

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie  
der Universität Würzburg

Direktor: Professor Dr. med. M. Goebeler

**p53-Inaktivierung im Melanom – ein therapeutischer Ansatzpunkt?**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der

Medizinischen Fakultät

der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Corinna Schmid

aus Mindelzell

Würzburg, Juli 2017



**Referentin:** Prof. Dr. Eva-Bettina Bröcker  
**Koreferentin:** Prof. Dr. Svenja Meierjohann  
**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 13. Februar 2018

**Die Promovendin ist Ärztin**

Meinen Eltern



## **Inhaltsverzeichnis**

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	Das Melanom .....	1
1.2	Die Entstehung des Melanoms .....	2
1.3	p53 – Wächter des Genoms.....	6
1.3.1	Struktureller Aufbau von p53.....	6
1.3.2	Funktion und Regulation von p53 .....	7
1.3.3	Die Rolle von p53 im Melanom .....	9
1.4	Die Rolle von TRP-2 im Melanom .....	11
1.5	Zielsetzung/Fragestellung der Arbeit .....	13
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>14</b>
2.1	Material.....	14
2.1.1	Technische Geräte.....	14
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.3	Reagenzien .....	17
2.1.4	Puffer und Lösungen .....	18
2.1.5	Medien .....	21
2.1.6	Komplettsysteme .....	21
2.1.7	Vektorsysteme.....	22
2.1.8	Zelllinien .....	25
2.1.8.1	Melanomzelllinien .....	25
2.1.8.2	Andere Zelllinien.....	25
2.1.9	Enzyme .....	26
2.1.10	Oligonukleotide und Primer .....	26
2.1.11	Antikörper .....	27

## Inhaltsverzeichnis

---

2.1.12	Software .....	27
2.2	Methoden .....	28
2.2.1	Zellkultur.....	28
2.2.2	Herstellung von lenti- und retroviralen Viren und Infektion der Zielzellen.....	29
2.2.2.1	Transfektion von HEK293T-Lenti-X Zellen .....	29
2.2.2.2	Transduktion der Melanomzelllinien .....	29
2.2.3	Messung von p53-Aktivität und Zellproliferation .....	31
2.2.3.1	Durchflusszytometrie .....	31
2.2.3.2	Zellzyklusanalyse mittels Quantifizierung des zellulären DNA-Gehalts.....	32
2.2.3.3	Reporter-gen-Assays.....	33
2.2.4	Spezifischer Nachweis von Proteinen .....	36
2.2.4.1	Herstellung von Gesamtzell-Lysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration.....	36
2.2.4.2	Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	37
2.2.4.3	Western Blot.....	38
2.2.5	Annealing von DNA-Oligonukleotiden .....	39
2.2.6	Doppelrestriktion der Zielvektoren und Inserts.....	40
2.2.7	Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren .....	42
2.2.8	DNA-Extraktion aus Agarosegelen .....	42
2.2.9	Ligation des DNA-Inserts in Vektoren .....	42
2.2.10	Sequenzierung von DNA.....	43
2.2.11	Transformation.....	43
2.2.12	PCR- Klonierung.....	44
2.2.13	In-vitro-Mutagenese.....	45
2.2.14	Behandlung der Zellen mit Nutlin-3a .....	46

<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
3.1	Funktionelle p53-Inaktivität in drei von sieben p53-wildtypischen Melanomzelllinien .....	47
3.2	Zellzyklusarrest durch Erhöhung intrinsischer p53-Aktivität mittels Nutlin-3a ..	49
3.3	Keine Korrelation der TRP2- und p53-Expression.....	51
3.3.1	Kein Anstieg der p53-Expression nach TRP2-Knockdown.....	52
3.3.2	Wachstumshemmung unter dem Einfluss von TRP2_1 und TRP2_2 in fünf Melanomzelllinien .....	53
3.3.3	Moderater Anstieg der p53-Aktivität bei einer von drei TRP2-shRNAs.....	55
3.3.4	Einfluss von TRP2-shRNAs auf p53-Aktivität ist unabhängig von der TRP2-Expression.....	57
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>59</b>
4.1	Aktuelle Therapieoptionen beim fortgeschrittenen Melanom, Therapieentscheidung und –limitationen.....	59
4.2	p53 als Ansatzpunkt für eine spezifische Melanomtherapie .....	60
4.2.1	Stellenwert von p53 in der Melanomforschung und -therapie .....	60
4.2.2	Ursachen posttranslationaler Inaktivierung von p53 im Melanom .....	61
4.2.3	Wirkung endogener p53-Aktivität auf die Melanomzelle.....	62
4.2.4	Erhöhung der p53-Aktivität als therapeutischer Ansatzpunkt .....	63
4.3	TRP2 reguliert p53 in Melanomzellen nicht .....	65
4.4	<i>Off-target</i> -Effekte und Einfluss der Zellkultur .....	67
4.5	Möglichkeiten und Limitationen der verwendeten Methoden.....	68
4.5.1	Western Blot.....	68
4.5.2	GFP- und Luciferase-Assay .....	68
4.5.3	Zellzyklusanalyse .....	69

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>70</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>72</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>83</b>
7.1	Abbildungsverzeichnis .....	83
7.2	Tabellenverzeichnis.....	84
7.3	Abkürzungsverzeichnis .....	85

**Danksagung**

**Publikationen**

**Lebenslauf**



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Melanom

Das Melanom ist ein hochmaligner Tumor. Es geht von den Pigment produzierenden Zellen der Haut, den sogenannten Melanozyten, aus, die sich im Stratum basale der Epidermis befinden. Man unterscheidet das Melanom der Haut von extrakutanen Manifestationen wie etwa der anorektalen Schleimhaut und der Aderhaut des Auges.

Bis zum Jahr 2030 wird ein Anstieg der Neuerkrankungsrate und der Melanombedingten Todesfälle erwartet (1). Im Zuge flächendeckender Verfügbarkeit und Optimierung der Therapieoptionen rechnen aktuelle Arbeiten mit einer fallenden Zahl Melanombedingter Todesfälle ab 2030. Da eine deutschlandweite Krebsregistrierung bisher nicht vorhanden ist, nahm das Robert-Koch-Institut für das Jahr 2012 basierend auf den Daten der Krebsregister der Bundesländer ca. 20.800 Neuerkrankungen pro Jahr in Deutschland an (2). Die weltweite Inzidenz betrug einer aktuellen Veröffentlichung zufolge für das Jahr 2015 351.880 Neuerkrankungen (3).

Betroffen sind vor allem hellhäutige Menschen aus Nordeuropa, Israel, Australien, Neuseeland und Nordamerika. Je höher deren durch den Wohnort bedingte UV-Belastung ist, desto höher ist die Melanominzidenz. Ihr Lebenszeitrisko, an einem Melanom zu erkranken, ist zirka 23-mal höher als das von dunkelhäutigen Menschen (4). Nach dem Basalzell- und dem Plattenepithelkarzinom ist das Melanom der dritthäufigste Hauttumor. Obwohl es lediglich 4 % aller Hautkrebserkrankungen ausmacht, ist es dennoch ursächlich für 80 % der Todesfälle durch Hauttumoren (5). Wird das Melanom im Stadium I (AJCC 2009) erkannt und vollständig exzidiert, liegt die 5-Jahres-Überlebensrate bei annähernd 100 % (6). Im Stadium der Fernmetastasierung gilt die Erkrankung weiterhin als nur selten heilbar. Die Mortalität beträgt etwa 59.782 Melanombedingter Todesfälle pro Jahr weltweit (3).

Eine frühe Diagnose ist entscheidend, um Morbidität und Mortalität zu senken (7). Neben der Selbstuntersuchung durch den Patienten sind die klinische Untersuchung beim Hautfacharzt und Hautkrebs-Screening-Programme wichtig für die

Früherkennung von Melanomen. Zu den Untersuchungsmethoden gehören unter anderem die Inspektion, Dermatoskopie und Ganzkörperphotographie. In Zusammenhang mit der makroskopischen Beurteilung von Pigmentmalen spricht man von der ABCDE-Regel. A (Asymmetry) steht für die asymmetrische Form des Tumors, B (Border Irregularity) beschreibt eine unscharfe Begrenzung zur weniger pigmentierten Umgebung, C (Color) meint die ungleichmäßige Färbung innerhalb des Pigmentmals, der Durchmesser D (Diameter) an der breitesten Stelle beträgt mehr als fünf Millimeter und der Tumor breitet sich aus, E (Evolving) (8, 9). Besteht ein begründeter Verdacht auf ein Melanom, sind die Exzision des verdächtigen Gewebes und dessen histologische und immunhistochemische Begutachtung notwendig.

### **1.2 Die Entstehung des Melanoms**

Maligne Tumoren jeden Ursprungs entstehen durch Veränderungen im Erbgut, die zu unkontrollierter Proliferation und invasivem Wachstum der Tumorzellen führen (10). Ursächlich sind verschiedene endogene und exogene Faktoren wie etwa genetische Einflüsse oder Umwelteinflüsse (11, 12). Risikofaktoren für die Entstehung des Melanoms sind eine positive Familienanamnese, multiple benigne und atypische Nävi, eine frühere Melanomerkrankung, eine Immunsuppression, die Einwirkung von ultraviolettem Licht, die individuelle Sonnenempfindlichkeit sowie bestimmte Genvariationen (5).

Als wichtigster habituellem Faktor der Melanomentstehung zählt die UV-Strahlung (13, 14). Sie verursacht genetische Veränderungen in der Haut, reduziert deren Immunkompetenz, erhöht die lokale Produktion von Wachstumsfaktoren und induziert die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies, welche die DNA von Melanozyten und Keratinozyten schädigt (15).

Die Haut reagiert mit Bräunung auf UV-Licht. Dies wird als Schutz- und Abwehrmechanismus verstanden. Melanozyten produzieren Melanin und transportieren es zu den Keratinozyten. Die Verteilung des Melanins in allen Zelllagen der Epidermis soll bewirken, dass UV-Strahlung gestreut und absorbiert wird. Die verminderte Fähigkeit zur Pigmentierung und Bräunungsreaktion bei hellhäutigen, rothaarigen und blauäugigen

Menschen ist verbunden mit der Anfälligkeit für Melanome (16). UV-Licht führt zur Bildung und Ausschüttung des Melanozyten-stimulierenden Hormons ( $\alpha$ -MSH). Über Melanocortinrezeptoren (MC-Rezeptoren) erhöht es die Melaninproduktion in den Melanozyten, sorgt für die Melanozytenexpansion und die Streuung des Pigments. Außerdem setzt es UV-induzierte DNA-Reparaturmechanismen in Keratino- und Melanozyten in Gang (17, 18). Bei Hellhäutigen und Rothaarigen kommen Keimbahnmutationen im MC-1-Rezeptor gehäuft vor. Durch die gestörte Bindung von  $\alpha$ -MSH an den Effektorzellen steigt das Risiko für eine Melanomerkrankung (19, 20). Ebenso relevant für die Melanomentstehung scheinen die Umstände der UV-Exposition zu sein. Beobachtungen zeigten, dass Menschen, die in ihrer Kindheit intermittierend hohen Dosen Sonnenlicht ausgesetzt waren und häufig Sonnenbrände erlitten, öfter schwarzen Hautkrebs entwickelten als Menschen, die chronisch geringeren Dosen Sonnenlichts exponiert waren (16).

In gesunden Melanozyten scheinen verschiedene Tumorsuppressormechanismen für einen Proliferationsarrest durch Seneszenz zu sorgen (21). Erst durch den Verlust der Schutzmechanismen eines Melanozyten kann er zum Melanom entarten (22). Es gibt unterschiedliche Modelle, welche die molekularbiologischen und histopathogenetischen Vorgänge bei der Melanomentstehung versuchen zu erklären. Clark et. al. erarbeiteten im Jahr 1984 ein 5-Stufen-Modell, das die mögliche Histopathogenese der Melanomentwicklung darstellt (23). Es wurde von Miller et al. 2006 durch Vorschläge ergänzt, welche molekularen Ereignisse dem veränderten Wachstumsverhalten zugrunde liegen könnten (5). Dabei wird angenommen, dass das Melanom aus einer einzigen Zelle entsteht, welche durch Mutationen in Protoonkogenen die Kontrolle über ihren Zellzyklus verloren hat.

Auf der Stufe 1 des von Miller et al. bearbeiteten Modells der Melanomentstehung stimuliert eine abnorm hohe Aktivität des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) *signaling pathway* das Wachstum in den Melanozyten und führt so zur Zellhyperplasie und Nävusformation (23-26). Die Aktivität des MAPK-Signalwegs, der eine zentrale Rolle bei der Einleitung der Mitose spielt, resultiert in etwa 17 % der Melanome aus einer somatischen Mutation des G-Proteins N-RAS und in etwa 57 % der Fälle aus einer

somatischen Mutation der Serin/Threonin-Kinase B-RAF (27). Mutationen in den Genen dieser beiden Proteine treten unabhängig voneinander auf, führen aber gleichermaßen zu einer Aktivierung des MAPK-Signalwegs (28-30). BRAF-Mutationen treten mit vergleichbarer Häufigkeit in benignen Nävi, in primären und metastasierten Melanomen auf (31). Die ähnliche Häufigkeit der BRAF-Mutationen in verschiedenen Stufen des Clark-Stufen-Modells legt nahe, dass weitere onkogene Ereignisse notwendig sind um bei Melanozyten unkontrolliertes Wachstum und schließlich zu Malignität zu induzieren.

Stufe		Histologische Merkmale	Molekulares Ereignis
1	Benigne Läsion	Ansammlung von Melanozyten entlang der Basalmembran, Beginn der Proliferation	Mutation in Protoonkogenen ( <i>BRAF</i> , <i>NRAS</i> )
2	Dysplasie	Dysplastische Zellen, Atypien im Sinne der ABCDE-Regel	Verlust von Tumorsuppressorgenen ( <i>CDKN2A</i> , <i>PTEN</i> )
3	Radiales Wachstum	Intraepidermales Wachstum, Infiltration des Stratum papillare der Dermis	Entdifferenzierung, Verlust der Proliferationskontrolle
4	Vertikales Wachstum	Invasion des Stratum papillare und reticulare der Dermis	Verlust von Kontroll-elementen der Zelladhäsion (Integrine, Cadherine)
5	Metastasiertes Melanom	Metastasierung	wie 4)

**Tabelle 1:** 5-Stufen-Modell der Melanomentwicklung adaptiert nach Clark et al. 1984 (23) und Miller et al. 2006 (5).

So schlagen Miller et al. vor, dass die Inaktivierung von Tumorsuppressoren (z.B. *CDKN2A* oder *PTEN*) mit der Entwicklung von Dysplasie einhergeht. Im Gegensatz zu sporadischen Melanomen, in denen aktivierende Mutationen im MAPK-Signalweg häufig sind (32), ist in 25–40 % der Fälle familiärer Melanome das Gen *CDKN2A*, das für p16<sup>Ink4A</sup> und in einem alternativen Leseraster für p14<sup>ARF</sup> (ARF) kodiert, mutiert (33, 34). p16 blockiert am G1-S-Kontrollpunkt des Zellzyklus die Proliferation von Zellen, deren DNA beschädigt ist, in denen Onkogene aktiviert sind oder deren Telomere eine kritische Grenze unterschritten haben (35). ARF hingegen reguliert über das Protein

*mouse double minute 2* (MDM2) die Expression von p53. Ein Mangel an ARF, der beim Melanom insgesamt eher selten vorkommt, kann verstärkten Abbau von ubiquitiniertem p53 und so den Verlust der p53-abhängigen Zellzykluskontrolle, DNA-Reparatur und Apoptoseinduktion zur Folge haben (36, 37). In 25-50 % nicht familiärer Melanome ist das Tumorsuppressorgen *phosphatase and tensin homologue* (PTEN) durch Mutation inaktiviert. PTEN vermittelt die Phosphataspaltung am Phosphatidylinositoltriphosphat PIP<sub>3</sub> und wirkt so inhibierend auf den Proteinkinase B- oder den AKT-Signalweg. Eine homozygote Deletion des *PTEN*-Genlokus führt über eine erhöhte Aktivität des AKT-Wegs zur gesteigerten Proliferation, während der Eintritt in die Apoptose verhindert wird (38-41).

Der *microphthalmia-associated transcription factor* (MITF) fördert die Differenzierung von Melanozyten und den damit verbundenen Proliferationsstopp (42, 43). Dennoch findet man häufig Amplifikationen des *MITF*-Gens in malignen melanozytären Läsionen. Ein Knockdown von MITF in Melanomzellen führte zu deren Absterben und zur Definition von *MITF* als *lineage survival oncogene* (44).

Auf der Stufe 4 des Clark-Miller-Modells kommt es durch abnorme Cadherine und Integrine außerdem zum Verlust von Kontrollelementen der Zelladhäsion. Dies ermöglicht letztendlich vertikales Wachstum mit Invasion der Dermis, das Lösen der Tumorzellen aus ihrem Verband und deren metastatische Absiedlung in anderen Geweben (5, 45, 46).

Im Jahr 2016 veröffentlichten Shain und Bastian einen überarbeiteten Vorschlag des Melanomentstehungsmodells (47). Sie schlagen vor, Melanome anhand ihres Entstehungsortes auf chronisch sonnengeschädigter (CSD) und auf nicht chronisch sonnengeschädigte Haut (non CSD) einzuteilen. Des Weiteren ordnen sie Mutation, die an der Melanomgenese beteiligt sind, gemäß ihrer Rolle und Wichtigkeit in drei Kategorien ein: Initialmutationen (z.B. *BRAF*-, *NRAS*-, *NF1*-Mutationen), Mutationen, die zu Progress führen (z.B. *TERT*, *CDKN2A*) und Mutationen, die eine Rolle bei der Invasivität spielen (*PTEN*, *p53*). Abhängig von Entstehungsort (CSD oder non CSD) können unterschiedliche Sequenzen und Frequenzen der kategorisierten Mutationen beobachtet werden. Shain und Bastian postulieren, dass in melanozytären Läsionen

unter Umständen Mutationen der Progress- oder Invasivitätskategorie vorliegen können und erst die später hinzukommende Initialmutation zur Enthemmung des MAPK-Signalwegs und zur Proliferation führt (48).

### **1.3 p53 – Wächter des Genoms**

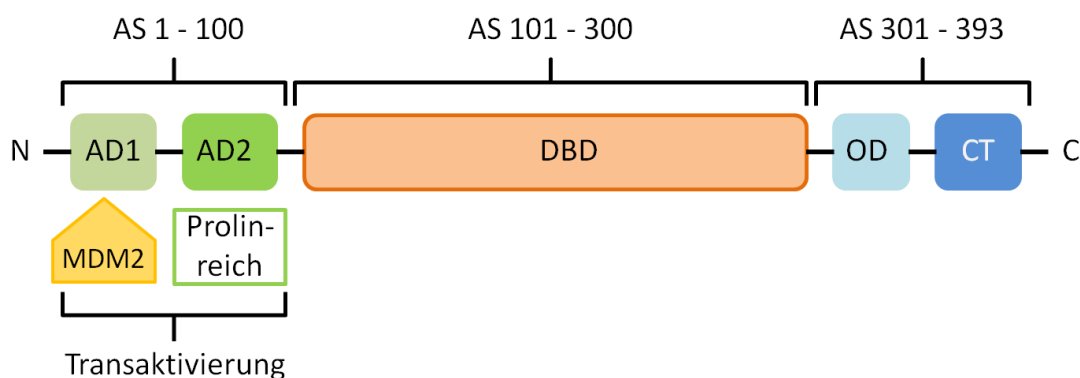
Der Transkriptionsfaktor p53 wurde im Jahr 1979 unabhängig voneinander von Lane et al. (49) und Levine et al. (50) entdeckt. P53 gilt neben dem Retinoblastom-Protein als der wichtigste Tumorsuppressor. Diese Proteine spielen innerhalb des zellulären Kontrollsystems, das unkontrollierte Zellteilung und somit Tumorbildung verhindern soll, eine wichtige Rolle.

#### **1.3.1 Struktureller Aufbau von p53**

Das kodierende Gen *TP53* befindet sich beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 17 (51). Es besteht aus elf Exons, wobei das erste nicht kodierend ist. Das Tumorsuppressorprotein p53 hat ein Molekulargewicht von 53 kDa und ist vor allem im Zellkern lokalisiert. Seine Hauptaufgaben sind die Regulierung des Zellzyklus, die Einleitung von Apoptose und Seneszenz, die Zelldifferenzierung und Reparatur der DNA (52-54). Aufgrund seiner zentralen Rolle im zellulären Kontrollsystem wird p53 „Wächter des Genoms“ genannt (55).

P53, das aus 393 Aminosäuren besteht, kann in fünf funktionelle Untereinheiten aufgegliedert werden (siehe Abbildung 1) (56-58). Am Amino-Terminus des Proteins befindet sich die saure Transaktivierungsdomäne, an der p53 phosphoryliert wird und Co-Aktivatoren für die Transkription von Zielgenen binden (59). Sie kann unterteilt werden in die Aktivierungsdomäne 1 (AD1) mit der Bindungsstelle für MDM2 und die prolinreiche Aktivierungsdomäne 2 (AD2). Im Zentrum von p53 steht die DNA-Bindungsdomäne (DBD). Sie besitzt zahlreiche Arginin-Reste, die für die Interaktion mit dem negativ geladenen Phosphoribose-Rückgrat der DNA von Bedeutung sind und ein gebundenes Zink-Atom. Bis zu 90 % der Mutationen, die in menschlichen Tumorzellen gefunden wurden, befinden sich in der zentralen DNA-Bindungsdomäne (60). Die Oligomerisierungsdomäne (OD) besteht aus einem  $\beta$ -Faltblatt, gefolgt von einer  $\alpha$ -

Helix. Dadurch wird die Dimerisierung zweier p53-Monomere möglich. Aktiv ist der Transkriptionsfaktor und Tumorsuppressor p53 jedoch erst in seiner tetrameren Form (61, 62). An seinem C-terminalen Ende (CT) befinden sich drei Signalsequenzen für den Transfer in den Zellkern sowie eine unspezifische DNA-Bindungs-Domäne (63, 64). Des Weiteren reguliert das Carboxy-Ende die DNA-Bindungs-Affinität der zentralen Domäne (DBD), indem posttranslationale Phosphorylierung von Serin-Resten und Acetylierung zu einer Konformationsänderung und damit zur verstärkten Interaktion mit der DNA und zur Aktivierung als Transkriptionsfaktor führt (65, 66).



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung des Aufbaus von p53.

### 1.3.2 Funktion und Regulation von p53

Der Transkriptionsfaktor p53 wird durch intra- und extrazelluläre Stressfaktoren, wie zum Beispiel Schäden der DNA, Ribonukleotidverlust, onkogenen und oxidativen Stress und Verlust der Adhäsion der Zelle aktiviert (67-69). Mediatoren wie die Serin/Threonin-Proteinkinase ATM, die Checkpoint-Kinase CHEK2 und p19<sup>ARF</sup> übertragen das Stresssignal auf p53, das im Zentrum der Zyklusregulation steht (70). In der nicht gestressten Zelle ist p53 nahezu inaktiv und häufig nicht nachzuweisen. Es bildet einen Komplex mit der E3-Ubiquitin-Ligase MDM2, die p53 vom Zellkern ins Zytoplasma transportiert und dort Ubiquitinmoleküle kovalent an Lysinreste von p53 überträgt (71). Diese Ubiquitinierung markiert das Protein zur Degradation im Proteasom (72, 73). Bemerkenswerterweise reguliert p53 im Gegenzug die Transkription von MDM2. Durch diese Autoregulation wird das Expressionsniveau von p53 konstant niedrig gehalten.

Unter dem Einfluss verschiedener Stresssignale werden in der Zelle die Kinasen ATM und CHEK2 aktiviert. Sie phosphorylieren p53 in der MDM2-Bindungsregion, wodurch die Bindungsaffinität von p53 zu MDM2 sinkt und der p53-Spiegel in der Zelle steigt (74). Auch Proteine wie p19<sup>ARF</sup> bewirken durch Inaktivierung von MDM2 eine Stabilisierung von p53 in der Zelle (75). Die Ubiquitin-Ligase MDM2 kann nicht nur den p53 Abbau initiieren; bei Stress vermittelt ATM durch Phosphorylierung von MDM2 dessen Anlagerung an p53-mRNA, was die p53-Translation fördert (76). Aktiviertes p53 induziert in einem positiven Feedbackmechanismus die Transkription von PTEN, welches wiederum hemmend auf die MDM2-p53-Komplexbildung wirkt (77).

Es wurde eine große Anzahl weiterer Proteine identifiziert, welche die p53 Aktivität in der Zelle regulieren. Ubiquitin-spezifische Proteasen wie USP7 und USP42 können bereits gebundenes Ubiquitin wieder entfernen (78), transkriptionelle Coaktivatoren wie p300 und PCAF regulieren die Spezifität von p53 als Transkriptionsfaktor (79), Proteine wie ASPP1 und ASPP2 erhöhen die p53-Aktivität und inhibitorisches ASPP (iASPP) erniedrigt sie (80, 81).

Aktiviertes p53 führt über eine Vielzahl an Transkriptions- und Interaktionszielen zu drei Formen der Zellantwort: Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und Apoptose. Die p53-abhängige Transkription des CDK-Inhibitors p21 verhindert die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (Rb). Die Zelle kann dadurch nicht mehr in die Mitose eintreten (82). Der Proliferationsstopp erlaubt es der Zelle, DNA-Reparaturmaßnahmen einzuleiten. Unter anderem über die Induktion von BAX, einem Protein aus der Bcl-2-Familie, vermittelt p53 die Apoptose der Zelle (83).

Die beschriebene Vielzahl an Interaktionen ist Voraussetzung dafür, dass p53 sehr spezifisch auf unterschiedliche Stresssignale reagieren kann. Bis heute ist nur ansatzweise verstanden, unter welchen Umständen welche Zellantwort durch p53 evoziert wird (84).



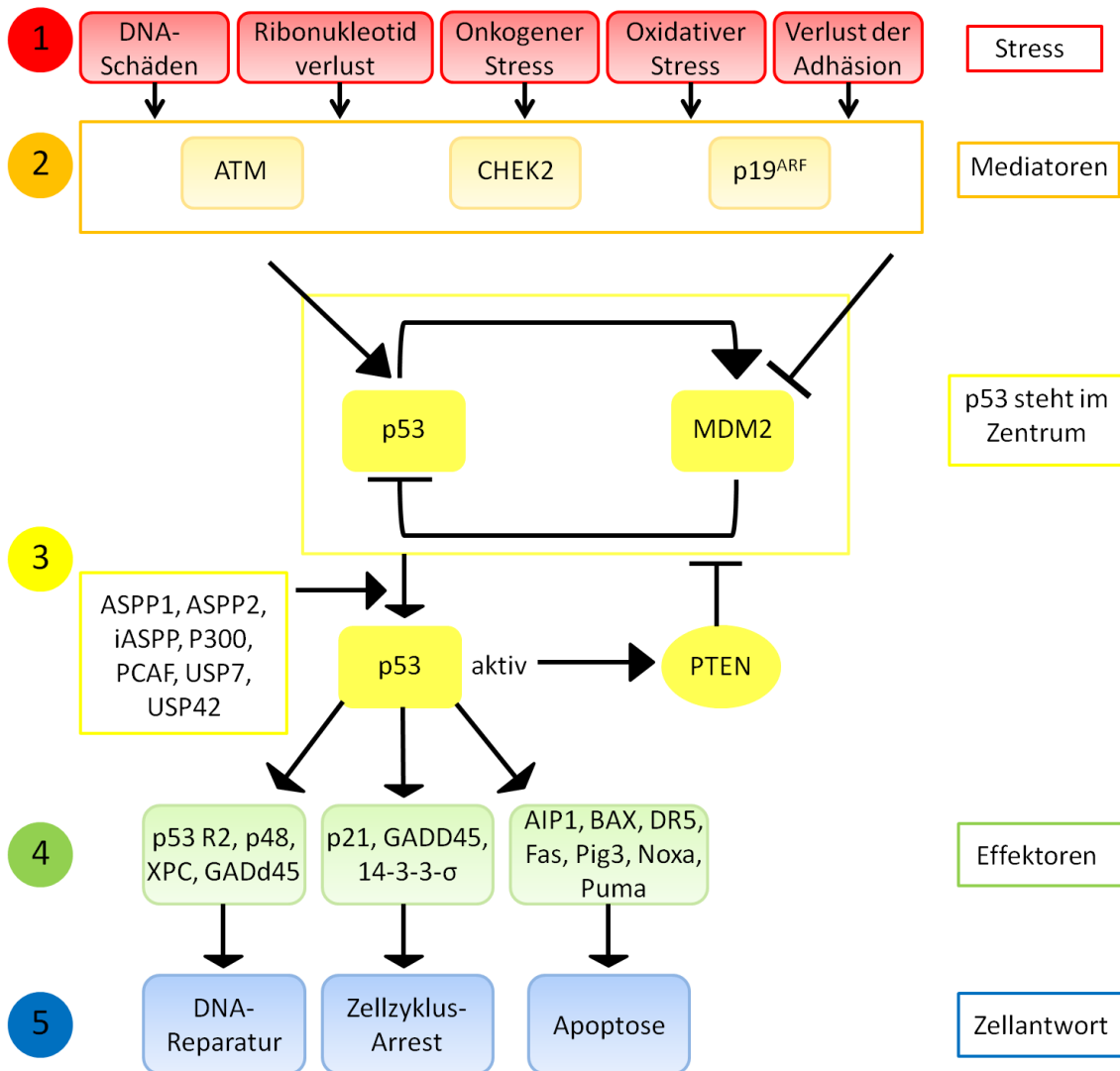


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Funktion und Regulation von p53 verändert und ergänzt nach Vogelstein et al. 2000 (67) und Vousden et al. 2002 (68, 84).

### 1.3.3 Die Rolle von p53 im Melanom

In beinahe der Hälfte aller malignen Tumoren werden p53-Mutationen gefunden (85). Bei den meisten dieser Mutationen handelt es sich um Missense-Mutationen im Zentrum der DNA-Bindungsdomäne, welche die Fähigkeit zur Transkriptionsinduktion stören (60). Im Vergleich mit anderen Tumorerkrankungen wie zum Beispiel dem Ovarialkarzinom, in dem p53 in über 95 % der Fälle mutiert ist (86), scheint die Häufigkeit von p53-Mutationen im Melanom relativ niedrig zu sein und wurde in Arbeiten, in denen in Melanomproben mittels traditioneller Sequenzierungsmethoden gezielt das p53-Gen analysiert wurde, mit 0 bis 30 % angegeben. (87-92).

Im Jahre 2015 wurde nach Anwendung von *massive parallel sequencing* Techniken über eine genetische Charakterisierung des gesamten Exoms von 333 Melanomen berichtet. Diese Arbeit schlägt vor, eine Einteilung von Melanomen und deren Metastasen anhand ihrer am häufigsten mutierten Gene *BRAF*, *RAS* und *NF1* vorzunehmen (93, 94). Diese Einteilung beinhaltet vier Hauptgruppen: *BRAF*-mutierte, *RAS*-mutierte, *NF1*-mutierte und *triple-wild-type* Tumore, die keine der drei genannten Mutationen aufweisen (95). Im Vergleich der vier Gruppen liegen Mutationen in *TP53* in *BRAF*-mutierten (ca. 10 %), *RAS*-mutierten (ca. 20 %) und *NF1*-mutierten (ca. 30 %) Tumoren vor. Im *triple-wild-type* (*BRAF*-wt, *RAS*-wt, *NF1*-wt) sind p53 Mutationen sehr selten (7 %), dafür finden sich relativ häufig MDM2-Amplifikationen (ca. 15 %). Interessanterweise treten *TP53*-Mutationen bevorzugt in Melanomen in UV-exponierten Arealen auf, in denen die Mutationslast insgesamt höher ist (95).

Während p53 in vielen Zelltypen nach Aktivierung durch zelluläre Stressfaktoren wie UV-Licht den programmierten Zelltod einleiten kann, sind Melanozyten relativ resistent gegenüber UV-induzierter p53-vermittelter Apoptose (17). Vermutlich hat dies seine evolutionsbiologische Ursache darin, dass es gerade unter UV-Stress notwendig ist, dass die Pigmentzellen in der Haut überleben und Melanin produzieren (96-98). Es wird angenommen, dass die aus den Melanozyten hervorgehenden Melanomzellen daher ebenfalls an relativ hohe p53-Aktivität adaptiert sind (99). So könnte die Aktivierung verschiedener Signalwege zur Umgehung der p53-vermittelten Apoptose der Grund dafür sein, warum Melanome häufig resistent gegenüber klassischen Chemotherapeutika sind, deren Angriffsziel die Aktivierung von p53 ist (99).

In einem Tumormodell an Mäusen konnten Terzian et al. im Jahr 2010 zeigen, dass ein hohes endogenes Expressionsniveau von p53 vor der Progression vom Nävus zum Melanom und vor Metastasenbildung schützt (22). Mäuse wiederum, die kein p53 exprimierten, hatten eine deutliche Neigung zur Entwicklung eines Melanoms (100, 101).

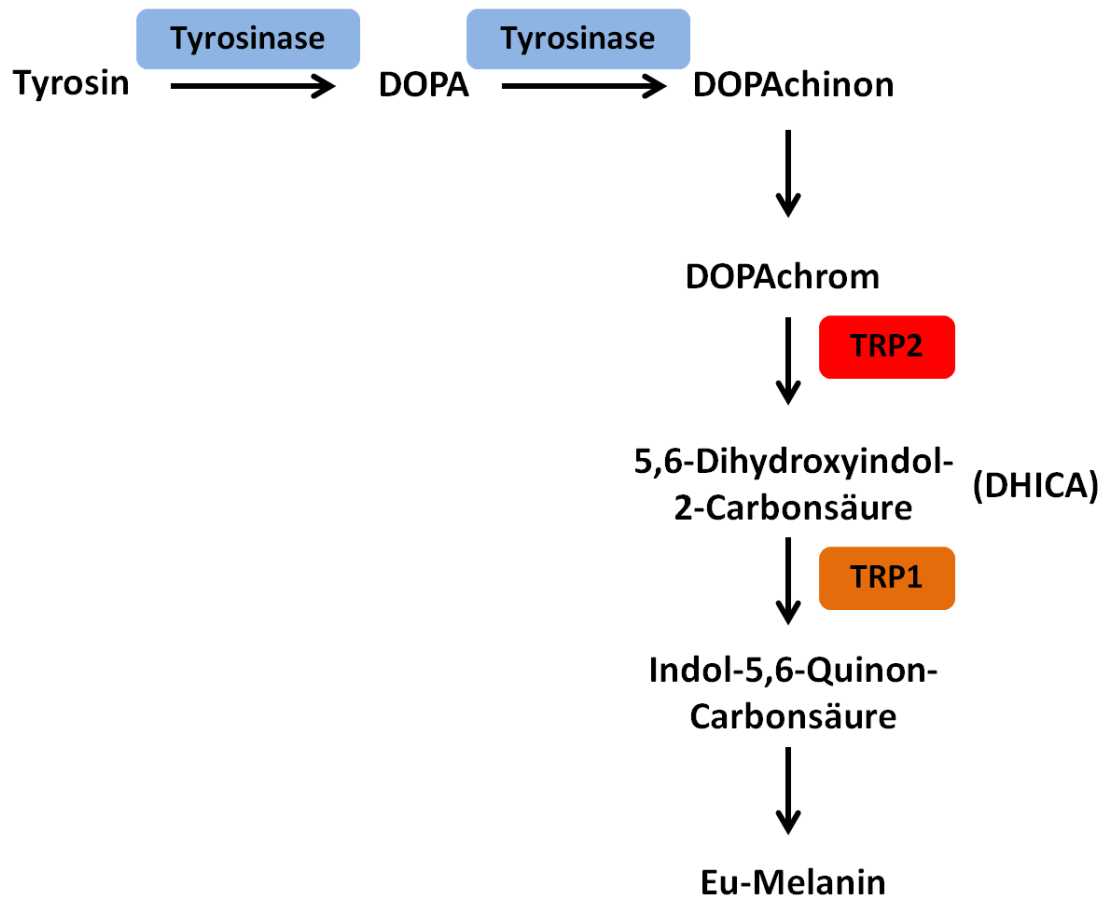
Da inaktivierende p53-Mutationen im Melanom selten sind und wildtypisches p53 in Melanomzellen häufig hoch exprimiert wird (102), liegt nahe, dass sowohl prä- als auch posttranslationale Wege zur p53-Inaktivierung im Melanom führen. Folgende Mechanismen, die zur p53-Inaktivierung in Melanomen führen können, werden diskutiert: die Überexpression von MDM2/4 (73, 95, 103), der Ausfall von p19<sup>ARF</sup> (73), Konkurrenz an DNA-Bindungsdomänen durch das N-terminal trunkeerte  $\Delta Np73$  (104-106), ein funktioneller Antagonismus mit dem *inhibitor of apoptosis-stimulating protein* (iASPP) (80, 107), die Sequestrierung im Zytosol durch die Ubiquitin-Ligase Parc (108) und die Negativregulation von p53 durch YB-1 (109) und TRP2 (110). Weitere Mechanismen der posttranslationalen Modifikationen von p53 sind zum Beispiel Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung und andere (111, 112). Satyamoorthy et al. berichteten 2000, dass DNA-Schädigungen zur Phosphorylierung von p53 an der Aminosäure Serin-367 führen, was die Fähigkeit von p53 zur Zellreparatur stark beeinträchtigt. Das macht Melanomzellen widerstandsfähig gegen Radiotherapie (113).

### 1.4 Die Rolle von TRP-2 im Melanom

Der Melanommarker *tyrosinase-related-protein 2* (TRP2) wird beim metastasierten Melanom in mehr als 80 % der Fälle exprimiert (114). TRP2 ist Mitglied der Tyrosinase-Familie, einer Gruppe von Metalloenzymen, die an der Melaninsynthese beteiligt sind. Zu dieser Familie gehören auch das Schlüsselenzym der Pigmentsynthese Tyrosinase (TYR) und das *tyrosinase-related-protein 1* (TRP1), eine DHICA-Oxidase. Aufgrund seiner funktionellen Eigenschaften wird TRP2 auch DOPAchrome tautomerase (DCT) genannt (115, 116). Das Gen *DCT* befindet sich beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosoms 13. Das Molekulargewicht von TRP2 beträgt 59 kDa (117).

Neben seiner Funktion im Melaninsyntheseweg wurde TRP2 als überlebensfördernd und antiapoptotisch bei neuronalen Progenitorzellen beschrieben (118). Sandoel et al. zeigten im Jahr 2010 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, dass sensorische Neurone das TRP2-Homolog TYR2 sekretieren und damit die Expression von p53 in Stammzellen unterdrücken (110). In einem weiteren Versuchsaufbau der Arbeitsgruppe führte ein Knockdown von TRP2 in der Melanomzelllinie WM266-4 zum Anstieg der p53-Ex-

pression und zur Steigerung der Apoptose nach Behandlung der Zellen mit dem Zytostatikum Cisplatin.



**Abbildung 3:** Schematische Darstellung des Melanin-Synthesewegs vereinfacht und ergänzt nach Olivares et al. 2001 (119).

Die antiapoptotische Wirkung von TRP2 ist von besonderem Interesse, da eine erhöhte Expression von TRP2 mit einer schwachen Apoptoserate von Melanomzellen nach Bestrahlung oder chemotherapeutischer Behandlung einhergeht (120-122). Die Drosselung der p53-Expression durch TRP2 könnte eine Erklärung dafür sein, dass Melanomzellen selten p53-Mutationen aufweisen und dennoch häufig wenig empfindlich gegenüber Chemotherapeutika sind.

### 1.5 Zielsetzung/Fragestellung der Arbeit

Die Behandlung des metastasierten Melanoms stellt nach wie vor eine große Herausforderung dar. Im Vergleich zur konventionellen Chemotherapie erreichen die aktuell verfügbaren Therapieoptionen wie etwa *small-molecules* oder die Immuntherapie deutlich bessere Ergebnisse. Trotz der enormen Fortschritte bleibt das Melanom im Stadium IV eine nur selten heilbare Erkrankung. Dies liegt unter anderem an der Ausbildung von Resistenzen, die beispielsweise die Kombinationstherapie mit BRAF- und MEK-Inhibitoren zeitlich limitieren (123, 124). Die Ansprechrate auf die Immun-Checkpoint-Inhibitoren Nivolumab und Pembrolizumab liegt bei ca. 40 % (125-127). Unter Inkaufnahme schwerer, teils lebensbedrohlicher Nebenwirkungen erreicht die duale Immun-Checkpoint-Blockade mit Ipilimumab in Kombination mit Nivolumab eine Ansprechrate von etwa 56 % (128). Die starken Nebenwirkungen vermindern die Verträglichkeit und erhöhen die Therapieabbruchrate.

Um Therapiealternativen für Therapieversager und -abbrecher zu finden, müssen die molekularen Vorgänge im Melanom weiter intensiv erforscht werden. Das Protein p53 als „Wächter des Genoms“ könnte eine vielversprechende Zielstruktur in der Melanomtherapie der Zukunft sein. Da p53 im Melanom meist wildtypisch vorliegt, wurde seine Rolle für die Melanomentstehung viele Jahre lang unterschätzt. Offensichtlich wird aber die p53-Aktivität trotz fehlender Mutationen so weit unterdrückt, dass p53 seiner Funktion als Tumorsuppressor im Melanom nicht ausreichend nachkommen kann. Ein genetisch wildtypisches p53 bietet aber prinzipiell die Möglichkeit einer Reaktivierung, was in der Literatur als interessanter Therapieansatz diskutiert wird (129). Grundlage für die Umsetzung eines solchen Konzepts ist ein Verständnis für die Mechanismen der p53-Repression im Melanom. Sandoel et al. zeigten 2010 (110), dass die Unterdrückung von TRP2 in der Melanomzelllinie WM266-4 zum Anstieg der p53-Expression und nach Behandlung der Zellen mit dem Zytostatikum Cisplatin zur Steigerung der Apoptose führte.

In vorliegender Arbeit wurden Melanomzelllinien hinsichtlich ihrer p53-Expression und -Aktivität, der p53-Aktivierbarkeit sowie einer möglichen Rolle von TRP2 für die p53-Inaktivierung untersucht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Technische Geräte

Gerät, Modellbezeichnung	Hersteller/Lieferant
Autoklav, Tecnoclav 135S	Fedegari Autoclavi SPA Varioklav, Albuzzano, IT
Blotkammer, Mini Trans Blot® und Blotkammer, Mini PROTEAN®	BioRad, München, DE
Brutschrank (37 °C, 5 % CO <sub>2</sub> ), Heraeus Incubate-Function Line	Thermo Fisher Scientific GmbH, Karlsruhe, DE
Brutschrank (37 °C), BM 200	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
Durchflusszytometer, FACS Canto	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Eismaschine, Scotsman AF-20	Scotsman Ice Systems, Mailand, IT
Gelkammer, OWL A2 Large Gel Systems V-Gel	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE
Inversmikroskop, Wilowert 30	Helmut Hund GmbH, Wetzlar, DE
Inversmikroskop, Labovert CK2	Leitz Olympus, Hamburg, DE
Kühlschrank, Liebherr/Comfort	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, DE
Mirkoliterpipetten (2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl), Eppendorf Reference®	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Mirkoliterpipetten (2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl), Gilson Pipetman®	Gilson, Inc., Middleton, USA
Mikrowelle, Sharp R-3V10	Sharp Electronics GmbH, Köln, DE
Neubauer Zählkammer, Kammertiefe: 0,100 mm; 0,0025 mm <sup>2</sup>	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, DE
Luminometer, Orion Microplate Luminometer	Berthold Detection Systems, Pforzheim, DE
PCR Workstation, Clean Lab	Herolab GmbH, Wiesloch, DE
PCR-Maschine, 96-Well GeneAmp® PCR System 9700	Applied Biosystems, Inc., Foster City, Kalifornien, USA
pH-Meter, inoLab pH 720	WTW GmbH, Dinslaken, DE
Pipetten 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt AG & Co. KmG, Nümbrecht, DE
Schüttler für Bakterienkulturen, Innova	New Brunswick Scientific, Edison, New Jersey, USA

**Tabelle 2: Technische Geräte (Teil 1).**

Gerät, Modellbezeichnung	Hersteller/Lieferant
Spannungsquelle, EPS 600 Electrophoresis Power Supply	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg im Breisgau, DE
Spannungsquelle, Power Pac 300	Bio Rad Laboratories, Inc., Hercules, Kalifornien, USA
Spektralphotometer, Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Sterilwerkbank, Gelaire® Flow Laboratories TC 72	Gelaire Flow Laboratories, Sydney, AU
Sterilwerkbank Heraeus Lamin Air® HB2448, Sterilwerkbank, Heraeus Lamin Air® HB2472	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE
Stickstofftank, Biosafe MD® 120	Cryotherm GmbH & Co. KG, Kirchen (Sieg), DE
Thermoschüttler/Heizbank, Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Thermoschüttler/Heizbank, Test Tube Thermostat Model TCR	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Tiefkühlschrank, Thermo Electron Corporation ULT Freezer (-80 °C)	Thermo Electron Corporation, Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE
Tiefkühlschrank Liebherr Premium (-20° C), Tiefkühlschrank Liebherr Öko Super (-20 °C)	Liebherr GmbH, Ochsenhausen, DE
Vortexer, MS1 Minishaker Vibrofix VF 1 Electronic	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Waage, Mettler P160	Mettler Waagen GmbH, Gießen, DE
Waage, Ohaus LS 5000	Ohaus, Parsippany, New Jersey, USA
Wasserbad, Memmert WB-7	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach, DE
Zentrifuge, Hettich Rotanta/RP	Andreas Hettich GmbH, Tuttlingen, DE
Zentrifuge Heraeus Biofuge pico, Zentrifuge Heraeus Megafuge 1,0 R, Zentrifuge Heraeus Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE

**Tabelle 2: Technische Geräte (Teil 2).**

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller/Lieferant
6-/12-/24-/96-Well Platten (Flachboden)	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Bechergläser	Schott, Mainz, DE

**Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien (Teil 1).**

Produkt	Hersteller/Lieferant
Drigalski-Spatel	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, DE
Eppendorf Caps 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Erlenmeyerkolben 50 ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1 l, 2 l	Schott, Mainz, DE
FACS-Röhrchen 5 ml	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Fujifilm Medical X-Ray Film	Fujifilm Corporation, Düsseldorf, DE
Kanülen	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Kryoröhrchen 1,7 ml Nunc™	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE
Messzylinder 50 ml, 100 ml, 250 ml, 1000 ml	Schott, Mainz, DE
Nitrozellulose	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg im Breisgau, DE
Objektträger	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, DE
Parafilm	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Petrischalen (100mm, 150 mm), Pipetten und Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co. KmG, Nümbrecht, DE
PCR Platten /Real-Time-PCR Platten	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE
Pipettenspitzen 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1 ml	Sarstedt/Costar, Washington, USA
Reaktionsgefäße 100 µl, 500 µl, 1,5 ml, 2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE Eppendorf AG, Hamburg, DE Sarstedt AG & Co. KmG, Nümbrecht, DE
Rührfische	A. Hartenstein GmbH, Würzburg, DE
Schraubverschlussflaschen 80 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml	Schott, Mainz, DE
Schraubverschlussröhrchen 15 ml, 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE
Spritzen 1 ml, 5 ml, 10 ml	BD Biosciences, Heidelberg, DE
Sterilfilter (Porengröße 0,45 µm, 0,2 µm)	Corning, Inc. Corning, New York, USA
UV-Küvetten 1,5 ml	Eppendorf AG, Hamburg, DE
Whatman-Papier	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel, DE
Zellkulturflaschen 50 ml, 250 ml, 550 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, DE

**Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien (Teil 2).**



2.1.3 Reagenzien

Produkt	Hersteller/Lieferant
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, DE
Ampicillin (50 mg/ml)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
BioTherm™ DNA Polymerase 5 U/μl	Ares Bioscience, Köln, DE
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
BupH TRIS-Hepes-SDS Running Buffer	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE
Cell Titer 96® AQueous One Solution Reagent	Promega GmbH, Mannheim, DE
Complete protease inhibitor cocktail tablets	Roche, Mannheim, DE
dH <sub>2</sub> O	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg, DE
DNA-Probenpuffer (6x)	Fermentas, St. Leon-Roth, DE
DNase	Boehringer Ingelheim, Ingelheim am Rhein, DE
dNTPS (100 mM) Invitrogen™	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE
Doxycyclin	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
EDTA	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
EDTA 0,02 % in PBS	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
Ethanol 70 %, 96 %, 99,8 %	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
Fötales Kälberserum (FCS) Invitrogen™	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE
Glutaraldehyd Lösung (25 % in H <sub>2</sub> O)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
Glycyl-Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Isopropanol	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
LB Broth Base Invitrogen™	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE
LB-Agar	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE
Ligationspuffer	Fermentas, St. Leon-Roth, DE
Luciferin (pH8)	PJK GmbH, Kleinblittersdorf, DE
Magermilchpulver	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Methanol 99,8 %	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Nutlin-3a (10 mM, Verdünnung 1:1000)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
Olerup SSP® GelRed™	Olerup GmbH, Wien, A

Tabelle 4: Reagenzien (Teil 1).

Produkt	Hersteller/Lieferant
Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (10 mg/ml)	PAN Biotech, Aidenbach, DE
Phosphatase	Roche, Mannheim, DE
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
Polybrene®	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Propidiumiodid	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
Puffer Tango (10x)	Fermentas, St. Leon-Roth, DE
Puromycin Invitrogen™	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE
RNAse A 10 U/μl	Fermentas, St. Leon-Roth, DE
RNAse A 20 U/μl	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE
RPMI 1640 Medium	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Roth, DE
Taq-Puffer	Ares Bioscience, Köln, DE
Tricine	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Triton-X-100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Trypanblau 0,4 %	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
Trypsin/EDTA (0,5/0,2 %) (TE) in PBS 10x	PAN Biotech, Aidenbach, DE
Tween®-20	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
X-Gal	Clontech Laboratories, Mountain View, Kalifornien, USA

Tabelle 4: Reagenzien (Teil 2).

#### 2.1.4 Puffer und Lösungen

1x Trypsin/EDTA Lösung	
10x Trypsin/EDTA Lösung	5 ml
PBS	45 ml
Trypanblaulösung	
Trypanblau	0,1 % (v/v)
Ethanol	20 % (v/v)
dH <sub>2</sub> O	

Tabelle 5: Lösungen für die Vereinzlung von adhärennten Zellen in Zellkultur und für die Zellzählung.

<b>Propidiumiodid-Lösung</b>	
FCS	1 %
Propidiumiodid	0,05 mg/ml
RNase A	0,1 mg/ml
in PBS	

**Tabelle 6:** Lösung für die Zellzyklusanalyse.

<b>Promega Lysis-Buffer</b>	
Tricine (pH 7.8)	40 mM
NaCl	50 mM
EDTA	2 mM
MgSO <sub>4</sub>	1 mM
DTT	5 mM
Triton X-100	1 %
<b>Luciferase-Reaktionslösung A</b>	
Glycyl- Glycin	25 mM
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 8.0)	15 mM
EGTA	4 mM
ATP	2 mM
DTT	1 mM
MgSO <sub>4</sub>	15 mM
CoA	0,1 mM
75 µM Luciferin (pH8)	75 µM

**Tabelle 7:** Puffer und Lösung für den Luciferase-Assay.

<b>RIPA-Lyse-Puffer</b>	
TRIS-HCl (pH 8)	50 mM
NaCl	150 mM
NP-40	1 %
Natriumdesoxycholat	0,5 %
SDS (Natriumdodecylsulfat)	0,1 %

**Tabelle 8:** Puffer für die Herstellung von Gesamtzelllysaten.

<b>5x Lane Buffer</b>	
TRIS-HCl	0,3 M
SDS (Natriumdodecylsulfat)	5 %
Glycerol	50 %
DTT (Dithiothreitol)	100 mM
in Proprietary pink tracking dye	
<b>Elektrophoresepuffer (pH 8)</b>	
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	0,1 M
TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan)	0,1 M
SDS (Natriumdodecylsulfat)	3 mM
in dH <sub>2</sub> O	
<b>Tris-Acetat Puffer (TAE) (1x)</b>	
TRIS-Acetat	40 mM
EDTA	1 mM

Tabelle 9: Puffer für die eindimensionale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.

<b>Transferpuffer</b>	
dH <sub>2</sub> O	70 %
Methanol	20 %
10x TRIS/Glycin	10 %
<b>Blocking-Buffer für Western Blot</b>	
Magermilchpulver	5 %
in 0,05 % Tween20/PBS	
<b>Lämmli Puffer (4x)</b>	
Tris/Cl pH 6,8	250 mM
SDS	8%
Glycerol	25%
Bromphenolblau	0,02%
β-Mercaptoethanol	8%
<b>Ponceau S</b>	
Ponceau S	1 g/l
in 5 % Essigsäure	

Tabelle 10: Puffer und Lösung für Western Blot.

## 2.1.5 Medien

Medium	Zusammensetzung
Komplettmedium (CM)	500 ml RPMI 1640 Medium 50 ml FCS (10 %) 5 ml Penicillin (100 U/ml) / Streptomycin (10 mg/ml)
Konservierungsmedium	50 ml FCS 5ml DMSO
LB <sup>+</sup> -Agarplatten	1,6 % (w/v) Agar 0,01 % (w/v) Ampicillin in LB-Medium (Endkonzentration 100 mg/ml)
LB <sup>+</sup> -Medium	0,01 % (w/v) Ampicillin in LB-Medium (Endkonzentration 100 mg/ml)
LB-Agarplatten	1,6 % (w/v) Agar in LB-Medium
LB-Medium	20 g LB Broth Base ad 1l ddH <sub>2</sub> O

Tabelle 11: Medien.

## 2.1.6 Komplettsysteme

Bezeichnung	Hersteller/Lieferant
10 % Precise™ Protein Gel	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE
GenElite™ Gel Extraction Kit	Sigma Aldrich, Schnelldorf, DE
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Roth, DE
PeqGOLD Total RNA Kit	PeqLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE
Pierce® BCA Detection Kit	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE
Pierce® ECL Western-Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE
Qiagen® Plasmid Midi Kit (100)	Qiagen, Hilden, DE
QI Aamp® DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, DE
Restore™ Plus Western-Blot Stripping Buffer	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE
Super Signal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE
Turbofectamin	Fermentas, St. Leon-Roth, DE
Vybrant® CFDA SE Cell Tracer Kit	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE

Tabelle 12: Komplettsysteme.

### 2.1.7 Vektorsysteme

Bezeichnung	Beschreibung
pGreenFire™ (SBI, Mountain View, Canada)	Lentiviraler Vektor, der eine Puromycinresistenz trägt und mittels <i>green fluorescent protein</i> (GFP) und Luciferase als Reportergenkonstrukt für die transkriptionelle p53 Aktivität fungiert.
pKH1 sh-RNA (130)	Lentiviraler Vektor, der eine shRNA Kasette trägt, die zur jeweiligen mRNA komplementär ist und so über RNA-Interferenz zu deren Abbau führt. Als Marker dient das Leuchtsignal GFP.
pKH1 sh-RNA (noGFP) (130) (wurde in unserem Labor modifiziert)	Lentiviraler Vektor, der eine shRNA Kasette trägt, die zur jeweiligen mRNA komplementär ist und so über RNA-Interferenz zu deren Abbau führt. Das GFP-Gen wurde mittels Mutagenese ausgeschaltet.
piH (131, 132)	retroviraler Vektor zum Überexprimieren von Proteinen, enthält ein Hygromycin-Resistenz-Gen.

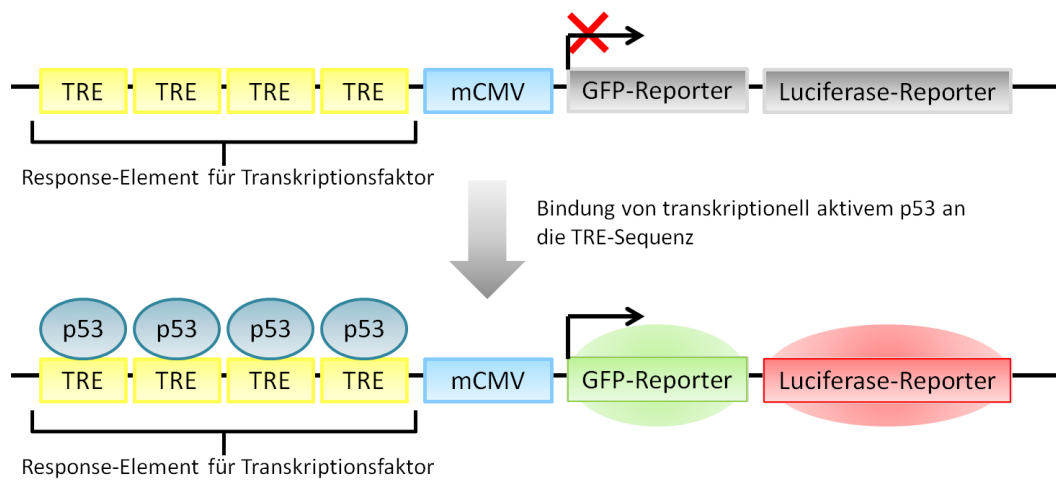
Tabelle 13: Vektorsysteme.

#### pGreenFire™-Vektorsystem

Die Aktivität eines Transkriptionsfaktors kann mithilfe eines Reportergen-Assays untersucht werden. Hierzu wird ein Vektor eingesetzt, in dem die Expression eines leicht zu quantifizierenden Proteins unter die Kontrolle eines geeigneten Promoters gestellt wird.

Mit dem Reporterkonstrukt pGreenfire™ kann die transkriptionelle Aktivität von p53 in Zellen quantifiziert werden. Der Vektor nutzt einen auf basale Elemente reduzierten Cytomegalie-Virus-Promotor (minimal CMV, mCMV), der vor allem die für die Bindung der RNA-Polymerase II und die Initiation der Transkription essentielle TATA-Box (133) enthält. Dem nur sehr gering aktiven mCMV-Promotor ist ein Quartett von p53-Transkriptions-Response-Elementen (TRE) mit der Sequenz 5'-CGACATGCC-CGGGCATGT-3' vorangestellt. Sobald p53 an die TRE bindet, wird die Expression von grün fluoreszierendem Protein (GFP) und Luciferase in Gang gesetzt. Die Luciferase kann ein Substrat umsetzen, wobei Licht emittiert wird; das grün fluoreszierende Protein GFP ist in der Lage, Licht in Licht umzuwandeln. Auf diese Weise wird die transkriptionelle Aktivität von p53 in ein Lichtsignal übersetzt. Mit unterschiedlichen

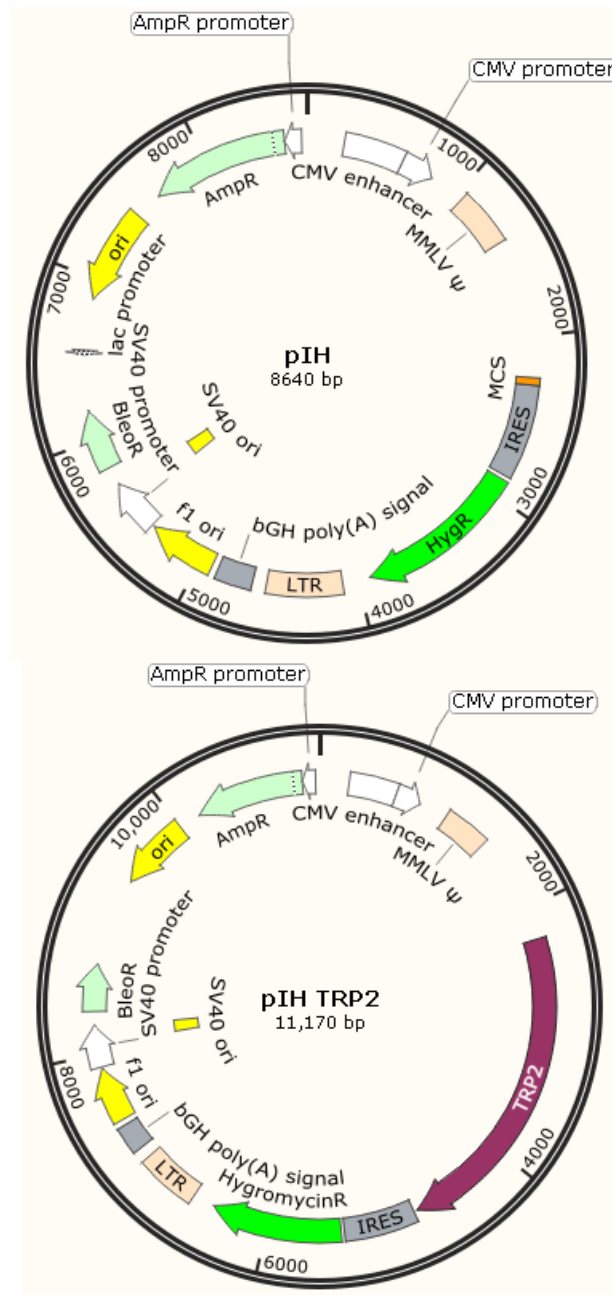
Methoden wird das Leuchtsignal gemessen und auf diese Weise die p53-Aktivität in der Zelle quantifiziert.



**Abbildung 4:** Schematische Darstellung des pGreenFire™-Reporterkonstrukts modifiziert und ergänzt nach pGreenFire™ Pathway Reporter Lentivectors Cat. # TROXX Series Manual, 2012.

### pIH-Vektorsystem

Für die ektope Expression wurde der retrovirale Expressionsvektor pIH (siehe Abbildung 5 und (131)) verwendet, in den eine cDNA unter der Kontrolle eines CMV-Promoters kloniert werden kann. Anschließend an die *multiple cloning site* (MCS) liegt in pIH eine *internal ribosomal entry site* (IRES), welche die zusätzliche Expression einer Hygromycin-Resistenz erlaubt. Für die in Abbildung 18 dargestellten Ergebnisse wurde ein modifiziertes TRP2-Expressionskonstrukt, pIH-TRP2insense (TRP2in), generiert. Dadurch konnte TRP2 ektope exprimiert werden. Es kodiert für eine TRP2-mRNA, deren shRNA-Bindungsstellen durch sechs stille Mutationen verändert wurden.



**Abbildung 5:** Schematische Darstellung des Vektors pIH vor (oben) und nach (unten) Klonierung des modifizierten TRP2-Expressionskonstrukts pIH-TRP2insense (TRP2in).

CMV promotor; MMLV  $\Psi$ : Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase; MCS: Multiple cloning site; IRES: internal ribosome entry site; HygromycinR: Hygromycin-Resistenz. 3'LTR: long terminal repeat; bGH pA: bovine Growth Hormone polyadenylation signal; f1 ori: filamentous phageorigin of replication; SV 40 promotor: Simian virus Promotor; BleoR: Bleomycin-Resistenz; AmpR: AmpR promotor. Abb. nach Houben 2017.



## 2.1.8 Zelllinien

### 2.1.8.1 Melanomzelllinien

Für vorliegende Arbeit wurden Zelllinien aus dem Bestand der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Universität Würzburg verwendet.

Linie	p53-Status*	Morphologie	Referenz
FM88	Wildtyp	adhärent	(134)
SkMel28	L145R	adhärent	(135)
M26	Wildtyp	adhärent	(106)
MelJuso	Wildtyp	adhärent	(129)
WüMel45	Wildtyp	adhärent	(136) aus Patientenmaterial**
WüMel74a	Wildtyp	adhärent	(136) aus Patientenmaterial**
WüMel48	Wildtyp	adhärent	(136) aus Patientenmaterial**
WüMel49	Wildtyp	adhärent	(136) aus Patientenmaterial**
MelU***	Wildtyp	adhärent	(137)

\* Informationen zum Mutationsstatus der einzelnen Linien wurden im Vorfeld von Houben et al. 2011 mittels Sequenzierung erhoben (136) und waren für vorliegende Arbeit bereits bekannt.  
 \*\* Das schriftliche Einverständnis der Patienten wurde eingeholt und die Studie von der Ethikkommission der Universität Würzburg genehmigt (Fortlaufende Studiennummer: 123/08\_ff)  
 \*\*\* MelU steht für „Melanomzelle unbekannter Abstammung“. Sie wurde zunächst für die Zelllinie Mel-2a gehalten (138), die, wie Vorversuche gezeigt haben, keine p53-Aktivität zeigt (136). Eine Sequenzanalyse ergab einen im Vergleich zur vermuteten Zelllinie Mel-2a veränderten BRAF-Status. Die TRP2- Expression spricht dafür, dass es sich um eine Melanomzelle handelt. Es fand entweder eine Mutation oder eine Verwechslung von zwei unterschiedlichen Melanomzelllinien statt.

**Tabelle 14: Melanomzelllinien.**

### 2.1.8.2 Andere Zelllinien

Zelllinie	Eigenschaften	Bezugsquelle
HEK293T	Humane embryonale Nierenzelllinie, zur Herstellung lentiviraler Viruspartikel für Transduktion (139)	LGC Standards GmbH, Wesel, DE
HEM	humane, epidermale Melanozyten	PromoCell GmbH, Heidelberg, DE
Escherichia coli Top 10 One Shot	Kompetente E. coli Bakterien	Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, DE

**Tabelle 15: Andere Zelllinien.**

## 2.1.9 Enzyme

	Konzentration	Reaktionstemperatur	Schnittmuster	Hersteller
<b>BamHI</b>	10 U/μl	37° C	sticky ends	Fermentas, St. Leon- Roth, DE
<b>EcoRI</b>	10 U/μl	37° C	sticky ends	
<b>SmaI</b>	10 U/μl	30° C	blunt ends	
<b>XbaI</b>	10 U/μl	37° C	sticky ends	

Tabelle 16: Verdauungsenzyme.

## 2.1.10 Oligonukleotide und Primer

Name	Basensequenz (5'-3')	Verwendung
TRP2 197 for (TRP2_1_for)	TGTGATTCAAACAACAACTAACAGAT <b>CAAGAG</b> TCTGTTA GTTGTTTGAATCACAT <b>TTTTTTTGT</b>	Oligonukleotid
TRP2 197 rev (TRP2_1_rev)	<b>CTAGACAAAAAAAT</b> TGTGATTCAAACAACAACTAACAGA <b>CTCTTGAT</b> TCTGTTAGTTGTTTGAATCACA	Oligonukleotid
TRP2 1371 for (TRP2_2_for)	AAGGTTGGCAATTTTCATGCTGTT <b>CAAGAG</b> ACAGCAT GAAATTGCCAACCT <b>TTTTTTTGT</b>	Oligonukleotid
TRP2 1371 rev (TRP2_2_rev)	<b>CTAGACAAAAAAA</b> AAGGTTGGCAATTTTCATGCTGTC <b>TCTTGA</b> ACAGCATGAAATTGCCAACCTT	Oligonukleotid
TRP2 794 for (TRP2_3_for)	CCACCAGTGATTCCGGCAGAT <b>CAAGAG</b> TCTGCCGAAT CACTGGTGGT <b>TTTTTTTGT</b>	Oligonukleotid
TRP2 794 rev (TRP2_3_rev)	<b>CTAGACAAAAAAACC</b> ACCAGTGATTCCGGCAGACTC <b>TTGAT</b> TCTGCCGAATCACTGGTGG	Oligonukleotid
TRP2 for EcoRI	TATATAGAATTCAAAGCCATGAGCCCCCTTTGGTGG	PCR-Klonierung
TRP2 rev BamHI	TATATAGGATCCTAGGCTTCTTCTGTGTATCTC	PCR-Klonierung
Destroy GFP for	ATGGTGAGCAAGGGCGAGTAGCTGTTACCGGGGT GGTGC	Mutagenese
Destroy GFP rev	GCACCACCCCGGTGAACAGCTACTCGCCCTTGCTCA CCAT	Mutagenese
TRP2_sh3_for	GGAAGAAACAGCATGAAACTGCCACGTTAAAAGA CATACGAGATTGCC	Mutagenese
TRP2_sh3_rev	GGCAATCTCGTATGTCTTTAACGTGGGCAGTTTCAT GCTGTTTCTTCCC	Mutagenese
TRP2_sh5_for	GAAATCAAATGGGAAGAAACAGTATGAAGCTGCC ACGTTAAAAGAC	Mutagenese
TRP 2_sh5_rev	GTCTTTAACGTGGGCAGCTTCATACTGTTTCTTCCC ATTTGATTC	Mutagenese
seq primer f destroy GFP	AGCTTGCCGTAGGTGGCATC	Sequenzierung
KH1 reverse sequencing	GGTTAATTAAGAAAGGATCCG	Sequenzierung

Tabelle 17: Oligonukleotide und Primer (Teil 1).

Name	Basensequenz (5'-3')	Verwendung
CFG-ires (145) rev	CTTCGGCCAGTAACGTTAGG	Sequenzierung von pIH-Vektor

Tabelle 17: Oligonukleotide und Primer (Teil 2).

### 2.1.11 Antikörper

Primärantikörper	Verdünnung (Antikörper : Blocking-Buffer)	Hersteller
p53 Antibody (D01): sc-126 (mouse)	1:500	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA
TRP2 Antibody (D18): sc-10451 (mouse)	1:1000	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA
Monoclonal $\beta$ -Tubulin Antibody TUB 2.1 (mouse)	1:1000	Sigma Aldrich, Schnellendorf, DE
Sekundärantikörper		
Anti Mouse Antibody (HRP konjugiert )	1:1000	Dako Agilent, Santa Clara, CA, USA

Tabelle 18: Primär- und Sekundärantikörper für den Western Blot.

### 2.1.12 Software

Programm	Hersteller/Homepage
Adobe™ CS® 4	Adobe Systems Inc., Dublin, Ireland
Ape-A Plasmid Editor	M. Wayne Davis
Entrez PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/</a>
Fermentas™ Double Digest®	<a href="http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html">http://www.fermentas.com/doubledigest/index.html</a>
FlowJo®	Treestar Inc., Ashland OR, USA
Microsoft™ Office 2003	Microsoft, Redmond WA, USA
NCBI-Blast	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/</a>
Prism®	GraphPad Software, San Diego CA, USA

Tabelle 19: Software.

### 2.2 Methoden

#### 2.2.1 Zellkultur

Die Kultur der adhärent wachsenden Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 %. Als Nährmedium diente Komplettmedium (CM) (siehe Tabelle 11). Alle zwei bis drei Tage wurde ein Medienwechsel vorgenommen. Die Subkultivierung erfolgte bei Zellkonfluenz.

Dazu wurden die Zellen zunächst mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend durch Zugabe und Inkubation mit Trypsin/EDTA (TE) von der Plastikoberfläche abgelöst. Die TE-Reaktion konnte durch den Zusatz der doppelten Menge Komplettmedium abgestoppt werden. Durch mehrmaliges Pipettieren wurde eine möglichst homogene Einzelzellsuspension erzeugt.

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden wenige µl der Zellsuspension 1:1 mit dem anionischen Farbstoff Trypanblau gemischt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Der Farbstoff färbt nur tote Zellen an, sodass diese erkannt und nicht mitgezählt wurden. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zahl der ungefärbten Zellen} \times \text{Verdünnung} \times \text{Kammerfaktor} = \text{Zellzahl pro ml}$$

$$\text{Ungefärbte Zellen} \times 2 \times 10^4 = \text{Zellzahl pro ml}$$

Zur langfristigen Lagerung wurden die Zellen im Stickstofftank bei -170 °C kryokonserviert. Dazu wurde die Zellsuspension zunächst fünf Minuten lang bei 1500 rpm zentrifugiert und das überstehende Medium abgesaugt. Danach wurde das verbliebene Zellpellet in Konservierungsmedium resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C eingefroren und anschließend in eine Lagergefäß überführt, das mittels flüssigem Stickstoff auf -150 °C gekühlt wurde.

Zur Inkulturnahme wurden die Kryoröhrchen im Wasserbad bei 37 °C für vier Minuten aufgetaut, die Suspension in ein steriles Zentrifugenröhrchen (15 ml) überführt, mit Komplettmedium aufgefüllt und für 15 Minuten bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Komplettmedium resuspendiert und in eine Kulturflasche überführt.

## 2.2.2 Herstellung von lenti- und retroviralen Viren und Infektion der Zielzellen

### 2.2.2.1 Transfektion von HEK293T-Lenti-X Zellen

Zur Produktion der replikationsdefizienten Lenti- und Retroviren wurden die Vektoren zusammen mit drei Helferplasmiden in HEK293T-Lenti-X Zellen eingebracht. Der Vorgang wird als Transfektion bezeichnet. Das Helferplasmid pHCMV-G kodiert für ein virales Hüllprotein (VSV-G). Das Helferplasmid pMDLg/pRRE enthält den *gag/pol*-Lokus des Virusgenoms. Dieser Genabschnitt kodiert zum einen für ein Protein, das die Matrix des viralen Kerns bildet und außerdem für die reverse Transkriptase, die zur Übersetzung der RNA in DNA notwendig ist. Vom dritten Helferplasmid pRSV rev wird das Rev-Protein exprimiert, das den Transport des Transkripts aus dem Zellkern ermöglicht (140, 141).

Plasmid	Relativer DNA-Anteil	Absoluter DNA-Anteil
Vektor mit shRNA Expressionskassette	1	1,78 µg
pRSV rev	0,25	0,44 µg
pHCMV-G	0,35	0,62 µg
pMDLg/pRRE	0,65	1,16 µg
		4 µg DNA gesamt

**Tabelle 20:** Transiente Transfektion zur Generierung von lentiviralem Überstand.

An Tag 1 wurden die HEK293T-Lenti-X Zellen so ausgesät, dass sie am Folgetag eine Konfluenz von ca. 80 % aufwiesen. Der Transfektionsansatz aus Vektor und Helferplasmiden wurde an Tag 2 hergestellt und nach Zugabe von Turbofectamin für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Turbofectamin bildet im Medium kationische Lipidvesikel, mit deren Hilfe die negativ geladene DNA in die Zelle gelangen kann. Auf jede Vertiefung einer 6-well-Platte mit HEK293T-Lenti-X Zellen wurden 400 µl des Transfektionsansatzes gegeben und für 24 h im Brutschrank inkubiert. An Tag 3 wurden weitere 4 ml Kompletmedium zu den Zellen gegeben.

### 2.2.2.2 Transduktion der Melanomzelllinien

Die Infektion eukaryontischer Wirtszellen mit replikationsdefizienten Viren bezeichnet man als Transduktion. Mit Hilfe des Proteins Reverse Transkriptase schreiben Viren ihr

RNA-Genom in doppelsträngige DNA um, die anschließend ins Genom der Wirtszelle integriert wird. Auf demselben Weg ist es in der Zellkultur möglich, fremdes genetisches Material dauerhaft in eine Wirtszelle einzubringen.

Tag	Schritt	Anmerkung
1	Ausplattieren der HEK293T-Lenti-X Zellen	Aussaat von 2 ml Zellsuspension auf 6-well-Platte Zelldichte: $1 \times 10^5$ /Vertiefung einer 6-well-Platte Medium: RPMI + 10% FCS
2	Transfektion	Mischen des Transfektionsansatzes: 400 µl RPMI + 4 µg DNA + 6 µl Turbofectamin 20 min bei Raumtemperatur inkubieren
		Zugabe von je 400 µl Transfektionsansatz pro well auf HEK293T-Lenti-X Zellen
3	Versorgen der transfizierten HEK293T-Lenti-X Zellen	Zugabe von 4 ml Komplettmedium
	Ausplattieren der Zielzellen	Aussaat von 2 ml Zellsuspension auf 6-well-Platte Zelldichte: $5 \times 10^4$ Zellen pro ml Medium: Komplettmedium
4	Ernten des Virusüberstands	Überführen des Virusüberstands durch Sterilfilter in Greinerröhrchen Zugabe von 1 µg/ml Polybrene
	Transduktion	Absaugen des verbrauchten Mediums auf den Zielzellen Zugabe von je 2-3 ml Virusüberstand pro well
5	Versorgen der Zielzellen	infektiöses Medium absaugen Zugabe von 6 ml Komplettmedium
6	Inkubation der Zielzellen	im Brutschrank bei 37 °C
7	Inkubation der Zielzellen	im Brutschrank bei 37 °C
8	Beginn der Experimente	Selektion mittels Puromycin und Hygromycin Herstellung von Lysaten für Western Blot GFP-Messung

**Tabelle 21:** Transfektion und Transduktion zur Herstellung lenti- und retroviraler Vektoren und Infektion der Zielzelle.

An Tag 4 wurde der Virusüberstand geerntet und durch einen Sterilfilter in ein Greiner-röhrchen überführt. Das Filtrat wurde mit 1 µg/ml Polybrene versetzt. Polybrene gleicht ladungsbedingte Wechselwirkungen zwischen den viralen Partikeln und der Zellmembran aus und erhöht so die Transduktionseffizienz. Aufgrund seiner

zelltoxischen Nebenwirkungen wurde bei dessen Zusatz streng auf die eingesetzte Menge geachtet.

Die zu infizierenden Zellen wurden bereits an Tag 3 in der gewünschten Dichte ausplattiert, um deren Adhäsion sicherzustellen. Auf die adhären Zielzellen konnten an Tag vier 2-3 ml des geernteten Virusüberstands gegeben werden. Am darauffolgenden Tag wurde das infektiöse Medium abgesaugt, die Zellen mit Komplettmedium versorgt und weitere zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Die verwendeten Vektorsysteme enthielten in ihren RNA-Sequenzen Resistenzen gegenüber Antibiotika, die zur Selektion der erfolgreich transduzierten Wirtszellen genutzt wurden. An Tag 8 konnten die transduzierten Melanomzelllinien zur Herstellung von Lysaten für den Western Blot oder für unterschiedliche Reporter-Gen-Assays weiterwendet werden. Für Versuche mit lebenden Zellen wurden jeweils selektionierte Dauerkulturen angelegt.

### **2.2.3 Messung von p53-Aktivität und Zellproliferation**

#### **2.2.3.1 Durchflusszytometrie**

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, um verschiedene Charakteristika von Einzelzellen in einer Zellsuspension zu überprüfen. Im Fluorescent-Activated-Cell-Sorter (FACS) wird ein Lichtstrahl auf die Zellen gerichtet. In Abhängigkeit vom Brechverhalten des Lichtstrahls in der Suspension kann eine Einzelzelle von Zellaggregaten unterschieden werden. Des Weiteren kann auf die relative Größe und Granularität der Einzelzelle geschlossen und lebende Zellen von Zellfragmenten und anderen Partikeln unterschieden werden. In der entsprechenden Einstellung kann außerdem die zelleigene GFP-Emission gemessen werden (siehe Kap. 2.2.3.3).

Die in Kultur befindlichen Melanomzelllinien wurden hierzu, wie oben beschrieben, von der Wachstumsplatte gelöst, vereinzelt, gewaschen und in das Messröhrchen (FACS-Röhrchen) überführt. Um ein aussagekräftiges Ergebnis von der Testpopulation zu erhalten, wurden 10.000 Zellen oder mehr pro Messung untersucht.

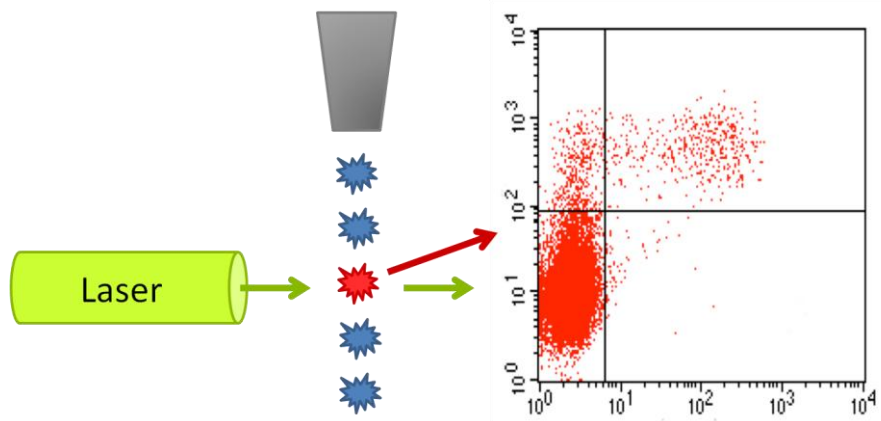


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie.

### 2.2.3.2 Zellzyklusanalyse mittels Quantifizierung des zellulären DNA-Gehalts

Zur Bestimmung des DNA-Gehalts in einer Zelle wird die Eigenschaft des fluoreszierenden Farbstoffs Propidiumiodid genutzt, selektiv in doppelsträngiger DNA zu interkalieren. Im FACS-Gerät kann die Fluoreszenz von Propidiumiodid quantifiziert und somit auf den DNA-Gehalt der Einzelzellen, ihren jeweiligen Chromosomensatz und die Zellzyklusphase geschlossen werden (siehe Abbildung 7). Zellen mit tetraploidem Chromosomengehalt (G2) fluoreszieren stärker als solche mit diploidem (G1). Apoptotische Zellen beinhalten weniger als einen Chromosomensatz und fluoreszieren deshalb nur gering (SubG1).

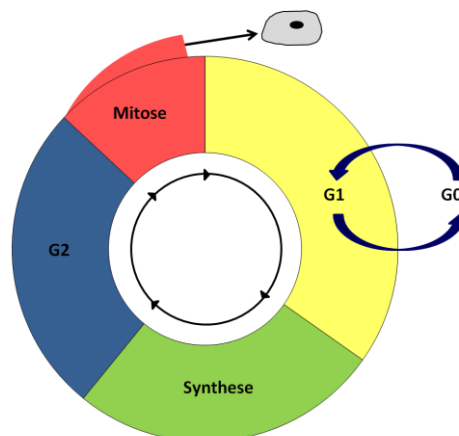
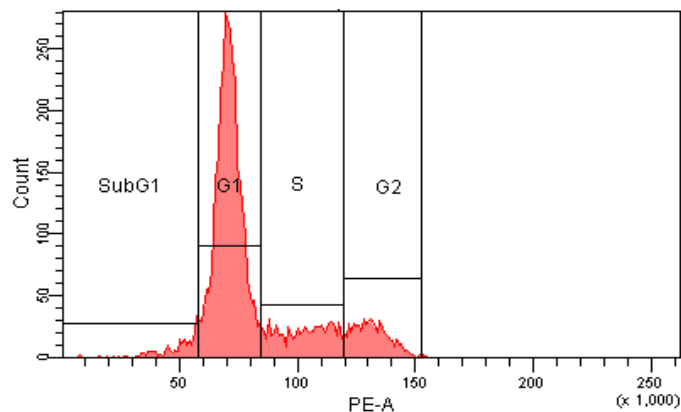


Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung der Zellzyklusphasen.

Zellen in der G2-Phase besitzen einen vierfachen Chromosomensatz, Zellen in der G1-Phase einen diploiden, apoptotische Zellen beinhalten weniger als einen vollständigen Chromosomensatz.



Die Zellsuspension wurde zunächst für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Zellpellet in 250 µl PBS + 1 % FCS resuspendiert und dann unter dauerndem Vortexen tropfenweise 2,5 ml eiskaltes Ethanol hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 4 °C für mindestens 16 h. Nach der Inkubation wurden die Zellen erneut für 5 min bei 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, die fixierten Zellen in 400 µl Propidiumiodidlösung (siehe Tabelle 6) resuspendiert und abschließend zur Degradation der RNA eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Nach Beendigung der Zellfixationsschritte erfolgte die Messung im FACS-Gerät. Je Durchlauf wurden mindestens 10.000 Zellen gemessen.



**Abbildung 8:** Darstellung der Zellzyklusanalyse der Zelllinie M14 mittels Propidiumiodidfärbung. Der DNA-Gehalt der fixierten Zellen wurde mittels FACS-Analyse gemessen. In der Abb. ist die absolute Zahl der Zellen dargestellt, die sich in den Zellzyklusphasen G1, S, G2 und SubG1 befanden. Den Großteil der Population bilden Zellen in der G1-Phase (diploider Chromosomensatz). Zellen mit mehr als dem diploiden Satz (S-Phase) waren kaum vorhanden, ebenso wenige Zellen in der G2-Phase mit vierfachem Chromosomensatz. Der Bereich SubG1 zeigt Zellen, die weniger als einen vollständigen Chromosomensatz besitzen.

### 2.2.3.3 Reporter-gen-Assays

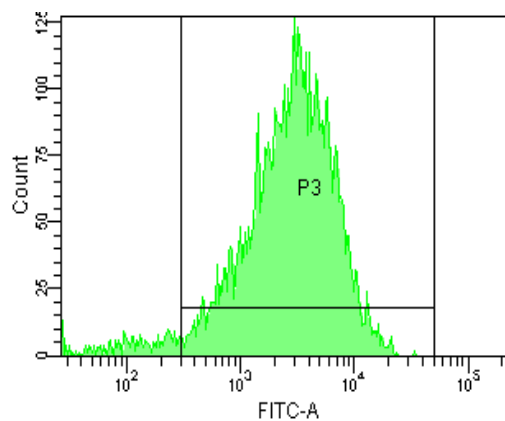
Die Expression eines bestimmten Gens kann man mithilfe eines Reporter-gen-Assays untersuchen. Hierzu wird in die Zielzellen ein entsprechendes Plasmid eingebracht. Das Reporter-gen wird spezifisch hinter den Promotor des zu untersuchenden Gens gehängt und in der Folge analog zu diesem Gen exprimiert.

### GFP-Messung

Mit Hilfe des Reporterkonstrukts pGreenfire™ ist es möglich, die GFP-Fluoreszenz von Einzelzellen in einer Suspension zu messen und somit die transkriptionelle p53-

Aktivität in den Zellen zu quantifizieren. Sobald p53 an einem p53-Transkriptions-Response-Element des Vektors bindet, wird die Expression von grün fluoreszierendem Protein (GFP) und Luciferase in Gang gesetzt. GFP kann im Durchflusszytometer FACSCanto (GFP-Assay) und Luciferase mittels Luciferase-Assay (siehe unten) gemessen werden. Für die Messungen wurden die Zellen zunächst gewaschen, abgelöst und dann in FACS-Röhrchen überführt. Pro Messung wurden 10.000 Zellen untersucht.

Im GFP-Assay werden Zellen, die mit dem GFP-emittierenden Vektor pGreenfire™ transduziert wurden, zunächst von GFP-negativen, nicht infizierten Zellen unterschieden. Die Quantifizierung der gemessenen GFP-Fluoreszenz erlaubt einen Rückschluss auf die p53-Aktivität der pGreenFire™-tragenden Zellen.



**Abbildung 9: Unterscheidung und Quantifizierung von GFP-positiven und -negativen Zellen der Zelllinie M26 mittels FACS-Analyse.**

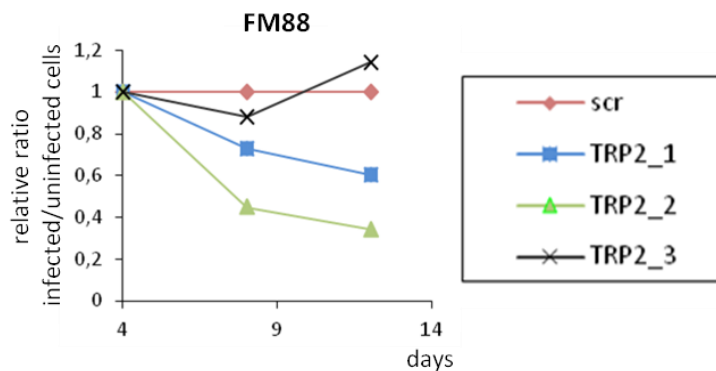
Im Bereich P3 ist die Population dargestellt, die stabil mit pGreenfire™ transduziert ist und p53-abhängig GFP emittiert.

### **Analyse des Wachstumsverhaltens in einem *Mixed-Cell-Culture-Assay***

Im Proliferationsassay wurden fünf Melanomzelllinien (FM88, M26, MelU, MelJuso und WüMel45) über einen Zeitraum von zwölf Tagen hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens untersucht. Es wurden nicht infizierte Zellen einer Linie mit Zellen derselben Linie, die den lentiviralen Vektor KH1 trugen, im immer gleichen Verhältnis (80 % infizierte Zellen zu 20 % nicht infizierten Zellen, entsprechend 4:1) gemischt. Der Vektor KH1 trug die Sequenzen scr oder eine von drei Sequenzen für das Protein TRP2 (TRP2\_1, TRP2\_2, TRP2\_3). Durch die Messung der GFP-Expression in der

Durchflusszytometrie konnten die beiden Populationen in der Durchflusszytometrie unterschieden werden.

Insgesamt wurden zwei Messzyklen durchgeführt und die GFP-Fluoreszenz jeweils an den Tagen 4, 8 und 12 gemessen. Die Ergebnisse der beiden Messungen wurden zunächst zu einem Mittelwert der GFP-Fluoreszenz zusammengefasst. Dann wurden die Ergebnisse relativ zum 1. Tag berechnet. Unter der Annahme, dass der Vektor KH1-scr keinen Einfluss auf die p53-Expression und -Aktivität nimmt und somit die Wachstumskurven der Zellen nicht verändert, wurden die Mittelwerte relativ zum ersten Tag schließlich relativ zu den jeweiligen scr-Messwerten berechnet. Auf diese Weise war es möglich, eine Aussage über das Wachstumsverhalten der mit den TRP2-shRNAs infizierten Zellen relativ zu den scr-Messwerten zu treffen.



**Abbildung 10: Zellwachstumsanalyse der Zelllinie FM 88.**

Die Zelllinie FM88 wurde mit dem Knockdown-Vektor KH1 infiziert. Der Vektor KH1 trug die Sequenzen scr oder eine von drei Sequenzen für das Protein TRP2 (TRP2\_1, TRP2\_2, TRP2\_3). Die mit dem KH1-Vektor infizierten Zellen wurden genau wie nicht infizierte Zellen über 12 Tage kultiviert. An den Tagen 4, 8 und 12 wurden die Zellen suspendiert, im Verhältnis 4:1 (infiziert:nicht infiziert) gemischt und die GFP-Fluoreszenz in der Durchflusszytometrie gemessen. Die mit KH1-scr infizierten Zellen dienten als Referenz-Zellsuspension.

### Luciferase-Assay

Das Reporter-gen pGreenfire™ kodiert neben dem grün fluoreszierenden Protein GFP auch für die Firefly-Luciferase des nordamerikanischen Leuchtkäfers *Photinus pyralis*. Bei der Firefly-Luciferase handelt es sich um ein monomeres Enzym mit einem Molekulargewicht von 61 kDa.

Für den Luciferase-Assay wurden je 20.000 Zellen pro well in 200 µl Nährmedium auf 96-well-Platten ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am

darauffolgenden Tag erfolgte die Lyse der Zellen als Vorbereitung für die Luciferase-Messung. Dazu wurde das Nährmedium abgeschüttet und die Platten vorsichtig mit PBS gewaschen. In jedes well wurden je 60 µl des Promega Lysis-Buffers 1:5 in destilliertem Wasser (dH<sub>2</sub>O) hinzugefügt (siehe Tabelle 7).

Nach Zugabe des Lysepuffers wurden die Platten für 20 min behutsam geschüttelt, mit Parafilm verschlossen und für mindestens 24 h bei -20 °C eingefroren. Am Tag der Messung wurde die Platte aufgetaut und aus jedem well 30 µl des Inhalts auf eine weiße 96-well-Luciferase-Platte umpipettiert. Des Weiteren wurde die Reaktionslösung A vorbereitet (siehe Tabelle 7). Auf jedes well wurden im Orion Luminometer 150 µl der Lösung A eingebracht. Die Firefly-Luciferase setzt das Luciferin aus Lösung A um; das emittierte Licht konnte im Luminometer gemessen werden.

### **2.2.4 Spezifischer Nachweis von Proteinen**

#### **2.2.4.1 Herstellung von Gesamtzell-Lysaten und Bestimmung der Proteinkonzentration**

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurden die Zellen lysiert. Die im Lysat enthaltenen Proteine können mittels Gel-Elektrophorese und anschließend Western Blot aufgetrennt und schließlich nach Zugabe von Antikörpern spezifisch nachgewiesen werden.

Die Zellen wurden zunächst wie unter Kap. 2.2.1 beschrieben kultiviert. Nach Konfluenz konnten die Zellen mit Trypsin abgelöst und geerntet, in ein Eppendorf-Gefäß überführt und bei 2000 rpm für 5 min zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit PBS gewaschen. Die Suspension wurde erneut für 5 min bei 2000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Für die folgenden Lyseschritte wurden die Eppendorf-Gefäße auf Eis inkubiert. Je nach Zellpelletgröße wurden 50-200 µl des RIPA-Lyse-Puffers hinzugegeben (siehe Tabelle 8). Dem RIPA-Lyse-Puffer wurde Protease-Inhibitor im Verhältnis 1:25 und Phosphatase-Inhibitor im Verhältnis 1:10 beigefügt.

Nach Zugabe des RIPA-Lyse-Puffers wurde jedes Zellpellet mittels Vortex gelöst, im Anschluss mit einem Sonificator mit Ultraschallwellen behandelt und durch weitere 10

min Schütteln bei 4 °C vollständig lysiert. Um nicht gelöste Fragmente zu isolieren, wurde die Suspension für 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand, das Lysat, wurde zur Weiterverwendung in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, ein Teil des Proteinextrakts zur späteren Verwendung bei - 20°C gelagert.

Für die Proteinkonzentrationsbestimmung in jedem hergestellten Lysat wurde das Pierce® BCA Detection Kit (Thermo Fisher Scientific) verwendet. Das Prinzip beruht auf der Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  durch Proteine im alkalischen Milieu. Bicinchoninsäure (BCA) reagiert mit den reduzierten Kupfer-Kationen. Es entsteht ein purpurfarbenes Reaktionsprodukt, dessen Extinktion im Plattenphotometer bei 562 nm gemessen werden kann. Die nahezu direkte Proportionalität zwischen der Farbintensität und der vorhandenen Proteinkonzentration ermöglicht das Ermitteln der Proteinmenge im Vergleich zu dem im Kit enthaltenen Standard Rinderserumalbumin BSA.

### **2.2.4.2 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine biochemische Methode zur Auftrennung von Proteinen in einem elektrischen Feld.

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration, wie unter Kap. 2.2.4.1 beschrieben, wurden die Zelllysate durch Zugabe von RIPA-Puffer auf eine Gesamtproteinkonzentration von 10 µg/µl normiert. Zu 15 µl jeder normierten Probe wurden 4 µl 5x Lane (siehe Tabelle 9) hinzugegeben. 5x Lane enthält SDS (sodium dodecyl sulfate) und DTT (Dithiothreitol). Die Proben wurden dann für 10 min auf 95 °C erhitzt. Das anionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet durchschnittlich 1,4 negative Ladungen an eine Aminosäure. Durch die negativen Ladungen kommt es zu einer Abstoßung der Proteine voneinander und zusammen mit dem Aufkochen der Proben schließlich zur Linearisierung der gefalteten Proteine (Denaturierung). Dithiothreitol (DTT) hilft dabei, durch Reduktion Disulfidbrücken zu spalten.

Zur Auftrennung der denaturierten Proteine wurden die Proben nun auf ein Trenngel geladen. Die Wahl des Trenngels hängt vom Molekulargewicht der zu detektierenden Proteine ab. Je kleiner das zu detektierende Protein ist, desto höher muss die Acrylamid-/Bisacrylamidkonzentration des Trenngels gewählt werden. Die in

vorliegender Arbeit detektierten Proteine p53 und TRP2 haben eine Molekülmasse von 53 kDa bzw. 59 kDa. Daher kamen Gradientengele mit einer Konzentrationsbreite von 4-20 % und Trenngele mit einer Konzentration von 10 % zum Einsatz.

Die Gelplatten wurden in eine Elektrophorese-Kammer eingebracht, die mit Elektrophoresepuffer gefüllt war. Zur Auftrennung der Proteine wurde eine Spannung von 110 V angelegt, die Elektrophorese dauerte eine Stunde.

Durch die Überlagerung der Eigenladungen der Proteine mit SDS wandern nun alle negativ geladenen Moleküle in Richtung der Anode. Kleine Proteine mit geringerem Molekulargewicht wandern dabei weiter als größere, schwerere Proteine. Dadurch werden die Proteine gemäß ihrer molekularen Masse aufgetrennt. Zusätzlich wird ein Größenmarker in eine freie Tasche des Gels geladen. Er besteht aus Proteinen bekannter Größe und dient so als Referenz zur Beurteilung der Proben.

### **2.2.4.3 Western Blot**

Die im Gel nach ihrem Gewicht aufgetrennten Proteine wurden nun mittels Elektroblothing auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Vorgang fand in einer mit Transferpuffer gefüllten Elektrophorese-Kammer bei 400 mA über 60 min statt.

Nach Abschluss der Elektrophorese wurde die Nitrozellulosemembran aus der Kammer entnommen und über 1 h bei Raumtemperatur mit Magermilchpuffer (Blocking-Buffer, siehe Tabelle 10) geblockt. Durch das Sättigen der Membran mit Proteinen aus dem Blocking-Buffer wird verhindert, dass die danach aufgetragenen Antikörper unspezifisch binden.

Nach dem Sättigungsschritt wurde die Blockierlösung verworfen und die Membran mit dem in frischem Blocking-Buffer verdünnten Primäantikörper (siehe Tabelle 18) bei 4 °C und auf einem Schüttler rotierend über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 5 min in PBS gewaschen und danach der zweite, ebenfalls in Blocking-Buffer gelöste Antikörper hinzugegeben und 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach Entfernen des Sekundäantikörpers wurde die Membran erneut dreimal für je 5 min in PBS gewaschen.

Der erste Antikörper ist gegen bestimmte Antigene des nachzuweisenden Proteins gerichtet. Der Sekundärantikörper, an den das Marker-Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppelt ist, bindet an Epitope des ersten Antikörpers. Um die gebundenen, sekundären Antikörper sichtbar zu machen, wurde eine Detektionslösung auf die Membran aufgebracht, die Luminol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und Phenol als Verstärker enthält. Als Detektierlösungen wurden Pierce™ ECL Western Blotting Substrate und SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate verwendet. Luminol katalysiert mit der Meerrettichperoxidase eine Lichtreaktion, die auf einem Röntgenfilm anhand schwarzer Banden sichtbar gemacht werden kann. Die Intensität der schwarzen Banden verdeutlicht die relative Menge des Proteins und erlaubt Vergleiche zu anderen Banden. Die Belichtungszeiten des Röntgenfilms variierten von einigen Sekunden bis zu mehreren Minuten.

Zur Kontrolle der Proteinladung auf der Membran dienten Färbungen mit PonceauS (siehe Tabelle 10) oder  $\beta$ -Tubulin. Bei  $\beta$ -Tubulin handelt es sich um einen Primärantikörper. Um ihn auf der Membran anwenden zu können, mussten die Proteine der Blockierlösung und des zuerst verwendeten Primärantikörpers mittels 15-minütigem Waschen in Restore™ Plus Western-Blot Stripping Buffer von der Membran gelöst werden.

### **2.2.5 Annealing von DNA-Oligonukleotiden**

Zunächst wurden shRNA-Oligonukleotide für den Knockdown von TRP2 mittels eines siRNA-Design-Services der Firma Sigma Aldrich ausgewählt und bestellt (siehe Tabelle 17). Vor ihrer Weiterverwendung mussten die Oligonukleotide einer Zusammenlagerung (*Annealing*) unterzogen werden. Die bestellten Oligonukleotide wurden in 60  $\mu$ l-Ansätzen gemischt (siehe Tabelle 22).

Die Oligonukleotide beinhalteten eine 22 bp lange Zielsequenz, gefolgt von einer 7 bp langen Schleifensequenz und der erneuten shRNA-Sequenz in reverser Orientierung. Am 3'-Ende stand ein Terminationssignal für die Polymerase III.

Substrat	Volumen [ $\mu\text{l}$ ]
Oligo reverse (25 $\mu\text{M}$ )	4
Oligo forward (25 $\mu\text{M}$ )	4
NaCl (0,5 M)	12
dH <sub>2</sub> O	40
gesamt	60

Tabelle 22: Pipettierschema zum Annealing von Oligonukleotiden.

Um Sekundärstrukturen aufzuschmelzen, wurden die Ansätze zunächst zwei Minuten bei 80 °C erhitzt. Zum Annealing wurden sie im abgeschalteten Heizblock belassen, bis die Temperatur auf 27°C gesunken war. Die hierbei entstandenen doppelsträngigen DNA-Inserts konnten in einem zweiten Schritt in den Expressionsvektor KH1 ligiert oder bei -20°C eingefroren werden. Es wurden insgesamt drei shRNA-Inserts auf diese Weise generiert: TRP2\_1, TRP2\_2 und TRP2\_3.

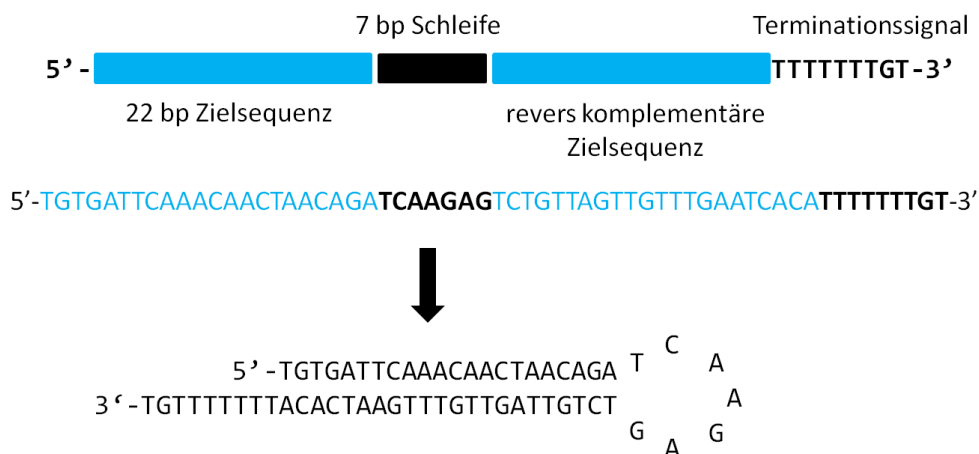


Abbildung 11: Schematische Darstellung des TRP2\_1 forward Oligonukleotids. Vor seiner Verwendung musste es einem Annealing mit dem TRP2\_1 reverse Oligonukleotid unterzogen werden. Nach der Transkription in den Zellen bildete sich die Haarnadelstruktur der shRNA aus.

### 2.2.6 Doppelrestriktion der Zielvektoren und Inserts

Restriktionsendonukleasen, auch Restriktionsenzyme genannt, dienen in Bakterien zum Abbau fremder DNA-Moleküle, wobei die zelleigene DNA durch Methylierung vor



den Restriktionsendonukleasen geschützt ist. Sie binden und erkennen spezifisch Sequenzen von vier bis acht Basenpaaren und spalten in dieser Region die Phosphodiesterbindung in jedem Strang. Je nach eingesetztem Restriktionsenzym und Lage der Schnittstellen entstehen DNA-Fragmente mit doppelsträngigen, glatten Enden (*blunt ends*) oder einzelsträngigen, überlappenden 3'- bzw. 5'-Enden (*sticky ends*) (142).

Bei einer Einfachrestriktion wird die DNA mit nur einem Enzym geschnitten, die Doppelrestriktion wird mit zwei verschiedenen Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Haben beide Enzyme die gleichen Puffer- und Temperaturbedingungen, können sie gleichzeitig eingesetzt werden. Um eine optimale Spaltung zu erzielen, ist es wichtig, das richtige Verhältnis von Enzym- zu DNA-Menge einzusetzen. Der Erfolg der Restriktion wird anschließend durch Gelelektrophorese überprüft.

Die verwendeten Vektoren und Inserts wurden jeweils einer Doppelrestriktion unterzogen, das heißt, mit zwei Restriktionsenzymen verdaut. Zum Einsatz kamen die Enzympaare EcoRI – BamHI und SmaI – XbaI. Man machte sich zu Nutze, dass die jeweiligen Enzympaare voneinander verschiedene, einzelsträngige, überhängende Enden erzeugen. Im Falle von SmaI und XbaI entstanden ein glattes und ein überhängendes Ende. Dadurch konnten sich die Enden jeweils nur mit der ihnen komplementären Basensequenz ligieren, wodurch sich die ebenfalls von den jeweiligen Enzympaaren verdauten Inserts nur in der korrekten 5' → 3'-Richtung mit dem Vektor verbinden konnten.

Substrat	Volumen [µl]
Vektor KH1 (≅ 5 µg DNA)	6
XbaI	1
SmaI	1
Tango Puffer 10X	2
dH <sub>2</sub> O	10
gesamt	20

**Tabelle 23:** Beispiel-Pipettierschema zur Doppelrestriktion des Zielvektors KH1 mit den Restriktionsenzymen XbaI und SmaI.

In weiteren Testansätzen kam außerdem der Vektor pIH zum Einsatz, der mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI geschnitten wurde.

### **2.2.7 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren**

Die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA geschieht durch Anlegen eines elektrischen Feldes und ist für Fragmente von 500 bis 20.000 Basenpaaren geeignet. Dabei bestimmt die Größe des zu untersuchenden Fragments die Agarosekonzentration im Gel. Je größer das DNA-Fragment, desto langsamer wandert es im Gel und desto kleiner wird deshalb die Agarosekonzentration gewählt. Die Visualisierung der DNA erfolgt durch Reagenzien, die mit der DNA interkalieren und durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden (140).

Zur Herstellung des Elektrophorese-Gels wurden 100 ml 0,5x TAE-Puffer mit 0,7 g Agarose aufgekocht, bis eine klare Lösung entstand. Nach Abkühlung auf etwa 50 °C wurden 10 µl SYBR® Safe DNA Gel Stain hinzugegeben und die Flüssigkeit anschließend in eine dafür vorgesehene Kammer gegossen. Nach Aushärtung des Gels wurden die Proben mit 5x Ladepuffer vermischt und neben einem Größenstandard als Referenz in die Taschen gefüllt. Das geladene Gel wurde vorsichtig mit 1x TAE-Puffer übergossen. Die Elektrophorese wurde bei 150 V für 45 min durchgeführt.

### **2.2.8 DNA-Extraktion aus Agarosegelen**

Die gewünschten Fragmente, der geschnittene Vektor KH1 oder die geschnittenen shRNA-Inserts wurden auf dem UV-Leuchtschirm mit einem Skalpell in Form eines Quaders ausgeschnitten. Die DNA wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aus der Agarose isoliert und in 30 µl Puffer eluiert wurde. Im Anschluss wurde die Konzentration am Photometer bestimmt (142).

### **2.2.9 Ligation des DNA-Inserts in Vektoren**

In dieser Arbeit wurden die shRNA-Inserts in die durch Doppelrestriktion geschnittenen Vektoren KH1 oder pIH ligiert. Jeder Ligationsansatz enthielt 200 ng des verdauten Plasmids. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz ohne Zugabe eines Inserts ligiert.

Mit Hilfe des Enzyms T4-DNA-Ligase konnten neue kovalente Phosphodiesterbindungen im DNA-Rückgrat hergestellt werden.

Substrat	Volumen [ $\mu$ l]
Vektor KH1/Vektor pIH ( $\cong$ 200 ng)	1
T4-Ligationspuffer	2
shRNA (annealed)	3
T4-DNA-Ligase	1
dH <sub>2</sub> O	13
gesamt	20

**Tabelle 24:** Pipettierschema zur Ligation der shRNA-Inserts in den Zielvektor KH1.

Die Ligation erfolgte bei Raumtemperatur für 2 Stunden. Durch Erhitzen der Ansätze auf 65 °C für 10 min wurde die Reaktion gestoppt.

### 2.2.10 Sequenzierung von DNA

Zur Überprüfung des Erfolgs der Ligation wurden 600 ng des Plasmids gemischt mit einem Primer zur DNA-Sequenzierung an die Sequence Laboratories Göttingen (Seqlab) geschickt. Dort wurde die genaue Nukleotidabfolge der jeweiligen Probe bestimmt.

### 2.2.11 Transformation

Die Transformation ist ein Verfahren zum Einschleusen fremder Plasmid-DNA in chemisch kompetente E. coli Bakterien. In den Bakterien werden die Plasmide durch deren zelleigenen DNA-Replikationsapparat vervielfältigt und können später daraus extrahiert werden.

Die chemisch kompetenten E. coli Zellen wurden in Eppendorfgefäßen à 25  $\mu$ l langsam auf Eis aufgetaut und dann 1  $\mu$ l des zu klonierenden Plasmids hinzugefügt. Es folgt eine 30-minütige Inkubationszeit auf Eis, in der die Zellen die Plasmid-DNA aufnehmen. Danach wurde der Stoffwechsel der Zellen durch eine 30-sekündige Erhitzung auf 42 °C in Gang gesetzt. Anschließend wurden die Zellen zwei Minuten lang auf Eis abgekühlt, 250  $\mu$ l LB-Medium zugesetzt und die Proben eine Stunde bei 37 °C geschüttelt. Der

gesamte Ansatz wurde im letzten Schritt auf Petrischalen mit LB-Agar ausplattiert. Der LB-Agar enthielt 0,01 % Ampicillin, um die transformierten Zellen zu selektionieren.

Am nächsten Tag wurde eine Kolonie von Klonen von der Agarplatte mit Hilfe einer Pipettenspitze abgeimpft. Die Klone wurden in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB-Medium überführt und zur Förderung des Wachstums über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am dritten Tag wurden die Plasmid-DNA mittels Qiagen Plasmid Midi Kit aus den Bakterien extrahiert. Die Gesamtkonzentration und der Reinheitsgrad der DNA wurden mit Hilfe eines Spektralphotometers bestimmt.

### 2.2.12 PCR- Klonierung

Die Klonierung mittels Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) dient der Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Die zugrunde liegende Methode ist eine nested-PCR. In vorliegender Arbeit wurde TRP2 kloniert, um ausreichend DNA-Material später einer Mutagenese zuführen zu können. Für die Amplifikation eines Genabschnitts werden zwei Primer benötigt, die den zu vervielfältigenden DNA-Abschnitt flankieren. Die verwendete Phusion® High Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific) erlaubt die Generierung besonders langer DNA-Sequenzen.

Das Ergebnis der PCR-Klonierung wurde mit den Verdauungsenzymen EcoR1 und BamH1 verdaut und dann mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt. Mittels Agarosegelelektrophorese konnten die Amplifikate dargestellt und mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aus der Agarose isoliert werden.

Substrat	Volumen [µl]
dH <sub>2</sub> O	33,1
Primer fw (10 µM)	2
Primer rev (10 µM)	2
Puffer 5x	10
dNTP	1,5
Taq	0,4
Template	1
gesamt	50

**Tabelle 25:** Pipettierschema der PCR-Klonierung.

Zyklen	Schritt	Dauer	Temperatur [°C]
1	Denaturierung	30''	98
30	Denaturierung	10'	98
	Annealing	30'	55
	Elongation	2'	72
1	Elongation	7'	72
	Kühlung	∞	4

**Tabelle 26: PCR-Programm.**

### 2.2.13 In-vitro-Mutagenese

Die In-vitro-Mutagenese ist ein Verfahren, um bestimmte Nukleotide in einem Plasmid gezielt auszutauschen. Mit Hilfe geeigneter Primer, die eine entsprechend modifizierte Basensequenz enthalten, werden die gewünschten Veränderungen über eine PCR in das Plasmid eingefügt. Für vorliegende Arbeit wurde das Verfahren zweimalig angewendet. Für die Entfernung des Leuchtsignals GFP in den TRP2-shRNAs (TRP2\_2, TRP2\_3) wurde das Primerpaar Destroy GFP for und Destroy GFP rev verwendet (Tabelle 17).

Ein weiteres Mal wurde das Verfahren der In-vitro-Mutagenese angewendet, um die Bindungsstellen für die shRNAs TRP2\_2 und TRP2\_3 so zu verändern, dass das shRNA-Konstrukt unwirksam wurde. Hierzu waren zwei Mutageneseschritte notwendig. Im ersten Schritt wurden durch das Primerpaar TRP2\_sh3\_for und TRP2\_sh3\_rev drei Nukleotide ausgetauscht, im zweiten Schritt durch das Primerpaar TRP2\_sh5\_for und TRP2\_sh5\_rev nochmals drei Nukleotide. Die Durchführung erfolgte mit dem QuikChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene).

Gemäß dem Protokoll des Herstellers wurden für den PCR-Ansatz 25 ng des Plasmids eingesetzt. Für die Sequenzierung wurden die in Tabelle 17 gelisteten Primer-Paare verwendet.

Substrat	Volumen [ $\mu$ l]
Mutagenese-Plasmid	25 ng
Primer 1 (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l
Primer 2 (10 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l
dNTP Mix (10 mM)	0,5 $\mu$ l
10x Reaction Buffer	2,5 $\mu$ l
Quick Change Lightning Enzyme	0,5 $\mu$ l
Quick Solution Reagent	0,75 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	ad 25 $\mu$ l

**Tabelle 27:** Pipettierschema der In-vitro-Mutagenese.

Die veränderten Plasmide wurden zu deren Vervielfältigung in XL10-Gold® ultrakompetente Zellen (Stratagene) transfiziert. Schließlich konnten die Zielzellen mit den veränderten Plasmiden transduziert werden.

### 2.2.14 Behandlung der Zellen mit Nutlin-3a

Um die wachstumshemmende Funktion von p53 näher zu untersuchen, wurden die untersuchten Zelllinien mit Nutlin-3a behandelt. Bei Nutlin-3a handelt es sich um ein Analogon der cis-Imidazoline. Es inhibiert die p53-Ubiquitinase MDM2 spezifisch und bewirkt über die Stabilisierung von p53 die Induktion von Apoptose und Seneszenz in der Zelle (143).

Die adhärent wachsenden Zellen wurden zunächst suspendiert, in einer Dichte von  $2 \times 10^5$ /ml Kompletmedium ausplattiert und etwa 6 h später nach deren Adhäsion mit Nutlin-3a in einer Konzentration von 0,2 % Nutlin-3a (10 mM, Verdünnung 1:1000) in Kompletmedium behandelt. Am Folgetag wurde ein Teil der Zellen für die Messung der p53-Aktivität mittels Durchflusszytometrie entnommen und ein Teil für die Herstellung von Lysaten für den Luciferase-Assay und Western-Blot verwendet. Der Rest der Zellen verblieb in Kultur. Am Tag 3 fand eine Zellzyklusmessung mittels Propidiumiodid (siehe Kap.2.2.3.2) statt.

### 3 Ergebnisse

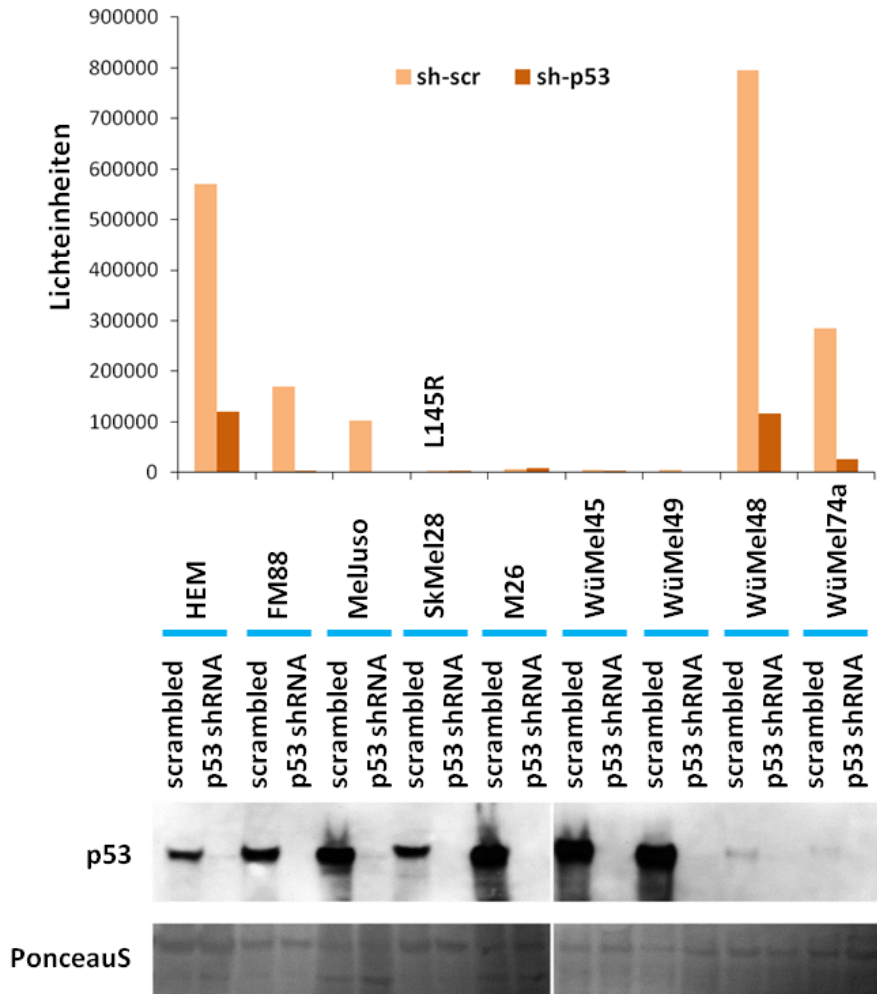
#### 3.1 Funktionelle p53-Inaktivität in drei von sieben p53-wildtypischen Melanomzelllinien

Um die Mechanismen der p53-Inaktivierung in Melanomzellen besser zu verstehen, wurden in vorliegender Arbeit zunächst mehrere Melanomzelllinien hinsichtlich ihrer p53-Expression und p53-Aktivität untersucht. Bei den in Abbildung 12 gezeigten Melanomzelllinien handelte es sich um sieben p53-wildtypische Linien (FM88, MelJuso, M26, WüMel45, WüMel49, WüMel48, WüMel47a) und eine Linie mit einer inaktivierenden p53-Mutation (SkMel28) (136). Als Kontrollpopulation dienten humane epidermale Melanozyten (HEM).

Das Vorhandensein von p53 in den acht untersuchten Melanomzelllinien konnte mittels Western Blot gezeigt werden und war unabhängig von deren Mutationsstatus. HEM und sechs (FM88, MelJuso, SkMel28, M26, WüMel45, WüMel49) von acht Melanomzelllinien exprimierten vergleichsweise mehr p53, was sich in einer breiteren Western-Blot-Bande darstellte. Zwei der verwendeten WüMel-Linien (WüMel48, WüMel74a) wuchsen im Vergleich zu den anderen p53-wildtypischen Zellen *in vitro* sehr langsam und zeigten bei gleicher Belichtungszeit des Röntgenfilms eine schwächere p53-Bandenstärke. Die Unterdrückung der p53-Expression mittels des lentiviralen shRNA-Vektors KH1 mit p53-spezifischer shRNA (sh-p53) gelang bei allen Zellenlinien unabhängig von deren Mutationsstatus gleichermaßen gut.

Der Vergleich zwischen Western Blot und Luciferase-Assay zeigte, dass sich aus der Expression von p53 nur bedingt Rückschlüsse auf dessen intrinsische Aktivität ziehen ließen. Für die Kontrollzellen (HEM) und zwei wildtypische Melanomzelllinien (FM88, MelJuso) konnte eine relative Übereinstimmung zwischen der p53-Expression und der p53-Aktivität gezeigt werden. Sowohl die p53-Expression als auch die p53-Aktivität der Zelllinien HEM, FM88 und MelJuso waren durch sh-p53 unterdrückbar. In drei von sieben p53-wildtypischen Melanomzelllinien (M26, WüMel45, WüMel49) lag eine funktionelle p53-Inaktivität bei gleichzeitiger p53-Expression vor. Die mutierte Zelllinie SkMel28 exprimierte p53 ohne detektierbare Aktivität im Reporter-gen-Assay.

WüMel48 und WüMel74a zeigten nur eine geringe Expression von p53, jedoch eine hohe Luciferase-Aktivität, die sich durch p53-spezifische shRNA unterdrücken ließ. Damit die gemessene Reporterogenaktivität nicht von der Anzahl der aufgenommenen Kopien abhängig war, wurden die Luciferase-Messwerte jeder Zelllinie mittels real-time PCR ermittelter, relativer Luciferase-Aktivität normiert.



**Abbildung 12: Funktionelle p53-Inaktivität in drei von sieben p53-wildtypischen Melanomzelllinien.** Infektion der in der Abbildung genannten Zelllinien mit dem lentiviralen p53-Reporterkonstrukt pGreenFire™, das unter der Kontrolle eines p53-abhängigen Promoters für Luciferase und GFP kodierte und eine Puromycin-Resistenz enthielt (siehe Kap. 2.1.7). Selektion der stabil transduzierten Zellen mit Puromycin. Anschließend Infektion der Zellen mit dem lentiviralen shRNA-Vektor KH1, der entweder für eine Kontroll-shRNA (sh-scr) oder eine p53-spezifische shRNA (sh-p53) kodierte. Gewinnung der Lysate für die Luciferase-Messung (oberer Teil der Abb.) und den Western Blot (unterer Teil der Abb.) an Tag 4 nach Transduktion der Zellen. Ladekontrolle mittels PonceauS-Färbung. Normierung der Luciferase-Messwerte jeder Zelllinie mittels real-time PCR ermittelter, relativer Luciferase-Aktivität. Abb. nach Houben et al., 2011 (136).



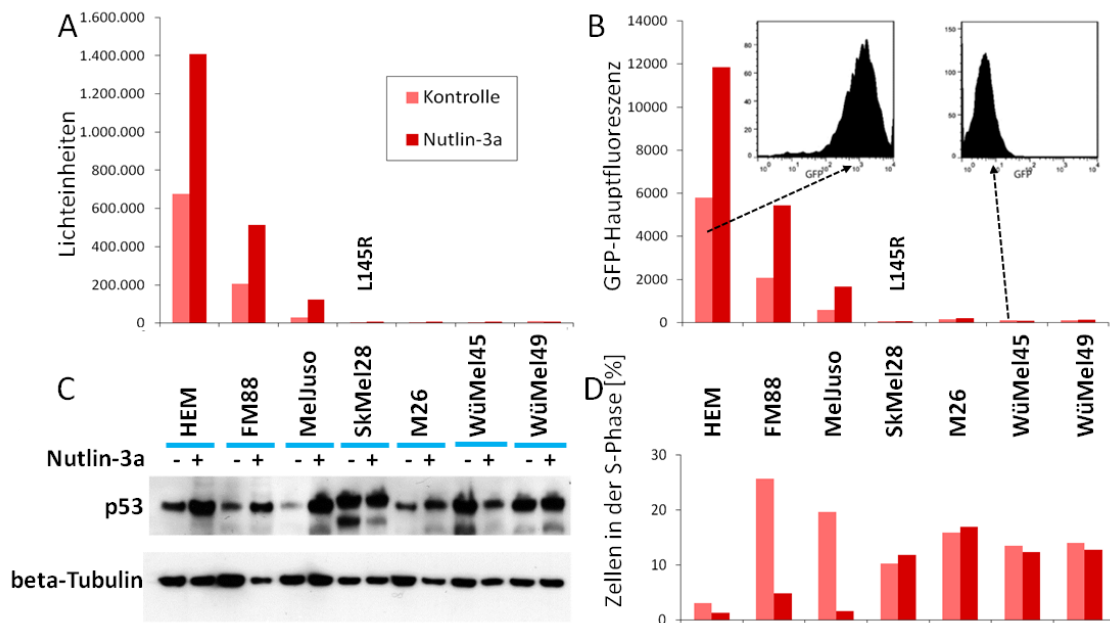
Die p53-Expression war in den acht untersuchten Melanomzelllinien recht variabel detektierbar und korrelierte weder mit dem Mutationsstatus noch mit der gemessenen p53-spezifischen Reporterogenaktivität.

#### **3.2 Zellzyklusarrest durch Erhöhung intrinsischer p53-Aktivität mittels Nutlin-3a**

P53, der „Wächter des Genoms“, hat eine wachstumshemmende und apoptotische Funktion in der Zelle. Um die Fragen zu beantworten, ob p53 durch MDM2 unterdrückt wird und ob gesteigerte p53-Expression zu gesteigerter p53-Aktivität führt, wurden die Zellen mit Nutlin-3a behandelt und die p53-Expression (siehe Abbildung 13C) und -Aktivität (siehe Abbildung 13A und B) mit der Zahl der Zellen in der Synthesephase S des Zellzyklus (siehe Abbildung 13D) verglichen. Bei Nutlin-3a handelt es sich um ein Analogon der cis-Imidazoline. Es inhibiert MDM2 spezifisch und bewirkt über die Stabilisierung von p53 die Induktion von Apoptose und Seneszenz in der Zelle (143).

Fünf der im Folgenden untersuchten sechs Melanomzelllinien waren p53-wildtypisch (FM88, MelJuso, M26, WüMel45, WüMel49), SkMel28 enthielt die p53-inaktivierende Mutation L145R. Im Vergleich zu den in Abbildung 12 dargestellten Experimenten fehlten die Zelllinien WüMel48 und WüMel74a. Sie wurden aufgrund ihres sehr langsamen Wachstumsverhaltens durch WüMel49 ersetzt. Als Reporterkonstrukt diente erneut pGreenFire™. Es ermöglichte durch die gleichzeitige, p53-abhängige Expression von GFP und Luciferase den Vergleich von GFP- und Luciferase-Assay.

P53 wurde in allen gezeigten Zelllinien mehr oder weniger stark exprimiert (siehe Abbildung 13C). In den drei wildtypischen Linien FM88, MelJuso und M26 und in HEM kam es durch die Behandlung der Zellen mit Nutlin-3a zu einer Steigerung der p53-Expression. In der mutierten Zelllinie SkMel28 und in der wildtypischen Linie WüMel49 blieb die p53-Expression ungefähr gleich. In WüMel45 nahm die p53-Expression nach der Behandlung mit Nutlin-3a ab.



**Abbildung 13: Zellzyklusarrest durch Erhöhung intrinsischer p53-Aktivität mittels Nutlin-3a.** Kultivierung der pGreenFire™-tragenden Zellen und Behandlung eines Teils der Zellen mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin-3a. pGreenFire™ kodierte unter der Kontrolle eines p53-abhängigen Promoters für Luciferase und GFP. Analyse der Luciferase-Aktivität (A), GFP-Fluoreszenz (B) und p53-Expression (C) 24 h nach Exposition der Zellen mit Nutlin-3a. Zur Zellzyklusanalyse (D) Ermittlung des DNA-Gehalts der Zellen mittels Propidiumiodid vor und an Tag 2 nach Arrestinduktion durch Nutlin-3a. Abb. nach Houben et al., 2011 (136).

Wie bereits im Vorversuch (siehe Abbildung 12) konnten auch in Abbildung 13 Zelllinien mit messbarer (HEM, FM88, MelJuso) und Zelllinien ohne messbare p53-Aktivität (SkMel28, M26, WüMel45, WüMel49) unterschieden werden. In den zwei Zelllinien FM88 und MelJuso führte die Behandlung mit Nutlin-3a zur deutlichen Steigerung der Aktivität. Auf die p53-Aktivität der anderen Zellen ohne oder mit nur geringem Aktivitätsnachweis hatte Nutlin-3a keinen messbaren Einfluss. Mittels Durchflusszytometrie konnte auf Einzelzellebene ausgeschlossen werden, dass die hohe Reporteraktivität in HEM, FM88 und MelJuso einen Durchschnitt aus hoher und niedriger p53-Aktivität in unterschiedlichen Subpopulationen darstellte (siehe Abbildung 13B, kleines Schaubild).

Die hohe Übereinstimmung der Ergebnisse von GFP- und Luciferase-Messung war eindeutig (Abbildung 13A und Abbildung 13B). Western Blot und GFP- bzw. Luciferase-Assay zeigten, dass p53-Expression und intrinsische Aktivität vor und nach Behandlung

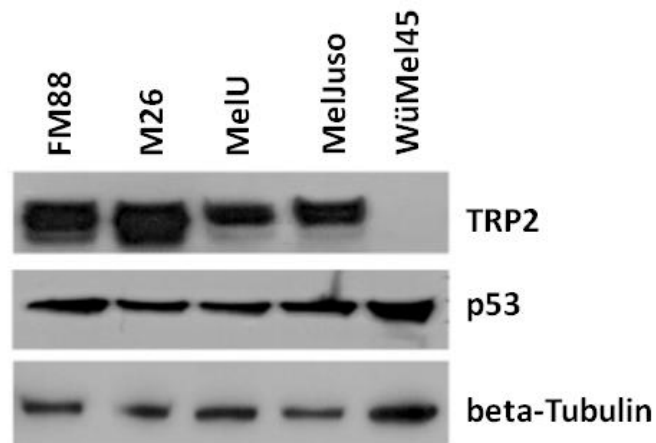
der Zellen mit Nutlin-3a nur in zwei der sechs untersuchten Melanomzelllinien korrelierten. In drei der fünf p53-wildtypischen Melanomzelllinien bestand keine eindeutige p53-Aktivität (M26, WüMel45 und WüMel49).

Welchen Einfluss eine nach Behandlung mit Nutlin-3a steigende p53-Aktivität auf den Zellzyklus hatte, zeigt Abbildung 13D. Zur Darstellung kam die Prozentzahl der Zellen, die zwei Tage nach Behandlung mit Nutlin-3a in der Zellzyklusphase S, der Synthesephase, waren. In Linien mit steigerbarer p53-Aktivität (HEM, FM88 und MelJuso) reagierte ein deutlicher Teil der Zellen mit einem Austritt aus der Synthesephase und Übergang in den Zellzyklusarrest. Die Zellen mit geringer oder ohne messbare p53-Aktivität änderten ihr Wachstumsverhalten wenig oder gar nicht (SkMel28, M26, WüMel45 und WüMel49).

### 3.3 Keine Korrelation der TRP2- und p53-Expression

In metastasierten Melanomen wird der Melanommarker *tyrosinase-related-protein 2* (TRP2) in mehr als 80 % der Fälle exprimiert (114). Eine Mitbeteiligung an der posttranslationalen Inaktivierung von p53 wird vermutet (110). Sendoel et al. zeigten im Jahr 2010 im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans*, dass sensorische Neurone das TRP2-Homolog TYR2 sekretieren und damit die Expression von p53 in Stammzellen unterdrücken (110). In einem weiteren Versuchsaufbau der Arbeitsgruppe führte die Unterdrückung von TRP2 in der Melanomzelllinie WM266-4 zum Anstieg der p53-Expression und zur Steigerung der Apoptose nach Behandlung der Zellen mit dem Zytostatikum Cisplatin.

Während p53 in allen fünf untersuchten Melanomzelllinien (FM88, M26, MelU, MelJuso, WüMel45) nachweisbar war, konnte TRP2 in vier der fünf Linien detektiert werden. WüMel45 exprimierte TRP2 nicht (siehe Abbildung 14).

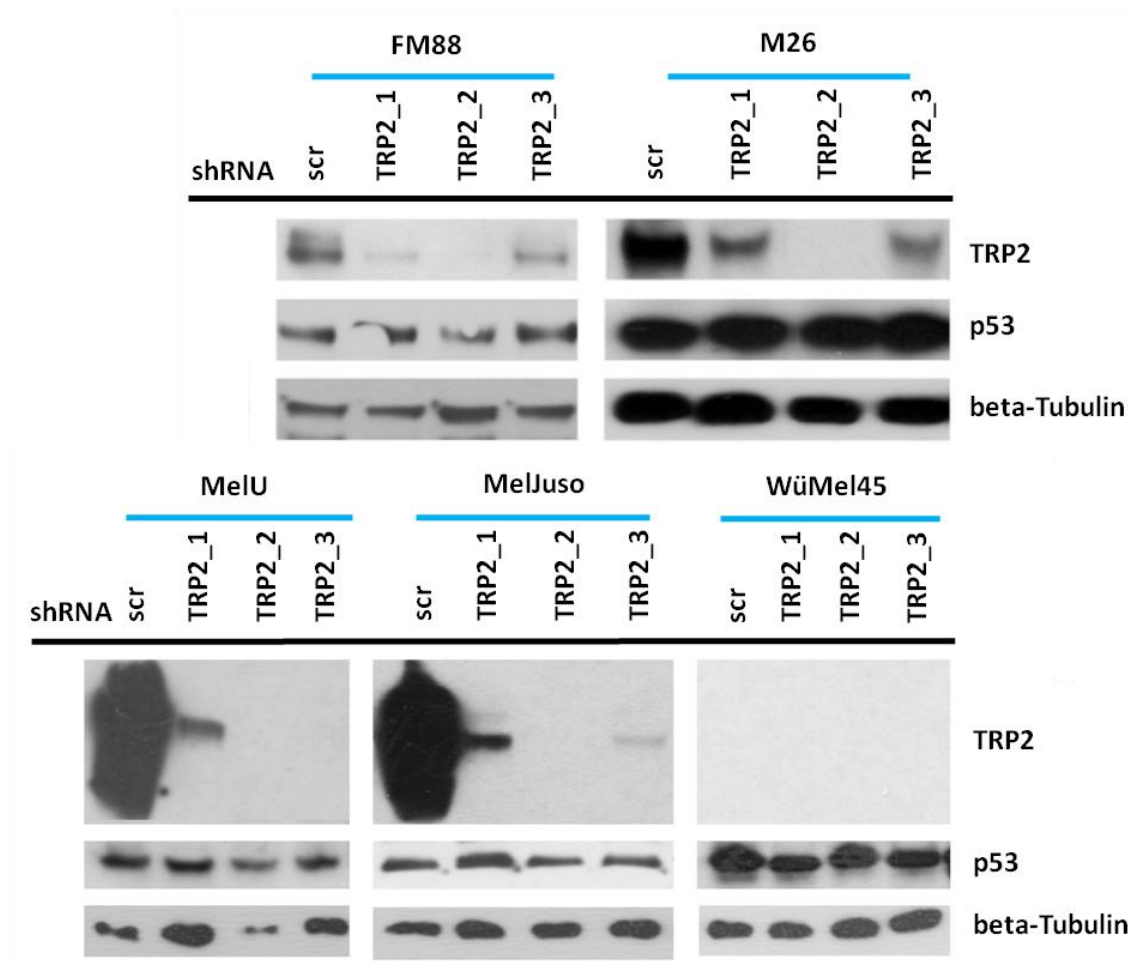


**Abbildung 14: Keine Korrelation der TRP2- und p53-Expression.**

Darstellung der TRP2- und p53-Expression in fünf Melanomzelllinien mittels Western Blot. Ladekontrolle mittels beta-Tubulin.

### 3.3.1 Kein Anstieg der p53-Expression nach TRP2-Knockdown

Nachfolgende Untersuchungen zeigten die Auswirkungen spezifischer TRP2-shRNAs auf die p53- und TRP2-Expression (siehe Abbildung 15). Wie bereits in Abbildung 14 zu sehen war, war TRP2 in der Zelllinie WüMel45 nicht detektierbar. Unter dem Einfluss der drei TRP2-shRNAs waren dementsprechend keine Veränderungen des TRP2-Expressionsniveaus zu erkennen. In den anderen vier Zelllinien (FM88, M26, MeU, MelJuso) unterdrückten die drei TRP2-shRNAs (TRP2\_1, TRP2\_2, TRP2\_3) die Produktion des Proteins TRP2 deutlich. Im Vergleich der drei shRNA-Konstrukte schien die shRNA TRP2\_2 ihr Zielprotein besonders effektiv zu supprimieren. Abbildung 15 zeigt jedoch, dass die Unterdrückung von TRP2 bei keiner der vier TRP2-exprimierenden Zelllinien eine darstellbare Auswirkung auf die p53-Expression hatte.

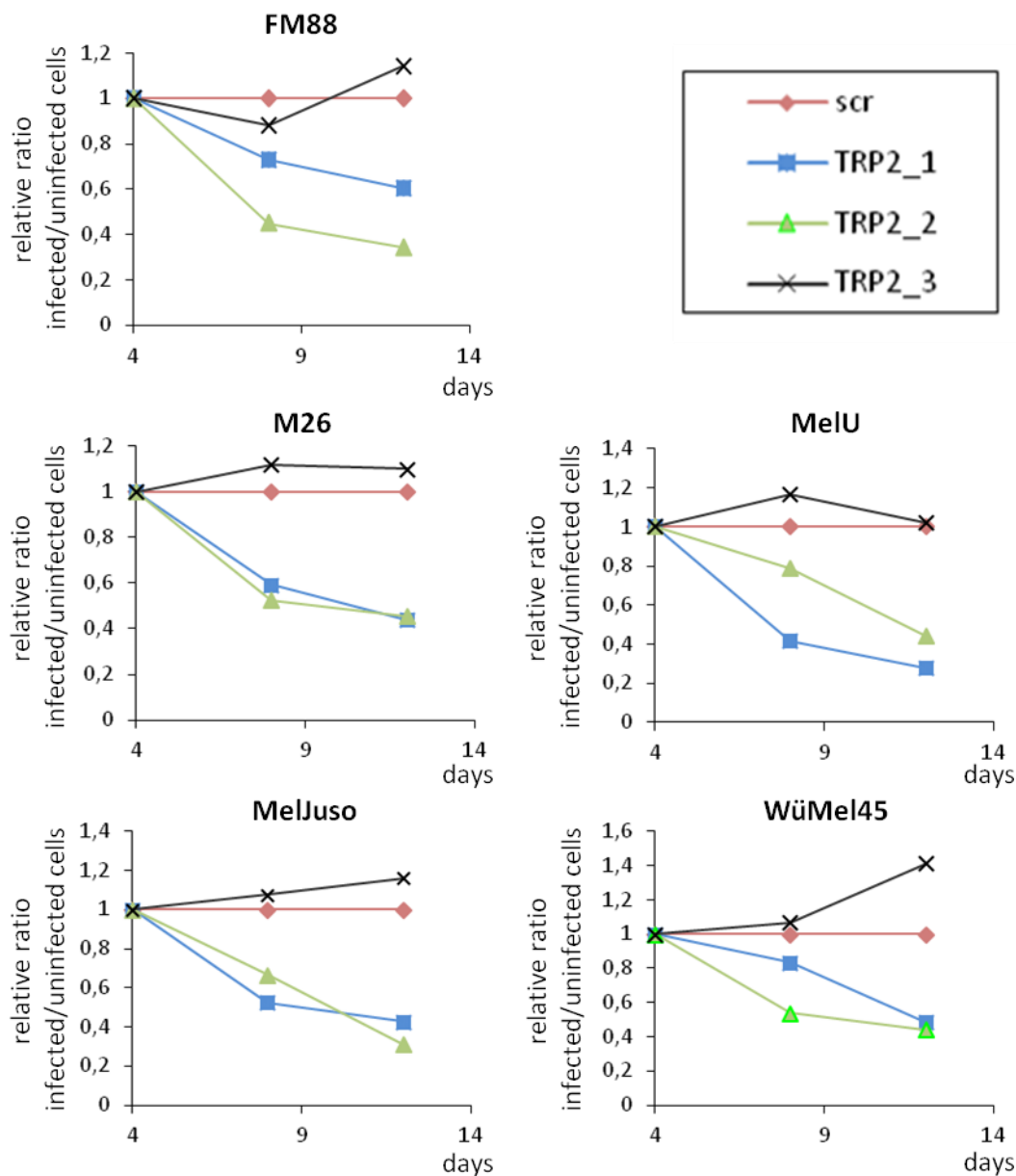


**Abbildung 15: Kein Anstieg der p53-Expression nach TRP2-Knockdown.**

Darstellung der Expression von TRP2 und p53 vor und nach TRP2-Knockdown durch drei verschiedene shRNA-Konstrukte (TRP2\_1, \_2, \_3). Lysatgewinnung vier Tage nach Transduktion der Zellen. Ladekontrolle mittels beta-Tubulin.

### 3.3.2 Wachstumshemmung unter dem Einfluss von TRP2\_1 und TRP2\_2 in fünf Melanomzelllinien

Um den Einfluss der TRP2-Expression auf den Melanomzellzyklus beurteilen zu können, wurden fünf Melanomzelllinien hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens an Tag 4, 8 und 12 nach Unterdrückung der TRP2-Expression untersucht (siehe Abbildung 16). Dazu wurden infizierte Zellen einer Linie, die den lentiviralen Vektor KH1 trugen, mit nicht infizierten Zellen derselben Linie ins Mischungsverhältnis 4:1 (80 % infizierte Zellen zu 20 % nicht infizierten Zellen) gebracht. Der Vektor KH1 enthielt die Sequenzen scr oder eine von drei Sequenzen für das Protein TRP2 (TRP2\_1, TRP2\_2, TRP2\_3) (siehe Kap. 2.2.3.3 Proliferationsassay).



**Abbildung 16: Wachstumshemmung unter dem Einfluss von TRP2\_1 und TRP2\_2 in fünf Melanomzelllinien.**

Proliferationsassay von fünf Melanomzelllinien nach Unterdrückung der TRP2-Expression durch shRNA-Konstrukte. Die Melanomzelllinien enthalten das lentivirale shRNA-Expressionskonstrukt KH1 mit entweder einer scrambled- oder einer TRP2-Sequenz (TRP2\_1, \_2, \_3). Die Zellen wurden über mehrere Tage kultiviert und die GFP-Fluoreszenz an den Tagen 4, 8 und 12 mittels Durchflusszytometrie gemessen.

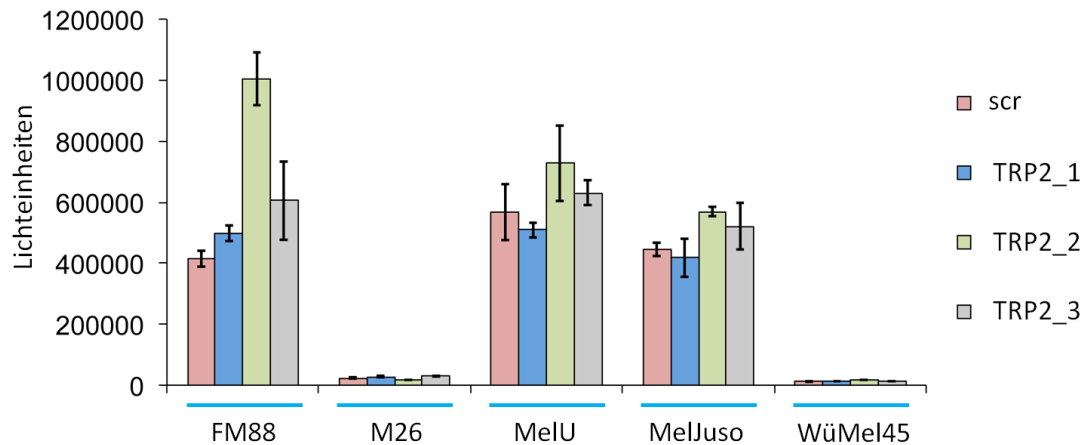
Die *Mixed-Cell-Culture-Assays* der fünf untersuchten Melanomzelllinien (FM88, M26, MelU, MelJuso und WüMel45) zeigten, dass es unter dem Einfluss von TRP2\_1 und TRP2\_2 zu einer Wachstumshemmung der infizierten Zellen der jeweiligen Zelllinie kam. Nach Infektion der Zellen mit der shRNA TRP2\_3 wurde in FM88 zwischen Tag 4

und Tag 8 eine Wachstumshemmung und danach eine Wachstumssteigerung der infizierten Zellen beobachtet, in den Zelllinien M26 und MeU kam es zunächst zur Wachstumssteigerung bis zum Tag 8 und danach zu einem Rückgang des Wachstums der infizierten Zellen. Die Zelllinien MeJuso und WüMel45 reagierten mit einer kontinuierlichen Wachstumssteigerung der infizierten Zellen auf die shRNA TRP2\_3.

Alle drei shRNA-Konstrukte erreichten in der Voruntersuchung eine gute Unterdrückung der TRP2-Expression (siehe Abbildung 15). Allerdings schien der Knockdown unter TRP2\_2 am stärksten und unter TRP2\_3 stärker als unter TRP2\_1 zu sein. Obwohl die Zelllinie WüMel45 kein TRP2 zu exprimieren schien (siehe Abbildung 15), war in der Wachstumsanalyse unter dem Einfluss aller drei shRNAs ein Effekt des TRP2-Knockdowns auf das Wachstumsverhalten der Zellen zu beobachten.

### **3.3.3 Moderater Anstieg der p53-Aktivität bei einer von drei TRP2-shRNAs**

Im Zusammenhang mit der oben dargestellten Wachstumshemmung stellte sich die Frage nach dem möglichen Einfluss von TRP2 auf die p53-Aktivität. Dazu wurde die TRP2-Expression wiederum mit shRNAs (TRP2\_1, TRP2\_2, TRP2\_3) unterdrückt, zur Messung der p53-Aktivität das bereits beschriebene Reporterkonstrukt pGreenFire™ (siehe Kap. 2.1.7) verwendet und die durchschnittliche p53-abhängige GFP-Expression mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Wie bereits gezeigt wurde, bewirkten alle TRP2-shRNAs (TRP2\_1, \_2, \_3) eine effektive Unterdrückung der p53-Expression (siehe Abbildung 15). TRP2\_2 erreichte hierbei den stärksten Knockdown.



**Abbildung 17: Moderater Anstieg der p53-Aktivität bei einer von drei TRP2-shRNAs.**

Darstellung der transkriptionellen p53-Aktivität nach Behandlung der pGreenFire™-tragenden Zellen mit dem lentiviralen Vektor KH1. Dieser enthielt entweder eine Sequenz, die gegen TRP2 (TRP2\_1, \_2, \_3) gerichtet war oder eine scrambled-Sequenz (scr). Die Fluoreszenzintensitäten wurden mittels Durchflusszytometrie an Tag vier nach Infektion der Zellen mit dem KH1-Vektor gemessen werden. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$ Standardabweichung) von drei unabhängigen Experimenten. Abb. nach Houben et al. 2014 (137).

Die Zelllinien FM88, MelJuso und MelU wiesen p53-Reporterexpression auf (siehe Abbildung 17). Die p53-Aktivität der drei genannten Zelllinien stieg unter dem Einfluss der shRNAs TRP2\_2 im Vergleich zur scr-Kontrolle an. Die shRNAs TRP2\_1 und TRP2\_3 zeigten dagegen keinen Einfluss auf die Reporterexpression.

In den Melanomzelllinien M26 und WüMel45 lag, wie bereits im Vorfeld gezeigt wurde (siehe Abbildung 12 und Abbildung 13), keine p53-Reporterexpression vor. WüMel45 besaß außerdem keine messbare TRP2-Expression (siehe Abbildung 14 und Abbildung 15). Die Zelllinie M26 reagierte marginal auf den TRP-Knockdown jedoch ohne eine starke Hochregulierung der p53-Aktivität. Auch die Zelllinie WüMel45 zeigte einen geringen Anstieg der p53-Reporterexpression, am ehesten als Antwort auf die Expression der shRNAs.

Insgesamt sprachen die verschiedenen Zelllinien (FM88, M26, MelU, MelJuso, WüMel45) inkongruent auf den TRP-Knockdown an. Besonders deutlich war der



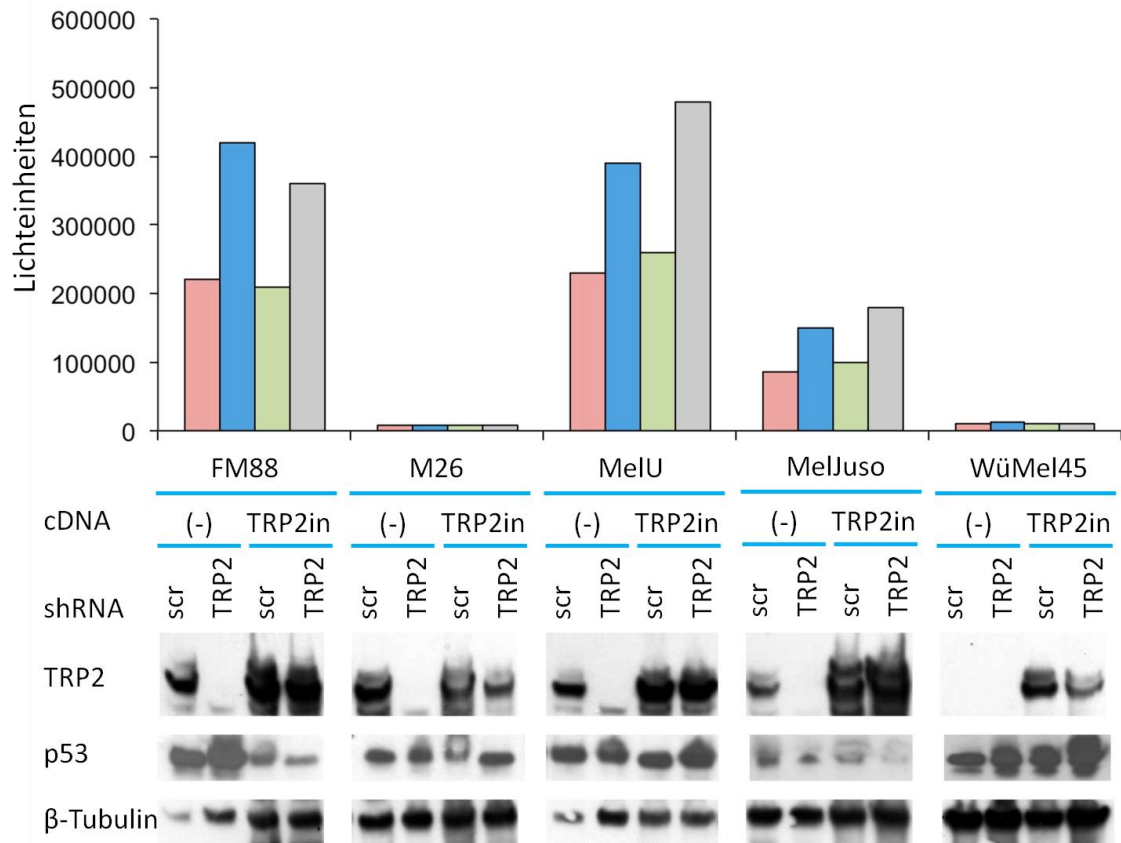
Anstieg der p53-Reporteraktivität unter dem Einfluss der shRNA TRP2\_2. Daher wurde diese für die Folgeversuche verwendet.

#### **3.3.4 Einfluss von TRP2-shRNAs auf p53-Aktivität ist unabhängig von der TRP2-Expression**

Es ist bekannt, dass es bei der Verwendung von shRNAs zu ungezielten und unerwünschten Effekten auf die infizierten Zellen, den sogenannten *off-target*-Effekten, kommen kann (134). Um zu verifizieren, ob es sich bei shRNA-Effekten um spezifische, durch den Knockdown vermittelte Effekte handelt, wird üblicherweise ein sogenanntes *Rescue*-Experiment durchgeführt, bei dem überprüft wird, ob durch ektope Expression einer shRNA-insensitiven Variante der Ziel-mRNA der Effekt revertiert werden kann (131).

Die fünf untersuchten Melanomzelllinien (FM88, M26, MelU, MelJuso, WüMel45) enthielten das p53-Reporter-Konstrukt pGreenFire™ und den KH1-Vektor. Der lentivirale KH1-Vektor enthielt jeweils eine scrambled- oder die TRP2\_2-shRNA-Sequenz. Die shRNA TRP2\_2 zeigte in den oben dargestellten Voruntersuchungen die vergleichsweise stärkste TRP2-Expressionshemmung (siehe Abbildung 15) und die deutlichste p53-Reporterexpression in FM88, MelU und MelJuso (siehe Abbildung 17). Die Zellen wurden dann zusätzlich mit dem Vektor pIH, der eine mRNA zur ektope Expression von TRP2 enthielt und deren shRNA-Bindungsstellen durch sechs stille Mutationen verändert wurden (pIH-TRP2insense, kurz TRP2in), transduziert (siehe Kap. 2.1.7).

Abbildung 18 zeigt im oberen Teil die Messung der p53-Aktivität mittels Durchflusszytometrie. Im unteren Teil sind Western Blots dargestellt, welche die Expression von TRP2 und p53 visualisieren. Als Ladekontrolle diente beta-Tubulin.



**Abbildung 18: Einfluss von TRP2-shRNAs auf p53-Aktivität ist unabhängig von der TRP2-Expression.** Die dargestellten Zellen enthielten das p53-Reporter-Konstrukt pGreenFire™ und den KH1-Vektor mit jeweils einer scrambled- oder der TRP2\_2-shRNA-Sequenz. Lysatgewinnung für den Western Blot an Tag vier nach Infektion der Zellen mit pH-TRP2insense (TRP2in), Ladekontrolle mittels beta-Tubulin. Normierung der durchschnittlichen GFP-Fluoreszenzmesswerte jeder Zelllinie mittels der durch real-time PCR ermittelten relativen Anzahl der inkorporierten Reportervektoren. Abb. nach Houben et al. 2014 (137).

Die shRNA TRP2\_2 unterdrückte die TRP2-Expression gut (siehe Abbildung 15). Nach Infektion des Expressionskonstrukts TRP2in wurde das Protein TRP2 wieder exprimiert. Dies belegte die Unempfindlichkeit der ektope TRP2-mRNA auf die TRP2-shRNA. Die p53-Expression blieb vom TRP2-Knockdown und der -Reexpression weitgehend unbeeinflusst.

Die in den Zelllinien FM88, MelU und MelJuso unter Einfluss von TRP2\_2 beobachtete p53-Reporter-Expression (siehe Abbildung 17) konnte durch die Reexpression von TRP2 nicht umgekehrt werden. Auch in der TRP2-negativen Linie WüMel45 führte die ektope TRP2-Expression nicht zu einer verminderten p53-Expression oder -Aktivität.

### 4 Diskussion

Sendoel et al. zeigten 2010, dass die Unterdrückung von TRP2 in der Melanomzelllinie WM266-4 zum Anstieg der p53-Expression und nach Behandlung der Zellen mit dem Zytostatikum Cisplatin zur Steigerung der Apoptose führte (110). Basierend auf dieser Beobachtung stellte vorliegende Arbeit die Frage, ob es im Melanom unter dem Einfluss von TRP2 zur Inaktivierung des häufig wildtypisch vorliegenden p53 kommt. Könnte dieser Mechanismus nachgewiesen werden, wäre die Reaktivierung von wildtypischem p53 durch Hemmung von TRP2 ein attraktiver Ansatzpunkt für die Tumorthherapie. Daher wurden in vorliegender Arbeit die Expression und Aktivität von p53 und der Einfluss von TRP2 auf diese Vorgänge näher untersucht. Wie vorliegende Arbeit zeigen konnte, nimmt TRP2 keinen regulatorischen Einfluss auf p53, weshalb es sich als therapeutische Zielstruktur in diesem Zusammenhang nicht eignet.

#### 4.1 Aktuelle Therapieoptionen beim fortgeschrittenen Melanom, Therapieentscheidung und –limitationen

In den letzten Jahren hat sich die Melanomtherapie rasant weiterentwickelt. Lag das mediane Überleben von Patienten im Melanom Stadium IV zu Zeiten der konventionellen Chemotherapien bis Ende der 2000er Jahre noch bei 7-9 Monaten (144) und die 5-Jahres-Überlebensrate bei 5-10 %, erreichen die aktuell verfügbaren Therapieoptionen deutlich bessere Ergebnisse. Das 5-Jahres-Überleben nach Therapie mit dem CTLA-4-Inhibitor Ipilimumab wird mit 20 % angegeben (145). Die 1-Jahres-Überlebensrate von Patienten bei Einsatz von kombinierter BRAF-MEK-Inhibition oder Immun-Checkpoint-Inhibition als Erstlinientherapie liegen bei 74,5 % beziehungsweise 71,9 % (146, 147). Ergebnisse zum Langzeitüberleben stehen für beide Therapieoptionen aus. Ebenso bleibt unklar, wie die beste sequentielle Therapiefolge aussehen sollte.

Trotz der enormen Fortschritte bleibt das Melanom im Stadium IV eine nur selten heilbare Erkrankung. Dies liegt unter anderem an der Ausbildung von Resistenzen, die beispielsweise die Kombinationstherapie mit BRAF- und MEK-Inhibitoren zeitlich limitieren (123, 124). Die Ansprechrate auf die Immun-Checkpoint-Inhibitoren

Nivolumab und Pembrolizumab liegt bei ca. 40 % (125-127). Unter Inkaufnahme schwerer, teils lebensbedrohlicher Nebenwirkungen erreicht die duale Immun-Checkpoint-Blockade mit Ipilimumab in Kombination mit Nivolumab eine Ansprechrates von etwa 56 % (128). Die Ansprechraten und Überlebenskurven aller bisher zugelassenen Therapien zeigen jedoch, dass bei weitem nicht jedem Patienten geholfen werden kann.

### 4.2 p53 als Ansatzpunkt für eine spezifische Melanomtherapie

#### 4.2.1 Stellenwert von p53 in der Melanomforschung und -therapie

Im klinischen Alltag etablieren sich Mutationsanalysen der am häufigsten mutierten Gene (z.B. *BRAF*, *NRAS*) oder des gesamten Tumorgenoms zunehmend als Standard (93, 94). Die Sequenzanalysen dienen dazu, therapierbare Zielstrukturen zu identifizieren, um durch die individuelle Auswahl geeigneter Medikamente das Outcome der Patienten mit einem metastasierten Melanom zu verbessern (148). Den Erkenntnissen einer groß angelegten Studie aus dem Jahr 2015 zufolge liegen p53-Mutationen in drei der vier definierten Hauptgruppen vor: 10 % p53-Mutationen in *BRAF*-, 20 % in *RAS*- und 30 % in *NF1*-mutierten Melanomen (95). In *triple-wild-type* Melanomen hingegen sind MDM2-Amplifikationen häufiger. *TP53*-Mutationen treten häufiger in Melanomen UV-exponierter Areale auf, in denen die Mutationslast insgesamt höher ist (95). Eine erhöhte Mutationslast bedeutet eine theoretisch höhere Anzahl therapeutisch angreifbarer Zielstrukturen. Jedoch konnte für keine der vier Gruppen ein signifikanter Überlebensvorteil gezeigt werden (95). Eine große Herausforderung in der Tumorthherapie ist aktuell die Einordnung der Erkenntnisse, die aus der Sequenzierung gewonnen werden, und deren Übertragung auf Therapieentscheidungen.

Als therapierbare Zielstrukturen in der Zelle gelten Proteine, die aufgrund ihrer Struktur in der Lage sind, mit einer chemischen Verbindung zu interagieren (149). Dies trifft beispielsweise auf das Produkt des mutierten Driver-Gens *BRAFV600E* zu, das unter anderem mit dem *small-molecule* Vemurafenib gehemmt werden kann (150). Das Protein p53, ob wildtypisch oder mutiert vorliegend, galt lange Zeit als therapeutisch nicht nutzbar, weil die notwendige Schlüssel-Schloss-Konstellation zwischen dem

Protein und einem entsprechenden Medikament nicht gefunden werden konnte (151). Die Einbindung von p53 als Tumorsuppressor und Transkriptionsfaktor in zahlreiche Prozesse in der Zelle, verkompliziert die Entwicklung einer Therapiestrategie. Folglich wurde das Augenmerk auf die Regulatoren von p53 gelegt. Zu ihnen gehört z.B. MDM2, über dessen Stellenwert für die Reaktivierung von wildtypischem und mutiertem p53 nachfolgend ausführlich diskutiert werden soll. Wie vorliegende Arbeit zeigt, nimmt TRP2 keinen regulatorischen Einfluss auf p53, weshalb es sich als therapeutische Zielstruktur in diesem Zusammenhang nicht eignet.

Ob die Ermittlung des p53-Mutationstatus in Melanomen zukünftig eine höhere Relevanz gewinnt, hängt von der Entwicklung therapeutischer Möglichkeiten ab. Das Verständnis der molekularen Mechanismen der p53-Inaktivierung in wildtypischen Melanomen ist essentiell, um eine Grundlage für therapeutische Ansätze zu schaffen.

### **4.2.2 Ursachen posttranslationaler Inaktivierung von p53 im Melanom**

In vorliegender Arbeit wurden sieben Melanomzelllinien mit wildtypischem p53 (FM88, M26, MelJuso, WüMel45, WüMel74a, WüMel48, WüMel49) und SkMel28 als Linie mit einer inaktivierenden p53-Mutation bezüglich ihrer p53-Expression und -Aktivität untersucht. Es konnte *in vitro* in allen untersuchten Melanomzelllinien gezeigt werden, dass p53 unabhängig vom p53-Mutationsstatus exprimiert wird.

Von der p53-Expression ließen sich allerdings nur bedingt Rückschlüsse auf dessen Aktivität ziehen. In der mutierten Zelllinie SkMel28 war p53 erwartungsgemäß inaktiv. Aber auch in drei wildtypischen Zelllinien (M26, WüMel45 und WüMel49) fehlte eine messbare p53-Reporteraktivität. Diese Beobachtung könnte erklären, warum die Zellen ein so hohes Niveau von exprimiertem p53 tolerieren, ohne den programmierten Zelltod einzuleiten. p53 ist zwar vorhanden aber nicht aktiv.

Mögliche Ursache für die Inaktivität von exprimiertem p53 ist die direkte Interaktion anderer Proteine mit p53 oder posttranslationale Modifikationen, welche die transkriptionelle Aktivität von p53 beeinflussen. Lu et al. zeigten im Jahr 2013 für das Protein iASPP (inhibitor of apoptosis-stimulating protein of p53) im Melanom, dass es durch einen Cyclin B1/CDK1-Protein-Komplex phosphoryliert wird. Die Phosphory-

lierung von iASPP führt zur Inhibierung der iASPP-Dimerisation und somit zu einem verstärkten Übertritt von iASPP-Monomeren in den Zellkern. Dort inhibieren die iASPP-Monomere p53 (107). In mehreren Arbeiten wurde beschrieben, dass p53 durch Expression von p53-Familienmitgliedern wie z.B. p63 und dem N-terminal trunkeierten  $\Delta Np73$  unterdrückt wird (104-106). Gartner et al. identifizierten 2013 eine Mutation im Onkogen *Bcl2L12*, die zu dessen erhöhter Expression führte. Das Protein wiederum bindet p53 und bewirkt die Inhibierung von dessen transkriptioneller Aktivität (152). Im Jahr 2005 wurde beschrieben, dass p53 unter dem Einfluss von YB-1 seine Fähigkeit zur Einleitung des programmierten Zelltods verliert (109). Mechanismen der posttranslationalen Modifikation von p53 sind zum Beispiel Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung und andere (111, 112). Welcher dieser Mechanismen, die zur Inaktivierung von p53 führen, beim Melanom dominiert, ist bisher noch nicht bekannt. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um die Einordnung deren therapeutischer Relevanz zu klären.

### **4.2.3 Wirkung endogener p53-Aktivität auf die Melanomzelle**

Vier in dieser Arbeit untersuchte wildtypische Melanomzelllinien (FM88, MelJuso, WüMel48, WüMel74a) wiesen ebenso wie humane epidermale Melanozyten (HEM) eine relativ hohe p53-Reportergergenaktivität auf. Diese konnte als eindeutig p53-vermittelt identifiziert werden, da sie nach Unterdrückung von p53 mittels einer spezifischen shRNA deutlich zurückging. Die Zelllinien WüMel48 und WüMel74a zeigten trotz vergleichbar niedriger p53-Expression eine deutliche p53-spezifische Reportergergenaktivität. Bemerkenswerterweise schien exprimiertes und aktives p53 in den Zellen aber weder das Wachstum der Melanomzellen zu inhibieren noch den programmierten Zelltod einzuleiten. Dies zeigte sich in einem prozentual relativ hohen Anteil von Zellen in der Synthesephase des Zellzyklus.

Terzian et al. zeigten 2010 in einem präklinischen Tumormodell an Mäusen, dass ein hohes endogenes Expressionsniveau von p53 vor der Progression vom Nävus zum Melanom und vor Metastasenbildung schützt (22). Mäuse wiederum, die kein p53 exprimierten, hatten eine deutliche Neigung zur Entwicklung eines Melanoms (22, 100,

101). Eine mögliche Erklärung, warum in melanozytären Zellen viel p53 vorliegt, wäre, dass die Pigmentzellen gerade unter UV-Stress in der Haut überleben und Melanin zum Schutz produzieren müssen. Ohne diese Widerstandsfähigkeit der Zelle könnte p53 seine Schlüsselrolle in der Regulation der Melaninsynthese nicht einnehmen (102). In Fortsetzung dieses Gedankens könnte *in vivo* gar ein gewisser Grad an p53-Aktivität für das Überleben von Melanozyten notwendig sein (22). Mehrere Arbeiten beschrieben die Ausbildung einer Art Toleranz gegenüber p53 in melanozytären Zellen, die auch in Melanomzellen erhalten bleibt (96-98).

#### **4.2.4 Erhöhung der p53-Aktivität als therapeutischer Ansatzpunkt**

In vorliegender Arbeit wurde gezeigt, dass Melanomzelllinien trotz wildtypisch vorliegendem und aktivem p53 weiterwachsen können. Es stellt sich folglich die Frage, ob die p53-Aktivität in Melanozyten und Melanomzellen einen bestimmten Grenzwert überschreiten muss, damit die wachstumshemmende Funktion von p53 zum Tragen kommt.

Die Auswirkung einer Erhöhung der bestehenden p53-Aktivität auf die Melanomzelllinien konnte in der Zellzyklusanalyse gezeigt werden. Zur Erhöhung der p53-Expression und -Aktivität wurden die Zellen mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin-3a behandelt. In den Zellen ohne oder mit gering messbarer p53-Aktivität (SkMel28, M26, WüMel45, WüMel49) führte die Behandlung mit Nutlin-3a nach 72 h zu keiner detektierbaren Veränderung der p53-Expression und -Aktivität. MDM2 reguliert bekanntermaßen den Abbau von p53 in der Zelle und hat damit direkte Auswirkungen auf die p53-Expression (71-73). In Zellen, in denen p53 inaktiv war, führte die Behandlung mit dem MDM2-Inhibitor Nutlin-3a jedoch nicht wie erwartet zu einem Anstieg der p53-Expression. Eine denkbare Erklärung wäre, dass diese Zellen wenig oder kein MDM2 exprimieren. Die mangelnde oder fehlende MDM2-Expression könnte wiederum mit dem engen autoregulatorischen Mechanismus der MDM2-Expression durch aktives p53 zusammenhängen (77).

Die Zelllinien mit messbarer p53-Aktivität (HEM, FM88, MelJuso) reagierten auf die Behandlung mit einem moderaten Anstieg ihrer p53-Expression und -Aktivität. In der

Zellzyklusanalyse resultierte die Aktivitätssteigerung in einem Austritt der Zellen aus der Synthesephase und Übergang in den Zellzyklusarrest.

Vassilev et al. untersuchten 2004, wie die p53-MDM2-Interaktion inhibiert werden könnte, um die Zelle über eine p53-Aktivitätssteigerung in Seneszenz oder Apoptose zu führen. Sie behandelten weiße Mäuse, die eine Xenografttransplantation mit der Osteosarkom-Zelllinie SJS-A-1 (*Tp53-wt*) erhalten hatten, über 20 Tage oral mit Nutlin-3. Die Behandlung führte zu einer teilweisen Inhibierung des Tumorwachstums bei guter Verträglichkeit (143). In der Arbeit von Terzian et al. aus dem Jahr 2010 wurden Melanomzellen einmalig mit unterschiedlichen Dosen Nutlin-3a behandelt und die Auswirkung auf den Zellzyklus nach 72 h gemessen (22). Es konnte gezeigt werden, dass eine Nutlin-3a-Konzentration von  $< 20 \mu\text{M}$  vor allem Zellzyklusarrest induzieren kann und dass der Großteil der Melanomzellen erst ab einer Nutlin-3a-Konzentration von  $> 20 \mu\text{M}$  in die Apoptose übergeht. Die Zellen in vorliegender Arbeit wurden mit Nutlin-3a in einer Konzentration von 10 mM behandelt. Dies führte zum Austritt der Zelllinien HEM, FM88, MelJuso aus der Synthesephase. Eine Wachstumshemmung, wie sie von Terzian et al. beschrieben wurde, konnte bestätigt werden.

Zur Behandlung der *triple-wild-type* Melanome kommt eine Kombinationstherapie mit BRAF-MEK-Inhibition nicht in Frage (95), weshalb insbesondere für diese Melanome Substanzen der Gruppe der MDM2-Inhibitoren wie HDM 201, AMG 232 und Nutlin-3 von Interesse sein könnten. Auch *BRAF*-, *RAS*- und *NF1*-mutierte Melanome mit wildtypischem p53 könnten von einer derartigen Behandlung profitieren (153-155).

Furet et al. berichteten 2016 über den Wirkstoff HDM 201, der nach Substanzen wie beispielsweise Nutlin-3 der zweiten Generation der MDM2-Inhibitoren zugeordnet wird (156). Inzwischen wird die Substanz im Rahmen einer Phase I Studie, die sich in der Rekrutierungsphase befindet, erprobt (NCT02143635). Ergebnisse liegen bisher nicht vor.

Zahlreiche Arbeitsgruppen weltweit legen aktuell das Augenmerk auf die Erforschung synergistischer Effekte von bereits bestehenden Therapieoptionen (z.B. BRAF-MEK-Inhibition) mit der Reaktivierung der p53-Funktion durch Hemmung von MDM2 (157).



In einer aktuellen Phase 1b/2a Studie wird die Sicherheit, Verträglichkeit, Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und Wirksamkeit einer Kombination des MDM2-Inhibitors AMG 232 mit den BRAF-MEK-Inhibitoren Dabrafenib und Trametinib beim metastasierten Melanom durchgeführt (NCT02110355). Auch zu dieser Studie wurden bisher keine Ergebnisse veröffentlicht. Eine klinische Studie zur Erprobung des als toxisch geltenden Nutlin-3 bei Melanomen oder anderen soliden Tumoren am Menschen findet aktuell nicht statt (103).

Smalley et al. setzten 2007 den organometallischen Glykogen-Synthase-Kinase-3beta-Inhibitor DW1/2 in Melanomzellen ein. Auch DW1/2 löste ähnlich wie Nutlin-3 eine p53-Aktivitätssteigerung und eine Zunahme der Apoptoserate aus (158). Bisher gibt es keine Veröffentlichung zur Übertragung dieser Erkenntnisse auf das Tiermodell oder auf den Menschen.

### **4.3 TRP2 reguliert p53 in Melanomzellen nicht**

Sollte der regulatorische Zusammenhang zwischen TRP2 und p53 in Melanomen weit verbreitet sein, wäre TRP2 ein gutes Zielprotein für einen therapeutischen Einsatz, das sehr viel Melanom spezifischer wäre als beispielsweise das oben diskutierte MDM2.

Im Vorfeld dieser Arbeit wurden in der Arbeitsgruppe um Houben und Kollegen 172 Melanomgewebe immunhistochemisch untersucht. In diesen Versuchen konnte kein Zusammenhang zwischen der TRP2- und p53-Expression dargestellt werden (137). In vorliegender Arbeit wurde diese Beobachtung für fünf untersuchte Melanomzelllinien bestätigt. Vier der fünf Zelllinien (FM88, M26, MelU und MelJuso) mit Ausnahme von WüMel45 exprimierten TRP2. Es bestand aber keine Korrelation zwischen der Expression von TRP2 und p53, das in allen fünf Linien nachgewiesen wurde.

Die Unterdrückung der TRP2-Expression mit den drei TRP2-shRNAs (TRP2\_1, TRP2\_2, TRP2\_3) gelang gut. Anders als in der Publikation von Sendoel et al. (110) bewirkte die Unterdrückung von TRP2 aber keine im Western Blot darstellbare Expressionssteigerung von p53. Im Proliferationsassay konnte eine Wachstumsinhibition in den Zellen nur unter dem Einfluss der shRNAs TRP2\_1 und TRP2\_2 gezeigt werden. Bemerkenswerterweise zeigten die Linien M26 und WüMel45 einen ähnlich starken Rückgang der

vitalen Zellen ohne vorher messbare p53-Aktivität und ohne messbare p53-Aktivitätssteigerung nach Unterdrückung der TRP2-Expression. Sogar auf WüMel45, der einzigen der fünf Linien, bei der keine TRP2-Expression nachweisbar war, führte die Transduktion der Zellen mit den TRP2-shRNAs TRP2\_1 und TRP2\_2 zu einem Rückgang der vitalen Zellen. Dies wurde als starkes Indiz für *off-target*-Effekte gewertet.

Der GFP-Assay zur Quantifizierung der p53-Aktivität lieferte keine konsistenten Ergebnisse. Die p53-Reporterexpression der Zelllinien FM88, MelJuso und MelU stieg unter dem Einfluss der shRNAs TRP2\_2 im Vergleich zur scr-Kontrolle an. Die shRNAs TRP2\_1 und TRP2\_3 zeigten dagegen keinen Einfluss auf die Reporterexpression. Obwohl die Zelllinie WüMel45 keine TRP2-Expression zeigte, verändert sich die p53-Reporterexpression unter dem Einfluss der TRP2-shRNAs geringfügig.

Um die uneinheitlichen Auswirkungen der unterschiedlichen shRNAs zu erklären und den fehlenden regulatorischen Zusammenhang zwischen TRP2 und p53 zu beweisen, wurde ein Umkehr-Experiment durchgeführt, für das die Zellen zusätzlich mit dem Expressions-Vektor pIH-TRP2insense (kurz TRP2in) transduziert wurden. Die p53-Expression blieb vom TRP2-Knockdown und der TRP2-Reexpression weitgehend unbeeinflusst. Die in den Zelllinien FM88, MelU und MelJuso unter Einfluss von TRP2\_2 beobachtete p53-Aktivitätssteigerung konnte durch die Reexpression von TRP2 nicht umgekehrt werden. Auch in der TRP2-negativen Linie WüMel45 führte die ektopische TRP2-Expression nicht zu einer verminderten p53-Expression oder -Aktivität.

Ein regulatorischer Einfluss von TRP2 auf p53 konnte nicht gezeigt werden. Das inkongruente Ansprechen der Zellen auf die unterschiedlichen TRP2-shRNAs und insbesondere die Ergebnisse der TRP2-Reexpression weisen darauf hin, dass es sich bei den teilweise beobachteten Effekten auf die p53-Aktivität nicht um TRP2-vermittelte sondern um *off-target*-Effekte handelt. Bei mehreren Melanomzelllinien zeigt sich außerdem, dass trotz eines guten TRP2-Knockdowns durch die TRP2-shRNAs TRP2\_1 und TRP2\_3 keine Effekte auf die p53-Expression und -Aktivität beobachtet werden konnten und dass die p53-Repression durch TRP2 kein häufiger Mechanismus beim Melanom ist. TRP2 scheint daher kein therapeutisch geeignetes Angriffsziel zur Erhöhung der p53-Aktivität zu sein.

Sendoel et al. machten 2010 ihre Beobachtungen zur Regulation von p53 durch TRP2 am Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* und einer einzelnen Melanomzelllinie (WM226-4) (110). Die Zelllinie WM226-4 wurde in vorliegender Arbeit nicht untersucht. Für die sechs verwendeten Zelllinien (FM88, M26, MelU, MelJuso, WüeMel45) die gestellte Hypothese nicht bestätigt werden konnte. Möglicherweise beobachteten Sendoel et al. ebenfalls unspezifische Effekte, die einen regulatorischen Zusammenhang zwischen TRP2 und p53 suggerierten. Bisher wurden keine weiteren, in der Zahl der untersuchten Melanomzelllinien größer angelegten Untersuchungen zur Erforschung des fraglichen regulatorischen Zusammenhangs zwischen p53 und TRP2 veröffentlicht.

#### **4.4 *Off-target*-Effekte und Einfluss der Zellkultur**

Neben Transkriptionsfaktoren macht die RNA-Interferenz einen bedeutenden Teil der natürlichen Genregulation in Zellen aus. Durch die Produktion von siRNAs (small interfering RNA) und miRNAs (microRNA) kann die Zelle auf transkriptioneller und translationaler Ebene eigene und fremde, virale Gene an- und abschalten (159, 160). In vorliegender Arbeit wurden unterschiedliche Gene durch künstliche RNA-Interferenz reguliert. Mittels Transfektion wurden Vektoren in die Zellen eingeschleust, die für shRNAs (small hairpin RNA) kodierten, welche wiederum ihre jeweiligen Zielstrukturen abschalteten.

In mehreren Veröffentlichungen wurde beschrieben, dass das Gen-Silencing, sei es natürlich oder künstlich, nicht hochspezifisch ist (159-163). Durch siRNAs und miRNAs können eine Reihe von Genprodukten reguliert werden, auch wenn deren Sequenz nicht vollständig mit der der siRNA oder miRNA übereinstimmt. Die unbeabsichtigten Auswirkungen auf die Genexpression bei dem experimentellen Einsatz von siRNAs und shRNAs nennt man *off-target*-Effekte. In vergleichenden Untersuchungen von siRNAs und shRNAs mit identischer Nucleotidsequenz wurde beobachtet, dass sich teils analoge *off-target*-Effekte reproduzieren ließen (134). Außerdem wurde in zwei Veröffentlichungen gezeigt, dass shRNAs Sequenz-spezifisch das Wachstumsverhalten der Zellen negativ beeinflussen und es verstärkt zu Apoptose kommt (164, 165).

Eine lange Kulturzeit von Zellen mit mehreren Kulturpassagen kann einen großen Einfluss auf die Genexpression und folglich auf die Ergebnisse haben (166, 167). Nichtsdestotrotz lieferten die Daten der Zellkultur in vorliegender Arbeit gute und vergleichbare Ergebnisse. Dies konnte auch im Vergleich zu immunhistochemischen Untersuchungen, die parallel zu dieser Arbeit in derselben Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, bestätigt werden (137).

### **4.5 Möglichkeiten und Limitationen der verwendeten Methoden**

#### **4.5.1 Western Blot**

Der Western Blot ist eine semiquantitative Methode, die den relativen Vergleich der Bandenintensität zwischen den Proben ermöglicht. Ungenauigkeiten können u.a. beim Beladen des Gels mit den Proben auftreten (168). Die in vorliegender Arbeit dargestellten Ladekontrollen legen nahe, dass trotz sorgfältiger Durchführung bei der Messung der Proteinkonzentration und beim Beladen der Gele mit den Lysaten nicht immer gleich viel Protein in jeder Probe vorlag. Die Ladekontrollen werden bei der Beurteilung der Ergebnisse berücksichtigt.

Die verwendeten Antikörper zur Detektion des Proteins unterliegen ihrerseits Qualitätsschwankungen z.B. durch Mehrfachanwendung und detektieren das Zielantigen unterschiedlich spezifisch. Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Antikörper zum Nachweis von TRP2 getestet. Für alle abgebildeten Ergebnisse wurde derselbe, als spezifisch getestete Antikörper verwendet.

Diese und weitere Einschränkungen der Methode, wie z.B. Übertragungsunterschiede der Proteine während des Blottens, erschweren den Vergleich zwischen den untersuchten Zelllinien sowohl innerhalb einer Untersuchung als auch zwischen zwei Western Blots (168).

#### **4.5.2 GFP- und Luciferase-Assay**

Reportergen-Assays zeichnen sich durch ihre hohe Sensitivität und Spezifität und durch die gute Übertragbarkeit der Ergebnisse aus (169). In vorliegender Arbeit wurden

Daten mittels GFP- und Luciferase-Assay erhoben. Aufgrund intrinsischer Fluoreszenz in den Zielzellen wird Hintergrundsignal erzeugt, das den Einsatz des GFP-Assays limitiert und seine Sensitivität im Vergleich zum Luciferase-Assay erniedrigt. Außerdem hängt die Aussagekraft der Ergebnisse beider Verfahren von einer erfolgreichen Transduktion der Zielzellen mit dem Reporter gen und der mittels Antibiotika-Resistenz selektionierten Zellen ab. Die Stabilität der Transduktionsraten wurde jeweils in der Durchflusszytometrie überprüft. In vorliegender Arbeit lieferten beide Methoden durchweg gute und konsistente Ergebnisse.

### **4.5.3 Zellzyklusanalyse**

Die Zellzyklusmessungen in vorliegender Arbeit wurden mittels Propidiumiodid durchgeführt. Bei diesem Verfahren werden lebende von toten Zellen unterschieden und anhand ihres DNA-Gehalts in die Zellzyklusphasen eingeteilt. Ein Vorteil der Methode ist die Durchführung an fixierten Zellen, die gesammelt und zu einem späteren Zeitpunkt gemessen werden können. Ein anderes interessantes Verfahren zur Quantifizierung der apoptotischen Zellen ist der Annexin-V-Assay. Seine Stärke liegt in der Detektion früh-apoptotischer und apoptotischer Zellen. Er untersucht die Membranintegrität der Zellen, weshalb nicht-fixierte Zellen verwendet werden (170). Beide Methoden gelten als zuverlässig.

Es wurden für vorliegende Arbeit sechs Melanomzelllinien mit Nutlin-3a behandelt und die Auswirkung einer Erhöhung der p53-Aktivität auf den Zellzyklus untersucht. Der Annexin-V-Assay wäre hierfür ein ebenso geeignetes Verfahren, das aber präapoptotische und apoptotische Zellen erfassen kann und je nach Fragestellung besser geeignet wäre.

### 5 Zusammenfassung

Die Therapiemöglichkeiten für Patienten im Melanom Stadium IV sind nach wie vor begrenzt und die Erkrankung nur selten heilbar. Eine mögliche Zielstruktur in der Melanomtherapie der Zukunft könnte das im Melanom häufig genetisch wildtypisch vorliegende p53 sein.

Für vorliegende Arbeit wurden humane Melanomzelllinien, welche stabil mit einem p53-Reportergenkonstrukt transduziert waren, hinsichtlich ihrer p53-Expression, -Aktivität und -Aktivierbarkeit untersucht. Alle verwendeten Melanomzelllinien exprimierten p53 unabhängig vom p53-Mutationsstatus. Drei der sieben untersuchten p53-wildtypischen Melanomzelllinien zeigten keine oder nur sehr niedrige p53-Reportergenaktivität. Die anderen vier p53-wildtypischen Zelllinien dagegen waren durch hohe, mittels p53-Knockdown unterdrückbare Reportergenexpression gekennzeichnet. Die Proliferation dieser Zellen in Gegenwart von aktivem p53 belegt, dass Melanomzellen eine hohe Toleranz gegenüber diesem Tumorsuppressor besitzen können. Eine weitere Steigerung der p53-Expression und -Aktivität durch die Hemmung von MDM2 (*mouse double minute 2*) mit der Substanz Nutlin-3a führte in den Zellen mit messbarer p53-Aktivität jedoch zu einem G1-Zellzyklusarrest. Dies belegt die prinzipielle Eignung von p53 als mögliche therapeutische Zielstruktur. Aufgrund ihrer schlechten Bioverfügbarkeit und hohen Toxizität gelten MDM2-Inhibitoren bisher aber als ungeeignet für den klinischen Einsatz.

Die Reduktion hoher therapeutischer Nebenwirkungen könnte durch eine Melanom-spezifische Reaktivierung von p53 gelingen. Eine mögliche negativ-modulierende Wirkung des Melanommarkers TRP2 (*tyrosinase-related-protein 2*) auf p53 wurde im Jahr 2010 von Sendoel et al. nach Untersuchungen am Fadenwurm *C. elegans* vorgeschlagen. TRP2 wird beim metastasierten Melanom in mehr als 80 % der Fälle exprimiert und wäre, handelte es sich beim Melanom um einen weit verbreiteten Regulationsmechanismus, ein interessantes Zielprotein, um die Aktivität von p53 zu steigern. Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass TRP2 zwar in vier von fünf Melanomzelllinien exprimiert wurde, die Unterdrückung der TRP2-Expression jedoch

weder spezifischen Einfluss auf die p53-Expression noch auf die p53-Reportergenaktivität zeigte. Auch das veränderte Wachstumsverhalten der Zellen nach Unterdrückung von TRP2 mittels drei unterschiedlicher shRNAs konnte im *Rescue*-Experiment, bei dem TRP nach seinem Knockdown ektop exprimiert wurde, keinem spezifischen Effekt von TRP2 auf die p53-Expression oder p53-Reportergenaktivität zugeordnet werden. Auch in der TRP2-negativen Zelllinie führte die ektope TRP2-Expression nicht zu einer verminderten p53-Expression oder -Aktivität. Für das im Gegensatz zu MDM2 deutlich melanomspezifischere TRP2 konnte dementsprechend kein sicherer regulatorischer Zusammenhang mit p53 dargestellt werden.

Weitere Untersuchungen müssen zeigen, welche Bedeutung wildtypischem p53 im Melanom zukommt und ob sich weitere mögliche p53-Regulatoren als therapeutische Angriffspunkte eignen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Autier P, Koehlin A, Boniol M. Prediction of numbers of melanoma deaths by 2050. *European Journal of Cancer*. 2017;72:S123-S4.
2. Gesellschaft RK-IHud, der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) B. Krebs in Deutschland 2011/2012. 2015; 10. Ausgabe
3. Karimkhani C, Green AC, Nijsten T, Weinstock MA, Dellavalle RP, Naghavi M, et al. The Global Burden of Melanoma: Results from Global Burden of Disease Study 2015. *The British journal of dermatology*. 2017.
4. Society AC. *Cancer Facts & Figures 2013*. 2013.
5. Miller AJ, Mihm MC. Melanoma. *New England Journal of Medicine*. 2006;355(1):51-65.
6. Balch CM, Gershenwald JE, Soong SJ, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(36):6199-206.
7. Voss RK, Woods TN, Cromwell KD, Nelson KC, Cormier JN. Improving outcomes in patients with melanoma: strategies to ensure an early diagnosis. *Patient related outcome measures*. 2015;6:229-42.
8. Friedman RJ, Rigel DS, Kopf AW. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA: a cancer journal for clinicians*. 1985;35(3):130-51.
9. Jerant AF, Johnson JT, Sheridan CD, Caffrey TJ. Early detection and treatment of skin cancer. *American family physician*. 2000;62(2):357-68, 75-6, 81-2.
10. Vogelstein B KK. *The Genetic Basis of Human Cancer*. 2002.
11. Anand P, Kunnumakara A, Sundaram C, Harikumar K, Tharakan S, Lai O, et al. Cancer is a Preventable Disease that Requires Major Lifestyle Changes. *Pharm Res*. 2008;25(9):2097-116.
12. Mayer V, Ebbesen P. Persistent viral infections in human carcinogenesis. *European journal of cancer prevention : the official journal of the European Cancer Prevention Organisation (ECP)*. 1994;3(1):5-14.
13. Tripp MK, Watson M, Balk SJ, Swetter SM, Gershenwald JE. State of the science on prevention and screening to reduce melanoma incidence and mortality: The time is now. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2016.
14. Armstrong BK, Kricger A. How much melanoma is caused by sun exposure? *Melanoma research*. 1993;3(6):395-401.
15. Thompson JF, Scolyer RA, Kefford RF. Cutaneous melanoma. *Lancet*. 2005;365(9460):687-701.
16. Gilchrest BA, Eller MS, Geller AC, Yaar M. The Pathogenesis of Melanoma Induced by Ultraviolet Radiation. *New England Journal of Medicine*. 1999;340(17):1341-8.
17. Dong L, Wen J, Pier E, Zhang X, Zhang B, Dong F, et al. Melanocyte-stimulating hormone directly enhances UV-Induced DNA repair in keratinocytes by a xeroderma pigmentosum group A-dependent mechanism. *Cancer Res*. 2010;70(9):3547-56.



18. Abdel-Malek ZA, Ruwe A, Kavanagh-Starner R, Kadekaro AL, Swope V, Haskell-Luevano C, et al. alpha-MSH tripeptide analogs activate the melanocortin 1 receptor and reduce UV-induced DNA damage in human melanocytes. *Pigment cell & melanoma research*. 2009;22(5):635-44.
19. Kennedy C, ter Huurne J, Berkhout M, Gruis N, Bastiaens M, Bergman W, et al. Melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants are associated with an increased risk for cutaneous melanoma which is largely independent of skin type and hair color. *The Journal of investigative dermatology*. 2001;117(2):294-300.
20. D'Orazio JA, Nobuhisa T, Cui R, Arya M, Spry M, Wakamatsu K, et al. Topical drug rescue strategy and skin protection based on the role of Mc1r in UV-induced tanning. *Nature*. 2006;443(7109):340-4.
21. Braig M, Schmitt CA. Oncogene-Induced Senescence: Putting the Brakes on Tumor Development. *Cancer Research*. 2006;66(6):2881-4.
22. Terzian T, Torchia EC, Dai D, Robinson SE, Murao K, Stiegmann RA, et al. p53 prevents progression of nevi to melanoma predominantly through cell cycle regulation. *Pigment cell & melanoma research*. 2010;23(6):781-94.
23. Clark WH, Jr., Elder DE, Guerry Dt, Epstein MN, Greene MH, Van Horn M. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human pathology*. 1984;15(12):1147-65.
24. Welsh CF, Roovers K, Villanueva J, Liu Y, Schwartz MA, Assoian RK. Timing of cyclin D1 expression within G1 phase is controlled by Rho. *Nature cell biology*. 2001;3(11):950-7.
25. Brunet A, Roux D, Lenormand P, Dowd S, Keyse S, Pouyssegur J. Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *The EMBO journal*. 1999;18(3):664-74.
26. Lin AW, Barradas M, Stone JC, van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes & development*. 1998;12(19):3008-19.
27. Goel VK, Lazar AJ, Warneke CL, Redston MS, Haluska FG. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *The Journal of investigative dermatology*. 2006;126(1):154-60.
28. Albino AP, Nanus DM, Mentle IR, Cordon-Cardo C, McNutt NS, Bressler J, et al. Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype. *Oncogene*. 1989;4(11):1363-74.
29. Davies H, Bignell GR, Cox C, Stephens P, Edkins S, Clegg S, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002;417(6892):949-54.
30. Omholt K, Platz A, Kanter L, Ringborg U, Hansson J. NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2003;9(17):6483-8.
31. Pollock PM, Harper UL, Hansen KS, Yudt LM, Stark M, Robbins CM, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nature genetics*. 2003;33(1):19-20.

32. Schadendorf D, Fisher DE, Garbe C, Gershenwald JE, Grob JJ, Halpern A, et al. Melanoma. *Nature reviews Disease primers*. 2015;1:15003.
33. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science (New York, NY)*. 1994;264(5157):436-40.
34. Nobori T, Miura K, Wu DJ, Lois A, Takabayashi K, Carson DA. Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers. *Nature*. 1994;368(6473):753-6.
35. Sharpless E, Chin L. The INK4a/ARF locus and melanoma. *Oncogene*. 2003;22(20):3092-8.
36. Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois NJ, Silverman A, Alland L, Chin L, et al. The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell*. 1998;92(6):713-23.
37. Harris SL, Levine AJ. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*. 2005;24(17):2899-908.
38. Flores JF, Walker GJ, Glendening JM, Haluska FG, Castresana JS, Rubio MP, et al. Loss of the p16INK4a and p15INK4b genes, as well as neighboring 9p21 markers, in sporadic melanoma. *Cancer Res*. 1996;56(21):5023-32.
39. Wu H, Goel V, Haluska FG. PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene*. 2003;22(20):3113-22.
40. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science (New York, NY)*. 1997;275(5308):1943-7.
41. Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nature genetics*. 1997;15(4):356-62.
42. Nishimura EK, Granter SR, Fisher DE. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche. *Science (New York, NY)*. 2005;307(5710):720-4.
43. Widlund HR, Fisher DE. Microphthalmia-associated transcription factor: a critical regulator of pigment cell development and survival. *Oncogene*. 2003;22(20):3035-41.
44. Garraway LA, Widlund HR, Rubin MA, Getz G, Berger AJ, Ramaswamy S, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma. *Nature*. 2005;436(7047):117-22.
45. Qi J, Chen N, Wang J, Siu CH. Transendothelial migration of melanoma cells involves N-cadherin-mediated adhesion and activation of the beta-catenin signaling pathway. *Molecular biology of the cell*. 2005;16(9):4386-97.
46. Danen EH, Ten Berge PJ, Van Muijen GN, Van 't Hof-Grootenboer AE, Bocker EB, Ruiter DJ. Emergence of alpha 5 beta 1 fibronectin- and alpha v beta 3 vitronectin-receptor expression in melanocytic tumour progression. *Histopathology*. 1994;24(3):249-56.
47. Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nature reviews Cancer*. 2016;16(6):345-58.

48. Shain AH, Bastian BC. The Genetic Evolution of Melanoma. *The New England journal of medicine*. 2016;374(10):995-6.
49. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 1979;278(5701):261-3.
50. Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*. 1979;17(1):43-52.
51. McBride OW, Merry D, Givol D. The gene for human p53 cellular tumor antigen is located on chromosome 17 short arm (17p13). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1986;83(1):130-4.
52. Green DR, Chipuk JE. p53 and metabolism: Inside the TIGAR. *Cell*. 2006;126(1):30-2.
53. Soussi T, Beroud C. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nature reviews Cancer*. 2001;1(3):233-40.
54. Kern SE, Kinzler KW, Bruskin A, Jarosz D, Friedman P, Prives C, et al. Identification of p53 as a sequence-specific DNA-binding protein. *Science (New York, NY)*. 1991;252(5013):1708-11.
55. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*. 1992;358(6381):15-6.
57. Batinac T, Gruber F, Lipozencic J, Zamolo-Koncar G, Stasic A, Brajac I. Protein p53--structure, function, and possible therapeutic implications. *Acta dermatovenerologica Croatica : ADC*. 2003;11(4):225-30.
58. Wei J, Zaika E, Zaika A. p53 Family: Role of Protein Isoforms in Human Cancer. *Journal of nucleic acids*. 2012;2012:687359.
59. Lu H, Levine AJ. Human TAFII31 protein is a transcriptional coactivator of the p53 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(11):5154-8.
60. van Oijen MG, Slootweg PJ. Gain-of-function mutations in the tumor suppressor gene p53. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;6(6):2138-45.
61. Ou HD, Lohr F, Vogel V, Mantele W, Dotsch V. Structural evolution of C-terminal domains in the p53 family. *The EMBO journal*. 2007;26(14):3463-73.
62. Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich NP. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science (New York, NY)*. 1995;267(5203):1498-502.
63. Shaulsky G, Goldfinger N, Ben-Ze'ev A, Rotter V. Nuclear accumulation of p53 protein is mediated by several nuclear localization signals and plays a role in tumorigenesis. *Molecular and cellular biology*. 1990;10(12):6565-77.
64. Harms KL, Chen X. The C terminus of p53 family proteins is a cell fate determinant. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(5):2014-30.
65. Friedler A, Veprintsev DB, Freund SM, von Glos KI, Fersht AR. Modulation of binding of DNA to the C-terminal domain of p53 by acetylation. *Structure (London, England : 1993)*. 2005;13(4):629-36.
66. Oren M. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(51):36031-4.

67. Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000;408(6810):307-10.
68. Vousden KH. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochimica et biophysica acta*. 2002;1602(1):47-59.
69. Han ES, Muller FL, Perez VI, Qi W, Liang H, Xi L, et al. The in vivo gene expression signature of oxidative stress. *Physiological genomics*. 2008;34(1):112-26.
70. Efeyan A, Serrano M. p53: guardian of the genome and policeman of the oncogenes. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2007;6(9):1006-10.
71. Blagosklonny MV. Loss of function and p53 protein stabilization. *Oncogene*. 1997;15(16):1889-93.
72. Behuliak M, Celec P, Gardlik R, Palffy R. Ubiquitin--the kiss of death goes Nobel. Will you be quitting? *Bratislavske lekarske listy*. 2005;106(3):93-100.
73. Sherr CJ. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2001;2(10):731-7.
74. Appella E, Anderson CW. Post-translational modifications and activation of p53 by genotoxic stresses. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2001;268(10):2764-72.
75. Sherr CJ. Divorcing ARF and p53: an unsettled case. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(9):663-73.
76. Hamard PJ, Manfredi JJ. Mdm2's dilemma: to degrade or to translate p53? *Cancer cell*. 2012;21(1):3-5.
77. Mayo LD, Dixon JE, Durden DL, Tonks NK, Donner DB. PTEN protects p53 from Mdm2 and sensitizes cancer cells to chemotherapy. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(7):5484-9.
78. Hock AK, Vigneron AM, Carter S, Ludwig RL, Vousden KH. Regulation of p53 stability and function by the deubiquitinating enzyme USP42. *The EMBO journal*. 2011;30(24):4921-30.
79. Livengood JA, Scoggin KE, Van Orden K, McBryant SJ, Edayathumangalam RS, Laybourn PJ, et al. p53 Transcriptional activity is mediated through the SRC1-interacting domain of CBP/p300. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(11):9054-61.
80. Bergamaschi D, Samuels Y, O'Neil NJ, Trigiante G, Crook T, Hsieh JK, et al. iASPP oncoprotein is a key inhibitor of p53 conserved from worm to human. *Nature genetics*. 2003;33(2):162-7.
81. Bergamaschi D, Samuels Y, Jin B, Duraisingham S, Crook T, Lu X. ASPP1 and ASPP2: common activators of p53 family members. *Molecular and cellular biology*. 2004;24(3):1341-50.
82. Gartel AL, Radhakrishnan SK. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res*. 2005;65(10):3980-5.
83. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993;74(4):609-19.
84. Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(8):594-604.

85. Roemer K. Mutant p53: gain-of-function oncoproteins and wild-type p53 inactivators. *Biological chemistry*. 1999;380(7-8):879-87.
86. Ahmed AA, Etemadmoghadam D, Temple J, Lynch AG, Riad M, Sharma R, et al. Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. *The Journal of pathology*. 2010;221(1):49-56.
87. Albino AP, Vidal MJ, McNutt NS, Shea CR, Prieto VG, Nanus DM, et al. Mutation and expression of the p53 gene in human malignant melanoma. *Melanoma research*. 1994;4(1):35-45.
88. Castresana JS, Rubio MP, Vazquez JJ, Idoate M, Sober AJ, Seizinger BR, et al. Lack of allelic deletion and point mutation as mechanisms of p53 activation in human malignant melanoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1993;55(4):562-5.
89. Daniotti M, Oggionni M, Ranzani T, Vallacchi V, Campi V, Di Stasi D, et al. BRAF alterations are associated with complex mutational profiles in malignant melanoma. *Oncogene*. 2004;23(35):5968-77.
90. Ragnarsson-Olding BK, Karsberg S, Platz A, Ringborg UK. Mutations in the TP53 gene in human malignant melanomas derived from sun-exposed skin and unexposed mucosal membranes. *Melanoma research*. 2002;12(5):453-63.
91. Zerp SF, van Elsas A, Peltenburg LT, Schrier PI. p53 mutations in human cutaneous melanoma correlate with sun exposure but are not always involved in melanomagenesis. *British journal of cancer*. 1999;79(5-6):921-6.
92. Papp T, Jafari M, Schiffmann D. Lack of p53 mutations and loss of heterozygosity in non-cultured human melanocytic lesions. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 1996;122(9):541-8.
93. Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, Arold ST, Imielinski M, Theurillat JP, et al. A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*. 2012;150(2):251-63.
94. Curtin JA, Fridlyand J, Kageshita T, Patel HN, Busam KJ, Kutzner H, et al. Distinct sets of genetic alterations in melanoma. *The New England journal of medicine*. 2005;353(20):2135-47.
95. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*. 2015;161(7):1681-96.
96. Morales-Ducret CR, van de Rijn M, Smoller BR. bcl-2 expression in melanocytic nevi. Insights into the biology of dermal maturation. *Archives of dermatology*. 1995;131(8):915-8.
97. Klein-Parker HA, Warshawski L, Tron VA. Melanocytes in human skin express bcl-2 protein. *Journal of cutaneous pathology*. 1994;21(4):297-301.
98. Plettenberg A, Ballaun C, Pammer J, Mildner M, Strunk D, Weninger W, et al. Human melanocytes and melanoma cells constitutively express the Bcl-2 proto-oncogene in situ and in cell culture. *The American journal of pathology*. 1995;146(3):651-9.
99. Soengas MS, Lowe SW. Apoptosis and melanoma chemoresistance. *Oncogene*. 2003;22(20):3138-51.
100. Bardeesy N, Bastian BC, Hezel A, Pinkel D, DePinho RA, Chin L. Dual inactivation of RB and p53 pathways in RAS-induced melanomas. *Molecular and cellular biology*. 2001;21(6):2144-53.

101. Goel VK, Ibrahim N, Jiang G, Singhal M, Fee S, Flotte T, et al. Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. *Oncogene*. 2009;28(23):2289-98.
102. Box NF, Terzian T. The role of p53 in pigmentation, tanning and melanoma. *Pigment cell & melanoma research*. 2008;21(5):525-33.
103. Gembarska A, Luciani F, Fedele C, Russell EA, Dewaele M, Villar S, et al. MDM4 is a key therapeutic target in cutaneous melanoma. *Nature medicine*. 2012;18(8):1239-47.
104. Grob TJ, Novak U, Maise C, Barcaroli D, Luthi AU, Pirnia F, et al. Human delta Np73 regulates a dominant negative feedback loop for TAp73 and p53. *Cell death and differentiation*. 2001;8(12):1213-23.
105. Tuve S, Wagner SN, Schittek B, Putzer BM. Alterations of DeltaTA-p 73 splice transcripts during melanoma development and progression. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2004;108(1):162-6.
106. Matin RN, Chikh A, Chong SL, Mesher D, Graf M, Sanza P, et al. p63 is an alternative p53 repressor in melanoma that confers chemoresistance and a poor prognosis. *The Journal of experimental medicine*. 2013;210(3):581-603.
107. Lu M, Breysens H, Salter V, Zhong S, Hu Y, Baer C, et al. Restoring p53 function in human melanoma cells by inhibiting MDM2 and cyclin B1/CDK1-phosphorylated nuclear iASPP. *Cancer cell*. 2013;23(5):618-33.
108. Nikolaev AY, Li M, Puskas N, Qin J, Gu W. Parc: a cytoplasmic anchor for p53. *Cell*. 2003;112(1):29-40.
109. Homer C, Knight DA, Hananeia L, Sheard P, Risk J, Lasham A, et al. Y-box factor YB1 controls p53 apoptotic function. *Oncogene*. 2005;24(56):8314-25.
110. Sendoel A, Kohler I, Fellmann C, Lowe SW, Hengartner MO. HIF-1 antagonizes p53-mediated apoptosis through a secreted neuronal tyrosinase. *Nature*. 2010;465(7298):577-83.
111. Kruse JP, Gu W. Modes of p53 regulation. *Cell*. 2009;137(4):609-22.
112. Tang Y, Luo J, Zhang W, Gu W. Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. *Molecular cell*. 2006;24(6):827-39.
113. Satyamoorthy K, Chehab NH, Waterman MJ, Lien MC, El-Deiry WS, Herlyn M, et al. Aberrant regulation and function of wild-type p53 in radioresistant melanoma cells. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research*. 2000;11(9):467-74.
114. Takeuchi H, Kuo C, Morton DL, Wang HJ, Hoon DS. Expression of differentiation melanoma-associated antigen genes is associated with favorable disease outcome in advanced-stage melanomas. *Cancer Res*. 2003;63(2):441-8.
115. del Marmol V, Beermann F. Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS letters*. 1996;381(3):165-8.
116. Jackson IJ, Chambers DM, Tsukamoto K, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, et al. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, maps to and is mutated at the mouse slaty locus. *The EMBO journal*. 1992;11(2):527-35.

117. Yoon WJ, Kim MJ, Moon JY, Kang HJ, Kim GO, Lee NH, et al. Effect of palmitoleic acid on melanogenic protein expression in murine b16 melanoma. *Journal of oleo science*. 2010;59(6):315-9.
118. Jiao Z, Zhang ZG, Hornyak TJ, Hozeska A, Zhang RL, Wang Y, et al. Dopachrome tautomerase (Dct) regulates neural progenitor cell proliferation. *Developmental biology*. 2006;296(2):396-408.
119. Olivares C, Jimenez-Cervantes C, Lozano JA, Solano F, Garcia-Borron JC. The 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) oxidase activity of human tyrosinase. *The Biochemical journal*. 2001;354(Pt 1):131-9.
120. Pak BJ, Lee J, Thai BL, Fuchs SY, Shaked Y, Ronai Z, et al. Radiation resistance of human melanoma analysed by retroviral insertional mutagenesis reveals a possible role for dopachrome tautomerase. *Oncogene*. 2004;23(1):30-8.
121. Tsukamoto K, Jackson IJ, Urabe K, Montague PM, Hearing VJ. A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPACHROME tautomerase. *The EMBO journal*. 1992;11(2):519-26.
122. Chu W, Pak BJ, Bani MR, Kapoor M, Lu SJ, Tamir A, et al. Tyrosinase-related protein 2 as a mediator of melanoma specific resistance to cis-diamminedichloroplatinum(II): therapeutic implications. *Oncogene*. 2000;19(3):395-402.
123. Aplin AE, Kaplan FM, Shao Y. Mechanisms of resistance to RAF inhibitors in melanoma. *The Journal of investigative dermatology*. 2011;131(9):1817-20.
124. Amaral T, Sinnberg T, Meier F, Krepler C, Levesque M, Niessner H, et al. MAPK pathway in melanoma part II-secondary and adaptive resistance mechanisms to BRAF inhibition. *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)*. 2017;73:93-101.
125. Brahmer JR, Tykodi SS, Chow LQ, Hwu WJ, Topalian SL, Hwu P, et al. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *The New England journal of medicine*. 2012;366(26):2455-65.
126. Topalian SL, Sznol M, McDermott DF, Kluger HM, Carvajal RD, Sharfman WH, et al. Survival, Durable Tumor Remission, and Long-Term Safety in Patients With Advanced Melanoma Receiving Nivolumab. *Journal of Clinical Oncology*. 2014;32(10):1020-30.
127. Robert C, Ribas A, Wolchok JD, Hodi FS, Hamid O, Kefford R, et al. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet*. 2014;384(9948):1109-17.
128. Hodi FS, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann KF, McDermott DF, et al. Combined nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab alone in patients with advanced melanoma: 2-year overall survival outcomes in a multicentre, randomised, controlled, phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2016;17(11):1558-68.
129. Lee JT, Herlyn M. MEK'ing the most of p53 reactivation therapy in melanoma. *The Journal of investigative dermatology*. 2012;132(2):263-5.
130. Verhaegen M, Bauer JA, Martin de la Vega C, Wang G, Wolter KG, Brenner JC, et al. A novel BH3 mimetic reveals a mitogen-activated protein kinase-dependent mechanism of melanoma cell death controlled by p53 and reactive oxygen species. *Cancer Res*. 2006;66(23):11348-59.

131. Houben R, Adam C, Baeurle A, Hesbacher S, Grimm J, Angermeyer S, et al. An intact retinoblastoma protein-binding site in Merkel cell polyomavirus large T antigen is required for promoting growth of Merkel cell carcinoma cells. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2012;130(4):847-56.
132. Kuss AW, Knodel M, Berberich-Siebelt F, Lindemann D, Schimpl A, Berberich I. A1 expression is stimulated by CD40 in B cells and rescues WEHI 231 cells from anti-IgM-induced cell death. *European journal of immunology*. 1999;29(10):3077-88.
133. Grosveld GC, Shewmaker CK, Jat P, Flavell RA. Localization of DNA sequences necessary for transcription of the rabbit beta-globin gene in vitro. *Cell*. 1981;25(1):215-26.
134. Jackson AL, Burchard J, Schelter J, Chau BN, Cleary M, Lim L, et al. Widespread siRNA "off-target" transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity. *RNA (New York, NY)*. 2006;12(7):1179-87.
135. Muthusamy V, Hobbs C, Nogueira C, Cordon-Cardo C, McKee PH, Chin L, et al. Amplification of CDK4 and MDM2 in malignant melanoma. *Genes, chromosomes & cancer*. 2006;45(5):447-54.
136. Houben R, Hesbacher S, Schmid CP, Kauczok CS, Flohr U, Haferkamp S, et al. High-level expression of wild-type p53 in melanoma cells is frequently associated with inactivity in p53 reporter gene assays. *PloS one*. 2011;6(7):e22096.
137. Houben R, Schmid CP, Maier M, Wobser M, Motschenbacher S, Becker JC, et al. p53 Regulation by TRP2 Is Not Pervasive in Melanoma. *PloS one*. 2014;9(1):e87440.
138. Bruggen J, Fogh J, Sorg C. Tumor production in the nude mouse, fibrinolytic activity and cross-reactivity with antimelanoma sera of various human tumor cell lines. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 1981;102(2):141-52.
139. Zur Hausen H. Induction of specific chromosomal aberrations by adenovirus type 12 in human embryonic kidney cells. *Journal of virology*. 1967;1(6):1174-85.
140. Borst A. Untersuchungen zur Inhibition von onkogenem B-Raf und zur Reaktivierung des Tumorsuppressorproteins p53 beim malignen Melanom. Diplomarbeit Fakultät für Biologie Universität Würzburg. 2012.
141. Matrai J, Chuah MK, VandenDriessche T. Recent advances in lentiviral vector development and applications. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy*. 2010;18(3):477-90.
142. Weinkam R. Aberrante Signaltransduktion im Merkelzellkarzinom: Die Rolle der T-Antigene. Diplomarbeit Fakultät für Biologie Universität Würzburg. 2009.
143. Vassilev LT, Vu BT, Graves B, Carvajal D, Podlaski F, Filipovic Z, et al. In vivo activation of the p53 pathway by small-molecule antagonists of MDM2. *Science (New York, NY)*. 2004;303(5659):844-8.
144. Eigentler TK, Caroli UM, Radny P, Garbe C. Palliative therapy of disseminated malignant melanoma: a systematic review of 41 randomised clinical trials. *The Lancet Oncology*. 2003;4(12):748-59.
145. Schadendorf D, Hodi FS, Robert C, Weber JS, Margolin K, Hamid O, et al. Pooled Analysis of Long-Term Survival Data From Phase II and Phase III Trials of



- Ipilimumab in Unresectable or Metastatic Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*. 2015;33(17):1889-94.
146. Ugurel S, Rohmel J, Ascierto PA, Flaherty KT, Grob JJ, Hauschild A, et al. Survival of patients with advanced metastatic melanoma: The impact of novel therapies. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2016;53:125-34.
147. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Melanoms, Langversion 2.0, Februar 2016, AWMF-Register-Nummer: 032/024OL, <http://leitlinienprogrammonkologie.de/Melanom.65.0.html>, (Zugriff am: 02.04.2017).
148. Griewank KG, Schilling B. Next-Generation Sequencing to Guide Treatment of Advanced Melanoma. *American journal of clinical dermatology*. 2017.
149. Russ AP, Lampel S. The druggable genome: an update. *Drug discovery today*. 2005;10(23-24):1607-10.
150. McArthur GA, Chapman PB, Robert C, Larkin J, Haanen JB, Dummer R, et al. Safety and efficacy of vemurafenib in BRAF(V600E) and BRAF(V600K) mutation-positive melanoma (BRIM-3): extended follow-up of a phase 3, randomised, open-label study. *The Lancet Oncology*. 2014;15(3):323-32.
151. Lazo JS, Sharlow ER. Drugging Undruggable Molecular Cancer Targets. *Annual review of pharmacology and toxicology*. 2016;56:23-40.
152. Gartner JJ, Parker SC, Prickett TD, Dutton-Regester K, Stitzel ML, Lin JC, et al. Whole-genome sequencing identifies a recurrent functional synonymous mutation in melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013;110(33):13481-6.
153. Frederick DT, Salas Fragomeni RA, Schalck A, Ferreira-Neira I, Hoff T, Cooper ZA, et al. Clinical profiling of BCL-2 family members in the setting of BRAF inhibition offers a rationale for targeting de novo resistance using BH3 mimetics. *PloS one*. 2014;9(7):e101286.
154. Sun D, Li Z, Rew Y, Gribble M, Bartberger MD, Beck HP, et al. Discovery of AMG 232, a potent, selective, and orally bioavailable MDM2-p53 inhibitor in clinical development. *Journal of medicinal chemistry*. 2014;57(4):1454-72.
155. Ji Z, Kumar R, Taylor M, Rajadurai A, Marzuka-Alcala A, Chen YE, et al. Vemurafenib synergizes with nutlin-3 to deplete survivin and suppresses melanoma viability and tumor growth. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(16):4383-91.
156. Furet P, Masuya K, Kallen J, Stachyra-Valat T, Ruetz S, Guagnano V, et al. Discovery of a novel class of highly potent inhibitors of the p53-MDM2 interaction by structure-based design starting from a conformational argument. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*. 2016;26(19):4837-41.
157. Lu M, Miller P, Lu X. Restoring the tumour suppressive function of p53 as a parallel strategy in melanoma therapy. *FEBS letters*. 2014;588(16):2616-21.
158. Smalley KS, Contractor R, Haass NK, Kulp AN, Atilla-Gokcumen GE, Williams DS, et al. An organometallic protein kinase inhibitor pharmacologically activates p53 and induces apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Res*. 2007;67(1):209-17.

159. Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, et al. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature biotechnology*. 2003;21(6):635-7.
160. Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nature genetics*. 2005;37(5):495-500.
161. Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, Fesik SW. Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(11):6347-52.
162. Scacheri PC, Rozenblatt-Rosen O, Caplen NJ, Wolfsberg TG, Umayam L, Lee JC, et al. Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(7):1892-7.
163. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 2005;433(7027):769-73.
164. Rao DD, Senzer N, Cleary MA, Nemunaitis J. Comparative assessment of siRNA and shRNA off target effects: what is slowing clinical development. *Cancer gene therapy*. 2009;16(11):807-9.
165. Singh S, Narang AS, Mahato RI. Subcellular fate and off-target effects of siRNA, shRNA, and miRNA. *Pharm Res*. 2011;28(12):2996-3015.
166. Reid YA. Characterization and authentication of cancer cell lines: an overview. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2011;731:35-43.
167. Eberle J, Spangler B, Becker JC, Heinemann SH, Klein CA, Kunz M, et al. Multicentre study on standardisation of melanoma cell culture--an initiative of the German Melanoma Research Network. *Pigment cell & melanoma research*. 2010;23(2):296-8.
168. Mahmood T, Yang PC. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences*. 2012;4(9):429-34.
169. Yagi K. Applications of whole-cell bacterial sensors in biotechnology and environmental science. *Applied microbiology and biotechnology*. 2007;73(6):1251-8..
170. Moore A, Donahue CJ, Bauer KD, Mather JP. Simultaneous measurement of cell cycle and apoptotic cell death. *Methods in cell biology*. 1998;57:265-78.

## 7 Anhang

### 7.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des Aufbaus von p53. ....	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Funktion und Regulation von p53 verändert und ergänzt nach Vogelstein et al. 2000 (67) und Vousden et al. 2002 (68, 84). ....	9
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Melanin-Synthesewegs vereinfacht und ergänzt nach Olivares et al. 2001 (119). ....	12
Abbildung 4: Schematische Darstellung des pGreenFire <sup>TM</sup> -Reporterkonstrukts modifiziert und ergänzt nach pGreenFire <sup>TM</sup> Pathway Reporter Lentivectors Cat. # TR0XX Series Manual, 2012. ....	23
Abbildung 5: Schematische Darstellung des Vektors pIH vor (oben) und nach (unten) Klonierung des modifizierten TRP2-Expressionskonstrukts pIH-TRP2insense (TRP2in). ....	24
Abbildung 6: Schematische Darstellung der Durchflusszytometrie.....	32
Abbildung 7: Vereinfachte Darstellung der Zellzyklusphasen.....	32
Abbildung 8: Darstellung der Zellzyklusanalyse der Zelllinie M14 mittels Propidiumiodidfärbung.....	33
Abbildung 9: Unterscheidung und Quantifizierung von GFP-positiven und -negativen Zellen der Zelllinie M26 mittels FACS-Analyse. ....	34
Abbildung 10: Zellwachstumsanalyse der Zelllinie FM 88. ....	35
Abbildung 11: Schematische Darstellung des TRP2_1 forward Oligonukleotids.....	40
Abbildung 12: Funktionelle p53-Inaktivität in drei von sieben p53-wildtypischen Melanomzelllinien.....	48
Abbildung 13: Zellzyklusarrest durch Erhöhung intrinsischer p53-Aktivität mittels Nutlin-3a. ....	50
Abbildung 14: Keine Korrelation der TRP2- und p53-Expression.....	52
Abbildung 15: Kein Anstieg der p53-Expression nach TRP2-Knockdown. ....	53

Abbildung 16: Wachstumshemmung unter dem Einfluss von TRP2_1 und TRP2_2 in fünf Melanomzelllinien.....	54
Abbildung 17: Moderater Anstieg der p53-Aktivität bei einer von drei TRP2-shRNAs.	56
Abbildung 18: Einfluss von TRP2-shRNAs auf p53-Aktivität ist unabhängig von der TRP2-Expression.....	58

## 7.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: 5-Stufen-Modell der Melanomentwicklung adaptiert nach Clark et al. 1984 (23) und Miller et al. 2006 (5).....	4
Tabelle 2: Technische Geräte. ....	14
Tabelle 3: Verbrauchsmaterialien. ....	15
Tabelle 4: Reagenzien.....	17
Tabelle 5: Lösungen für die Vereinzelung von adhärennten Zellen in Zellkultur und für die Zellzählung. ....	18
Tabelle 6: Lösung für die Zellzyklusanalyse.....	19
Tabelle 7: Puffer und Lösung für den Luciferase-Assay. ....	19
Tabelle 8: Puffer für die Herstellung von Gesamtzelllysaten.....	19
Tabelle 9: Puffer für die eindimensionale SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese.	20
Tabelle 10: Puffer und Lösung für Western Blot. ....	20
Tabelle 11: Medien.....	21
Tabelle 12: Komplettsysteme.....	21
Tabelle 13: Vektorsysteme. ....	22
Tabelle 14: Melanomzelllinien.....	25
Tabelle 15: Andere Zelllinien. ....	25
Tabelle 16: Verdauungsenzyme. ....	26
Tabelle 17: Oligonukleotide und Primer.....	26
Tabelle 18: Primär- und Sekundärantikörper für den Western Blot.....	27
Tabelle 19: Software.....	27
Tabelle 20: Transiente Transfektion zur Generierung von lentiviralem Überstand.	29

Tabelle 21:	Transfektion und Transduktion zur Herstellung lenti- und retroviraler Vektoren und Infektion der Zielzelle. ....	30
Tabelle 22:	Pipettierschema zum Annealing von Oligonukleotiden. ....	40
Tabelle 23:	Beispiel-Pipettierschema zur Doppelrestriktion des Zielvektors KH1 mit den Restriktionsenzymen XbaI und SmaI. ....	41
Tabelle 24:	Pipettierschema zur Ligation der shRNA-Inserts in den Zielvektor KH1.	43
Tabelle 25:	Pipettierschema der PCR-Klonierung. ....	44
Tabelle 26:	PCR-Programm.....	45
Tabelle 27:	Pipettierschema der In-vitro-Mutagenese. ....	46

### 7.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung, Abbildungen
AD1, AD2	Aktivierungsdomäne
AJCC	American Joint Committee on Cancer
AK	Antikörper
AKT	Gen der Proteinkinase B
ARF	alternate reading frame
AS	Aminosäure
ASPP1, ASPP2	apoptosis stimulating protein of p53
ATM	Serin/Threonin-Proteinkinase ATM
ATP	Adenosintriphosphat
BAX	Bcl-2-associated X protein
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
bp	Basenpaar
BRAF	Gen der Serin/Threonin-Kinase B-RAF
BSA	Bovines Serumalbumin
ca.	circa
CDK	cyclin-dependent kinase, Cyclin-abhängige Kinase
CDKN2A	Gen des CDK-Inhibitor 2A
CHEK2	Checkpoint-Kinase 2
CM	complete medium, Kompletmedium
CMV, mCMV	Cytomegalievirus, minimal CMV
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CoA	Coenzym A

CT	C-terminales Ende
CTP	Cytidintriphosphat
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DCT	DOPAchrom Tautomerase
dH <sub>2</sub> O	destilliertes H <sub>2</sub> O
DHICA-Oxidase	5,6-Dihydroxyindol-2-carbonsäure-Oxidase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP Mix	Mix aus dATP, dCTP, dGTP und dTTP
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
ECL	Enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykol-bis-(2-aminoethylethyl)-tetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii, und andere
EYFP	Enhanced Yellow Fluorescence Protein
FACS	Fluorescence activated cell sorting, Durchflusszytometrie
FCS	fetal calf serum, fötales Kälberserum
G <sub>0</sub> , G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>	G-Phasen des Zellzyklus
GFP	green fluorescent protein, grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	hora, Stunde
HEM	humane, epidermale Melanozyten
iASPP	inhibitorisches ASPP
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dikaliumhydrogenphosphat
Kap.	Kapitel
KIT	Gen der Tyrosinkinase KIT
LB	lysogeny broth
MAPK	mitogen-activated protein kinase signaling pathway
MC	Melanocortin
MDM2	mouse double minute 2
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat

## 7 Anhang

MITF	microphthalmia-associated transcription factor
mRNA	messenger ribonucleic acid
NaCl	Natriumchlorid, Kochsalz
NF1	Gen der Neurofibromatose Typ 1
NRAS	Gen des G-Proteins NRAS
OD	Oligomerisierungsdomäne
p16, p19, p53 ...	Protein 16, Protein 19, Protein 53...
PBS	Phosphate Buffered Saline, Phosphatgepufferte Salzlösung
PCAF	P300/CBP-associated factor
PCR	Polymerase Chain Reaction, Polymerase-Kettenreaktion
PIP3	Phosphatidylinositoltriphosphat
PTEN	phosphatase and tensin homologue
RNA	ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute, Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roxwell Park Memorial Institute
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate, Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
shRNA	small hairpin RNA
sog.	sogenannt/e/n
S-Phase	Synthese-Phase des Zellzyklus
TAE	TRIS-Acetat/EDTA
Tbl.	Tabelle, Tabellen
TE	Trypsin/EDTA
TP53	Tumorsuppressorgen 53
TRE	Transkriptions-Response-Element
Tris, Tris base	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
TRP2	tyrosinase-related-protein 2
TTP	Thymidintriphosphat
U	Units
u.a.	unter anderem
USP7, USP42	Ubiquitin-spezifische Protease 7, Ubiquitin-spezifische Protease 42
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
VSV-G	virales Hüllprotein

wt	wild type, Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
Zeo	Zeocin-Resistenz
$\alpha$ -MSH	Melanozyten stimulierendes Hormon



### **Danksagung**

Diese Arbeit entstand unter der Leitung von Frau Prof. Dr. med. Eva-Bettina Bröcker, der emeritierten Direktorin der Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie des Universitätsklinikums Würzburg. Ich danke Frau Professor Bröcker ganz herzlich für ihre Unterstützung bei diesem Projekt sowie für die Übernahme des Erstgutachtens. Frau Prof. Dr. rer. nat. Svenja Meierjohann danke ich recht herzlich für die Übernahme des Koreferats. Herrn Prof. Dr. med. Matthias Goebeler möchte ich für die Möglichkeit, meine Arbeit in seiner Klinik anfertigen und abschließen zu können, danken.

Meinen besonderen Dank möchte ich an Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Roland Houben richten für die Möglichkeit, an diesem spannenden Thema arbeiten zu können. Ohne seine konstruktive Kritik sowie seine stetige und zuverlässige Betreuung wäre es nicht möglich gewesen, das Projekt in dieser Form abzuschließen. Ebenso danke ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Sebastian Haferkamp für seine wertvollen Anregungen und die große Unterstützung bei der Auswertung der Daten und deren Veröffentlichung.

Ein herzliches Dankeschön gilt Frau Dr. rer. nat. Sonja Hesbacher, die mich in die Abläufe und Methoden im Labor geduldig eingeführt, mich zu jedem Zeitpunkt tatkräftig praktisch und theoretisch unterstützt und durch ihre hervorragende Organisation und Dokumentation nie den Überblick verloren hat. Den Mitarbeiterinnen des Tumorbiologischen Forschungslabors Lena Neuß, Claudia Siedel und Eva-Maria Sarosi danke ich für ihre Hilfestellungen und wertvollen Ratschläge im Laboralltag.

Für die schöne, intensive und abwechslungsreiche Zeit im Labor und auf Kongressen möchte ich meinen Mitstreiterinnen und Mitstreitern Andreas, Christian, Christina, Christoph, Johannes, Larissa und Sabrina danken.

Ich danke Herrn Dr. med. Friedrich W. Amend und Ute Deichmann, die zur Förderung des weiblichen Nachwuchses in der medizinischen Wissenschaft und Forschung ihre Stiftung ins Leben gerufen haben. Meine Forschungsarbeit war in diesem Umfang nur durch die Förderung der Studienstiftung Dr. med. Friedrich W. Amend und das

## Danksagung

---

Promotionsstipendium der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg möglich. Für diese Unterstützung möchte ich mich herzlich bedanken.

Besondere Unterstützung habe ich von meiner Familie erfahren. Meiner zukünftigen Schwiegerfamilie, meinem Patenonkel und meiner Tante, meinen Brüdern und insbesondere Stefan danke ich für ihren guten Rat und ihre unermüdliche Unterstützung.

Meinen geliebten Eltern widme ich diese Arbeit. Euer Glaube an mich und Eure Fürsorge an jedem einzelnen Tag bedeuten mir alles.

## Publikationen

- Houben R, Hesbacher S, **Schmid CP**, Kauczok CS, Flohr U, Haferkamp S, et al. High-level expression of wild-type p53 in melanoma cells is frequently associated with inactivity in p53 reporter gene assays. PloS one. 2011;6(7):e22096.
- Houben R, **Schmid CP**, Maier M, Wobser M, Motschenbacher S, Becker JC, et al. p53 Regulation by TRP2 Is Not Pervasive in Melanoma. PloS one. 2014;9(1):e87440.

Würzburg, Juli 2017