, Angeliu CG, Smith Z, Wang C, Paez PM. Transferrin Receptor Is Necessary for Proper Oligodendrocyte Iron Homeostasis and Development. *J Neurosci.* 2023;43(20):3614-29.
556. Laske DW, Youle RJ, Oldfield EH. Tumor regression with regional distribution of the targeted toxin Tf-CRM107 in patients with malignant brain tumors. *Nat Med.* 1997;3(12):1362-8.
557. Weaver M, Laske DW. Transferrin receptor ligand-targeted toxin conjugate (Tf-CRM107) for therapy of malignant gliomas. *J Neurooncol.* 2003;65(1):3-13.
558. Richard C, Verdier F. Transferrin Receptors in Erythropoiesis. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24).
559. Candelaria PV, Leoh LS, Penichet ML, Daniels-Wells TR. Antibodies Targeting the Transferrin Receptor 1 (TfR1) as Direct Anti-cancer Agents. *Front Immunol.* 2021;12:607692.
560. Johnson M, El-Khoueiry A, Hafez N, Lakhani N, Mamdani H, Rodon J, Sanborn RE, Garcia-Corbacho J, Boni V, Stroh M, Hannah AL, Wang S, Castro H, Spira A. Phase I, First-in-Human Study of the Probody Therapeutic CX-2029 in Adults with Advanced Solid Tumor Malignancies. *Clin Cancer Res.* 2021;27(16):4521-30.
561. Ogama Y, Kumagai Y, Komatsu N, Araki M, Masubuchi N, Akiyoshi H, Matsuura T, Kirisako H, Kyoya A, Nomura F, Ohira Y, Yokokawa T, Yamamoto Y. Phase 1 Clinical Trial of PPMX-T003, a Novel Human Monoclonal Antibody Specific for Transferrin Receptor 1, to Evaluate Its Safety, Pharmacokinetics, and Pharmacodynamics. *Clin Pharmacol Drug Dev.* 2022.

562. Selleck Chemicals. GSK126. 2023. <https://www.selleckchem.com/products/gsk126.html>. Aufruf am 04.03.2023.
563. Miyakawa K, Hatsuzawa K, Kurokawa T, Asada M, Kuroiwa T, Imamura T. A hydrophobic region locating at the center of fibroblast growth factor-9 is crucial for its secretion. *J Biol Chem.* 1999;274(41):29352-7.

Danksagung

Vielen herzlichen Dank an...

... meine Doktormutter und Mentorin Prof. Dr. med. Carola Berking, die es mir ermöglichte, unter ihrer Führung diese Dissertation in ihrer Arbeitsgruppe anzufertigen, wodurch ich nicht nur an einem spannenden experimentellen Projekt arbeiten konnte, sondern auch die Freiheit und Möglichkeit bekam, eigene Projektideen zu entwickeln und die Dermatookologie abseits des Labors kennenzulernen und wissenschaftlich zu bearbeiten. Vielen Dank für Deine Führung und Deinen Rat, Dein Vertrauen in meine Fähigkeiten, Deine Unterstützung bei meiner Weiterentwicklung als Wissenschaftlerin und dass Du stets den Austausch mit anderen Nachwuchswissenschaftlern gefördert hast, wodurch ich nicht nur beruflich wertvolle, sondern auch viele neue freundschaftliche Kontakte knüpfen konnte!

...Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Thomas Ruzicka und Prof. Dr. med. Lars E. French für die Möglichkeit, meine Promotion an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie des Klinikums der LMU München durchführen zu dürfen.

...PD Dr. med. Dr. rer. biol. hum. Markus Heppt für die exzellente Mitbetreuung meiner Arbeit, das gemeinsame Tüfteln an der Umsetzung und Generierung neuer Projektideen, für besondere Gesellschaftsabende am Hautkrebskongress, Deinen wertvollen Rat und Deine Unterstützung!

... meine "Doktorzwillingsschwester" Dr. rer. biol. hum. Theresa Steeb, die mich seit unserem ersten gemeinsamen Tag an der Hautklinik durch alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit begleitete und immer unterstützte. Vielen Dank, dass Du während dieser herausfordernden Zeit sowohl im Beruflichen als auch Privaten immer an meiner Seite warst!

... Claudia Kammerbauer, die gute Seele des Münchner Derma-Labors, die mir alle Techniken beibrachte, die ich für diese Arbeit benötigte, mit der ich sehr viel Spaß während unserer gemeinsamen Zeit hatte, die mich stets unterstützte und die ich seit dem Umzug der AG sehr vermisse!

... Christopher Lischer, M.Sc. für die Auswertung der RNA-Sequenzierungsergebnisse, die die entscheidenden Impulse für die Weiterentwicklung dieses Projekts erst möglich gemacht haben, den ausgiebigen Austausch, die emotionale Unterstützung in den schwierigen Phasen der Doktorarbeit, für den Spaß bei der Etablierung neuer Labormethoden, beim Kaffeetrinken, Diskutieren und Mittagessen und die Unterstützung auch abseits des Doktorandendaseins!

... meine Labornachbarinnen Dr. rer. nat. Tatjana Sauerer, Annett Hamann und Waltraud Fröhlich für den Austausch, die Unterstützung während des Umzugs und Umbaus des Labors und die lustigen Abende, die mir den Umzug ins fränkische „Exil“ leichter gemacht haben.

... meine lieben Kolleginnen Anne Petzold, M.Sc. und Anett Leppert, M.Sc. für die gute Zusammenarbeit und die gemeinsamen Stunden im Büro in der Hartmannstraße.

... Adrian Weich, M.Sc. und Prof. Dr. Julio Vera-Gonzalez für die Erstellung der UM-Protein-Interaktionsnetzwerke, die entscheidend für den Erfolg des letzten Projektabschnittes dieser Arbeit waren.

... Martin Eberhardt, M.Sc., Luca Musella, M.Sc., Jimmy Retzlaff, M.Sc., Dr. rer. nat. Xin Lai, Esther Güse, M.Sc. und Chunyan Luan für den gegenseitigen Austausch und die vielen interessanten und lustigen gemeinsamen Mittagessen.

... Prof. Dr. Anja Bosserhoff, Prof. Dr. Silke Kuphal, Dr. rer.nat Lisa Linck-Paulus und Dr. rer. nat. Ines Böhme-Schäfer für die nette Aufnahme in der Biochemie und die Gewährung von "Laborasyl" während der ersten Umzugsphase nach Erlangen.

... das Team der Dermatohistologie und der Pathologie des Uniklinikums Erlangen für die Durchführung der immunhistochemischen Färbungen.

... Dr. Elias A.T. Koch und Lena Stich für ihre Hilfe bei der Aufnahme und Auswertung der immunhistochemischen Färbungen.

... und an meine Eltern, meine Schwester, meinen Freund Korbinian und alle Freunde, die mich auf meinem Weg zur Promotion stets unterstützt und immer an mich geglaubt haben.

Affidavit



Promotionsbüro
Medizinische Fakultät



Eidesstattliche Versicherung

Wessely, Anja Katharina

Name, Vorname

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

Funktionelle Analyse des Transkriptionsfaktors SOX10 im Uveamelanom

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.

Erlangen, 04.06.2024

Ort, Datum

Anja Wessely

Unterschrift Doktorandin

Lebenslauf

Publikationsliste

*: geteilte Autorenschaft

Impact Factor (IF) des Erscheinungsjahres ist in Klammern aufgeführt

1. Koch EAT, Petzold A, **Wessely A**, Dippel E, Eckstein M, Gesierich A, Gutzmer R, Hassel JC, Knorr H, Kreuzberg N, Leiter U, Loquai C, Meier F, Meissner M, Mohr P, Pföhler C, Rahimi F, Schadendorf D, Schlaak M, Thoms KM, Ugurel S, Utikal J, Weichenthal M, Schuler-Thurner B, Berking C, Heppt MV. Liver-directed treatment is associated with improved survival and increased response to immune checkpoint blockade in metastatic uveal melanoma: results from a retrospective multicenter trial. *Front Med*. 2023 Jul 4. doi: 10.1007/s11684-023-0993-y. Online ahead of print. PMID: 37432641 (IF: -)
2. Steeb T, **Wessely A**, Heppt MV, Erdmann M, Klug SJ, Berking C. Opportunities to inform German residents about the possibility of skin cancer screening and to inform stakeholders to take appropriate actions: A qualitative approach. *Cancer Med*. 2023 Apr 16. doi: 10.1002/cam4.5717. Online ahead of print. PMID: 37062065 (IF: -)
3. Kaufmann MD, Steeb T, **Wessely A**, Meyerolbersleben M, French LE, Berking C, Heppt MV. elmunonkologie: Development and Launch of a Virtual Education Platform for the Immunotherapy of Cutaneous Neoplasms. *Med Sci Educ*. 2022 Dec 20;33(1):7-9. doi: 10.1007/s40670-022-01713-8. eCollection 2023 Feb. PMID: 37008444 (IF: -)
4. Petzold A, Steeb T, **Wessely A**, Koch EAT, Vera J, Berking C, Heppt MV. Is tebentafusp superior to combined immune checkpoint blockade and other systemic treatments in metastatic uveal melanoma? A comparative efficacy analysis with population adjustment. *Cancer Treat Rev*. 2023 Apr;115:102543. doi: 10.1016/j.ctrv.2023.102543. Epub 2023 Mar 13. PMID: 36931146 (IF: -)
5. Müller K, Berking C, Voskens C, Heppt MV, Heinzerling L, Koch EAT, Kramer R, Merkel S, Schuler-Thurner B, Schellerer V, Steeb T, **Wessely A**, Erdmann M. Conventional and three-dimensional photography as a tool to map distribution patterns of in-transit melanoma metastases on the lower extremity. *Front Med (Lausanne)*. 2023 Jan 19;10:1089013. doi: 10.3389/fmed.2023.1089013. eCollection 2023. PMID: 36744147 (IF: -)
6. Steeb T, Reinhardt L, Strasser C, **Wessely A**, Schelling J, Petzold A, Heppt MV, Meier F, Berking C. The need for regular training in skin cancer screening: a cross-sectional study among general practitioners in Germany. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2022 Jun 27. doi: 10.1111/jdv.18366. Online ahead of print. PMID: 35757900 (IF: 9,2)
7. Petzold A, Steeb T, **Wessely A**, Schatton T, Berking C, Heppt MV. Comparative efficacy analysis identifies immune checkpoint blockade as a new survival benchmark in advanced cutaneous squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer*. 2022 Jul;170:42-53. doi: 10.1016/j.ejca.2022.03.035. Epub 2022 May 17. PMID: 35594611 (IF: 10,0)
8. Steeb T, Petzold A, Hornung A, **Wessely A**, Berking C, Heppt MV. Spontaneous regression rates of actinic keratosis: a systematic review and pooled analysis of randomized controlled trials. *Sci Rep*. 2022 Apr 7;12(1):5884. doi: 10.1038/s41598-022-09722-8. PMID: 35393452 (IF: 5,0)
9. Koch EAT, Petzold A, **Wessely A**, Dippel E, Gesierich A, Gutzmer R, Hassel JC, Haferkamp S, Kähler KC, Knorr H, Kreuzberg N, Leiter U, Loquai C, Meier F, Meissner M, Mohr P, Pföhler

- C, Rahimi F, Schadendorf D, Schell B, Schlaak M, Terheyden P, Thoms KM, Schuler-Thurner B, Ugurel S, Ulrich J, Utikal J, Weichenthal M, Ziller F, Berking C, Heppt MV. Immune Checkpoint Blockade for Metastatic Uveal Melanoma: Re-Induction following Resistance or Toxicity. *Cancers (Basel)*. 2022 Jan 20;14(3):518. doi: 10.3390/cancers14030518. PMID: 35158786 (IF: 6,6)
10. Heppt MV*, **Wessely A***, Hornig E, Kammerbauer C, Graf SA, Besch R, French LE, Matthies A, Kuphal S, Kappellmann-Fenzl M, Bosserhoff AK, Berking C. HDAC2 Is Involved in the Regulation of BRN3A in Melanocytes and Melanoma. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 13;23(2):849. doi: 10.3390/ijms23020849. PMID: 35055045 (IF: 6,2)
 11. Steeb T, Heppt MV, Erdmann M, **Wessely A**, Klug SJ, Berking C. Increasing Participation Rates in Germany's Skin Cancer Screening Program (HELIOS): Protocol for a Mixed Methods Study. *JMIR Res Protoc*. 2021 Dec 13;10(12):e31860. doi: 10.2196/31860. PMID: 34898465 (IF: 1,8)
 12. Lai X, Zhou J, **Wessely A**, Heppt M, Maier A, Berking C, Vera J, Zhang L. A disease network-based deep learning approach for characterizing melanoma. *Int J Cancer*. 2021 Oct 29. doi: 10.1002/ijc.33860. Online ahead of print. PMID: 34716589 (IF: 7,3)
 13. Koch EAT, Petzold A, **Wessely A**, Dippel E, Erdmann M, Heinzerling L, Hohberger B, Knorr H, Leiter U, Meier F, Mohr P, Rahimi F, Schell B, Schlaak M, Terheyden P, Schuler-Thurner B, Ugurel S, Utikal J, Vera J, Weichenthal M, Ziller F, Berking C, Heppt MV. Clinical determinants of long-term survival in metastatic uveal melanoma. *Cancer Immunol Immunother*. 2021 Oct 28. doi: 10.1007/s00262-021-03090-4. Online ahead of print. PMID: 34709438 (IF: 7,0)
 14. Steeb T, **Wessely A**, Petzold A, Schmitz L, Dirschka T, Berking C, Heppt MV. How to Assess the Efficacy of Interventions for Actinic Keratosis? A Review with a Focus on Long-Term Results. *J Clin Med*. 2021 Oct 15;10(20):4736. doi: 10.3390/jcm10204736. (IF: 4,2)
 15. Steeb T, **Wessely A**, Petzold A, Kohl C, Erdmann M, Berking C, Heppt MV. c-Kit inhibitors for unresectable or metastatic mucosal, acral or chronically sun-damaged melanoma: a systematic review and one-arm meta-analysis. *Eur J Cancer*. 2021 Sep 22;157:348-357. doi: 10.1016/j.ejca.2021.08.015. PMID: 34562816 (IF: 9,2)
 16. Steeb T, **Wessely A**, Petzold A, Brinker TJ, Schmitz L, Leiter U, Garbe C, Schöffski O, Berking C, Heppt MV. Evaluation of Long-term Clearance Rates of Interventions for Actinic Keratosis: A Systematic Review and Network Meta-analysis. *JAMA Dermatol*. 2021 Aug 4. doi: 10.1001/jamadermatol.2021.2779. Online ahead of print. PMID: 34347015 (IF: 10,3)
 17. Koch EAT, Petzold A, **Wessely A**, Dippel E, Gesierich A, Gutzmer R, Hassel JC, Haferkamp S, Hohberger B, Kähler KC, Knorr H, Kreuzberg N, Leiter U, Loquai C, Meier F, Meissner M, Mohr P, Pföhler C, Rahimi F, Schadendorf D, Schell B, Schlaak M, Terheyden P, Thoms KM, Schuler-Thurner B, Ugurel S, Ulrich J, Utikal J, Weichenthal M, Ziller F, Berking C, Heppt MV, On Behalf Of The German Dermatologic Cooperative Oncology Group DeCOG Committee Ocular Melanoma. Immune Checkpoint Blockade for Metastatic Uveal Melanoma: Patterns of Response and Survival According to the Presence of Hepatic and Extrahepatic Metastasis. *Cancers (Basel)*. 2021 Jul 4;13(13):3359. doi: 10.3390/cancers13133359. PMID: 34283061 (IF: 6,6)

18. **Wessely A**, Steeb T, Berking C, Heppt MV. How Neural Crest Transcription Factors Contribute to Melanoma Heterogeneity, Cellular Plasticity, and Treatment Resistance. *Int J Mol Sci*. 2021 May 28;22(11):5761. doi: 10.3390/ijms22115761. PMID: 34071193 (IF: 5,9)
19. Steeb T, **Wessely A**, Merkl H, Kirchberger MC, Voskens C, Erdmann M, Heinzerling L, Berking C, Heppt MV. "I Feel I'm in Best Hands with You!": A Survey of Patient Satisfaction in a German University Skin Cancer Centre. *Acta Derm Venereol*. 2021 Jun 28;101(6):adv00482. doi: 10.2340/00015555-3837. PMID: 34027558 (IF: 4,4)
20. Steeb T, **Wessely A**, Petzold A, Brinker TJ, Schmitz L, Schöffski O, Berking C, Heppt MV. Long-term recurrence rates of actinic keratosis: a systematic review and pooled analysis of randomized controlled trials. *J Am Acad Dermatol*. 2021 Apr 16:S0190-9622(21)00815-X. doi: 10.1016/j.jaad.2021.04.017. Online ahead of print. PMID: 33872716 (IF: 11,5)
21. Steeb T, Follmann M, Langer T, Nothacker M, **Wessely A**, Garbe C, Leiter U, Berking C, Heppt MV. Online-Konsensuskonferenzen für die Entwicklung und Aktualisierung von Leitlinien für die klinische Praxis: Eine Umfrage unter den Teilnehmenden der deutschen S3-Leitlinie zur aktinischen Keratose und kutanem Plattenepithelkarzinom. *J Dtsch Dermatol Ges*. 2021 Apr;19(4):608-611. doi: 10.1111/ddg.14397_g. PMID: 33861005 (IF: 5,6)
22. Koch EAT, **Wessely A**, Steeb T, Berking C, Heppt MV. Safety of topical interventions for the treatment of actinic keratosis. *Expert Opin Drug Saf*. 2021 Apr 27:1-14. doi: 10.1080/14740338.2021.1915280. Online ahead of print. PMID: 33834933 (IF: 4,3)
23. **Wessely A**, Steeb T, Heppt F, Hornung A, Kaufmann MD, Koch EAT, Toussaint F, Erdmann M, Berking C, Heppt MV. A Critical Appraisal of Evidence- and Consensus-Based Guidelines for Actinic Keratosis. *Curr Oncol*. 2021 Feb 19;28(1):950-960. doi: 10.3390/curroncol28010093. PMID: 33617511. (IF: 3,7)
24. Hornung A, Steeb T, **Wessely A**, Brinker TJ, Breakell T, Erdmann M, Berking C, Heppt MV. The Value of Total Body Photography for the Early Detection of Melanoma: A Systematic Review. *Int J Environ Res Public Health*. 2021 Feb 10;18(4):1726. doi: 10.3390/ijerph18041726. PMID: 33578996 (IF: 3,4)
25. Steeb T, **Wessely A**, Merkl H, Voskens C, Erdmann M, Heinzerling L, Berking C, Heppt MV. Experiences of In-Patients with Skin Cancer in a German University Hospital Setting: A Cross-Sectional Survey. *Patient Prefer Adherence*. 2021 Jan 12;15:41-48. doi: 10.2147/PPA.S276417. eCollection 2021. PMID: 3346927 (IF: 2,7)
26. **Wessely A**, Steeb T, Leiter U, Garbe C, Berking C, Heppt MV. Immune Checkpoint Blockade in Advanced Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: What Do We Currently Know in 2020? *Int J Mol Sci*. 2020 Dec 6;21(23):E9300. doi: 10.3390/ijms21239300. (IF: 5,9)
27. **Wessely A**, Steeb T, Berking C, Schlaak M, Heppt MV; German Dermatologic Cooperative Oncology Group (DeCOG, committee ocular melanoma). Surveillance of patients with conjunctival melanoma in German-speaking countries: A multinational survey of the German dermatologic cooperative oncology group. *Eur J Cancer*. 2020 Dec 3;143:43-45. doi: 10.1016/j.ejca.2020.10.021. Online ahead of print. (IF: 9,2)
28. Steeb T, **Wessely A**, Alter M, Bayerl C, Bender A, Bruning G, Dabrowski E, Debus D, Derveux N, Dippel E, Drexler K, Dücker P, Dummer R, Emmert S, Elsner P, Enk A, Gebhardt C, Gesierich A, Goebeler M, Goerdts S, Goetze S, Gutzmer R, Haferkamp S, Hansel G, Hassel JC, Heinzerling L, Kähler KC, Kaume KM, Krapf W, Kreuzberg N, Lehmann P, Livingstone E,

- Löffler H, Loquai C, Mauch C, Mangana J, Meier F, Meissner M, Moritz RKC, Maul LV, Müller V, Mohr P, Navarini A, Van Nguyen A, Pfeiffer C, Pföhler C, Posch C, Richtig E, Rompel R, Sachse MM, Sauder S, Schadendorf D, Schatton K, Schulze HJ, Schultz E, Schilling B, Schmuth M, Simon JC, Streit M, Terheyden P, Thiem A, Tüting T, Welzel J, Weyandt G, Wesselmann U, Wollina U, Ziemer M, Zimmer L, Zutt M, Berking C, Schlaak M, Heppt MV; German Dermatologic Cooperative Oncology Group (DeCOG, committee ocular melanoma). Patterns of care and follow-up care of patients with uveal melanoma in German-speaking countries: a multinational survey of the German Dermatologic Cooperative Oncology Group (DeCOG). *J Cancer Res Clin Oncol*. 2020 Nov 21. doi: 10.1007/s00432-020-03450-0. Online ahead of print. (IF: 4,6)
29. Jakob L, Steeb T, Fiocco Z, Pumnea T, Jakob SN, **Wessely A**, Rothenberger CC, Brinker TJ, French LE, Berking C, Heppt MV. Patient Perception of Mobile Phone Apps for the Care and Prevention of Sexually Transmitted Diseases: Cross-Sectional Study. *JMIR Mhealth Uhealth*. 2020 Nov 10;8(11):e16517. doi: 10.2196/16517. (IF: 4,8)
30. **Wessely A***, Heppt MV*, Kammerbauer C, Steeb T, Kirchner T, Flaig MJ, French LE, Berking C, Schmoeckel E, Reinholz M. Evaluation of PD-L1 Expression and HPV Genotyping in Anal Squamous Cell Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2020 Sep 4;12(9):E2516. doi: 10.3390/cancers12092516. (IF: 6,6)
31. Steeb T, Koch EAT, **Wessely A**, Wiest LG, Schmitz L, Berking C, Heppt MV. Chemical peelings for the treatment of actinic keratosis: A systematic review and meta-analysis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2020 Aug 3. doi: 10.1111/jdv.16844. (IF: 6,2)
32. Steeb T, **Wessely A**, Harlaß M, Heppt F, Koch EAT, Leiter U, Garbe C, Schöffski O, Berking C, Heppt MV. A Systematic Review and Meta-Analysis of Interventions for Actinic Keratosis from Post-Marketing Surveillance Trials. *J Clin Med*. 2020 Jul 15;9(7):E2253. doi: 10.3390/jcm9072253. (IF: 5,7)
33. Steeb T, **Wessely A**, Schmitz L, Heppt F, Kirchberger MC, Berking C, Heppt MV. Interventions for actinic keratosis in non-scalp and non-face localizations: results from a systematic review with network meta-analysis. *J Invest Dermatol*. 2020 Jul 6:S0022-202X(20)31829-7. doi: 10.1016/j.jid.2020.06.021. (IF: 8,6)
34. Steeb T, **Wessely A**, Drexler K, Salzmann M, Toussaint F, Heinzerling L, Reinholz M, Berking C, Heppt MV. The Quality of Practice Guidelines for Melanoma: A Methodologic Appraisal with the AGREE II and AGREE-REX Instruments. *Cancers (Basel)*. 2020 Jun 18;12(6):E1613. doi: 10.3390/cancers12061613. (IF: 6,6)
35. Steeb T, **Wessely A**, von Bubnoff D, Dirschka T, Drexler K, Falkenberg C, Hassel JC, Hayani K, Hüning S, Kähler KC, Karrer S, Krammer C, Leiter U, Lill D, Marsela E, Meiwes AO, Nashan D, Nasifoglu S, Schmitz L, Sirokay J, Thiem A, Utikal J, Zink A, Berking C, Heppt MV: Treatment Motivations and Expectations in Patients with Actinic Keratosis: A German-Wide Multi-center, Cross-Sectional Trial. *J Clin Med*. 2020 May 12;9(5). pii: E1438. doi: 10.3390/jcm9051438. (IF: 5,7)
36. Steeb T, **Wessely A**, Heppt F, Harlaß M, Berking C, Heppt MV: Where do we stand with immune checkpoint blockade for advanced cutaneous squamous cell carcinoma? A systematic review and critical appraisal of existing evidence. *Br J Dermatol*. 2020 Aug;183(2):380-382. doi: 10.1111/bjd.18957. Epub 2020 Mar 29. (IF: 9,3)

37. **Wessely A**, Steeb T, Erdmann M, Heinzerling L, Vera J, Schlaak M, Berking C, Heppt MV: The Role of Immune Checkpoint Blockade in Uveal Melanoma. *Int J Mol Sci.* 2020 Jan 29;21(3). pii: E879. doi: 10.3390/ijms21030879. (IF: 5,9)
38. Heppt MV*, Clanner-Engelshofen BM*, Marsela E, **Wessely A**, Kammerbauer C, Przybilla B, French LE, Berking C, Reinholz M: Comparative analysis of the phototoxicity induced by BRAF inhibitors and alleviation through antioxidants. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2020 Mar;36(2):126-134. doi: 10.1111/phpp.12520. Epub 2019 Nov 11. (IF: 2,4)
39. Steeb T, **Wessely A**, Leiter U, French LE, Berking C, Heppt MV: The more the better? An appraisal of combination therapies for actinic keratosis. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2020 Apr;34(4):727-732. doi: 10.1111/jdv.15998. Epub 2019 Nov 11. (IF: 6,2)
40. **Wessely A**, Waltera A, Reichert TE, Stöckl S, Grässel S, Bauer RJ: Induction of ALP and MMP9 activity facilitates invasive behavior in heterogeneous human BMSC and HNSCC 3D spheroids. *FASEB J.* 2019 Nov;33(11):11884-11893. Epub 2019 Jul 31. doi: 10.1096/fj.201900925R. (IF: 5,0)
41. Steeb T, **Wessely A**, Mastnik S, Brinker TJ, French LE, Niesert AC, Berking C, Heppt MV: Patient Attitudes and Their Awareness Towards Skin Cancer-Related Apps: Cross-Sectional Survey. *JMIR Mhealth Uhealth.* 2019 Jul 2;7(7):e13844. doi: 10.2196/13844. (IF: 4,3)
42. Steeb T, **Wessely A**, French LE, Heppt MV, Berking C: Skin Cancer Smartphone Applications for German-speaking Patients: Review and Content Analysis Using the Mobile App Rating Scale. *Acta Derm Venereol.* 201999: 1043–1044, Epub Jun 24. doi: 10.2340/00015555-3240. (IF: 4,0)
43. Graf SA*, Heppt MV*, **Wessely A**, Krebs S, Kammerbauer C, Hornig E, Strieder A, Blum H, Bosserhoff AK, Berking C: The myelin protein PMP2 is regulated by SOX10 and drives melanoma cell invasion. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2019 May;32 (3):424-434. doi: 10.1111/pcmr.12760. Epub 2018 Dec 21. (IF: 3,7)
44. Steeb T, **Wessely A**, Niesert AC, Ruzicka T, von Braunmühl T, Berking C, Heppt MV: Patient Attitude towards Videodermatoscopy for the Detection of Skin Cancer: A Cross-Sectional Study. *Oncol Res Treat.* 2019 Apr 17:1-6. doi: 10.1159/000499630. (IF: 2,0)
45. Steeb T, **Wessely A**, Ruzicka T, Heppt MV, Berking C: How to MEK the best of uveal melanoma: A systematic review on the efficacy and safety of MEK inhibitors in metastatic or unresectable uveal melanoma. *Eur J Cancer.* 2018 Nov;103:41-51. doi: 10.1016/j.ejca.2018.08.005. Epub 2018 Sep 8. (IF: 6,7)