

Aus dem Lehrstuhl für Dermatologie
Prof. Dr. Mark Berneburg
der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

Effekte einer konsekutiven Aktivierung des MAP-Kinase- Signalwegs in humanen Melanozyten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin

der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Larissa Joyce Mayer

2018

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Thorsten E. Reichert

1. Berichterstatter:

PD. Dr. Sebastian Haferkamp

2. Berichterstatter:

PD. Dr. Christian Pfeifer

Tag der mündlichen Prüfung:

05.04.2018

Für meine Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das maligne Melanom	1
1.1.1 Epidemiologie	1
1.1.2 Risikofaktoren der Melanomentstehung	2
1.1.3 Molekulare Mechanismen der Melanomentstehung	3
1.1.4 Alte und neue Therapieoptionen	5
1.1.5 Targeted Therapy	6
1.2 Der MAP-Kinase-Signalweg	8
1.3 Das Onkogen BRAF	10
1.3.1 Aufbau und Regulation	10
1.3.2 BRAF ^{V600E} -Mutationen im malignen Melanom	11
1.4 Das Onkogen NRAS	12
1.4.1 Aufbau und Regulation	12
1.4.2 NRAS-Mutationen im malignen Melanom	12
1.4.3 Mutationsstatus als Prognosemarker	13
1.5 Onkogen-induzierte Seneszenz	13
1.5.1 Morphologie der onkogen-induzierten Seneszenz	14
1.5.2 Auslösende Onkogene	14
1.5.3 Onkogen-induzierte Seneszenz als Schutz vor Melanomen	15
1.6 Der Tumorsuppressor p16INK4a	16
1.7 Zielsetzung dieser Arbeit	16
2. Material und Methoden	17
2.1 Material	17
2.1.1 Technische Geräte	17
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	19
2.1.3 Reagenzien	20
2.1.4 Puffer und Lösungen	21
2.1.5 Zellkulturmedien	22
2.1.6 Komplettsysteme	22
2.1.7 Größenstandards	23
2.1.8 Antikörper	23
2.1.9 Zelllinien	23

2.1.10 Software	24
2.2 Methoden	24
2.2.1 Zellbiologische Methoden	24
2.2.1.1 Zellkultur.....	24
2.2.1.2 Zellzahlbestimmung	25
2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	25
2.2.1.4 Induzieren von Seneszenz in der Zelllinie WMM1175_A4.....	26
2.2.1.5 β -Galaktosidase-Assay	26
2.2.1.6 Herstellung von lentiviralen Vektoren und Infektion der Zielzelle.....	27
2.2.2 Proteinbiochemische Methoden.....	29
2.2.2.1 Herstellung von Whole-Cell-Lysaten.....	29
2.2.2.2 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	30
2.2.2.3 Western Blot.....	30
2.2.3 Histologische Methoden	31
2.2.3.1 Herstellung von Paraffinblöcken.....	31
2.2.3.2 Herstellung von Schnittpräparaten mittels Rotationsmikrotom	32
2.2.3.3 Immunhistochemische Färbung von Zellen	32
2.2.3.4 Immunhistochemische Färbung von Schnittpräparaten	33
2.2.3.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Schnittpräparaten.....	35
2.2.4 DNA-analytische Methoden	36
2.2.4.1 DNA-Isolierung aus Zellen	36
3. Ergebnisse.....	37
3.1 Konsekutive Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs in primären humanen Melanozyten.....	37
3.1.1 Etablierung eines lentiviralen Vektorsystems zum Gentransfer in humane Melanozyten.....	37
3.1.2 Etablierung von optimalen Versuchsbedingungen.....	38
3.2 Effekte einer onkogen-vermittelten, konsekutiven Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs auf primären humanen Melanozyten	41
.....	42
3.2.1 Wachstumsverhalten von BRAF ^{V600E} - und NRAS ^{Q61K} -exprimierenden Melanozyten	42
3.2.2 Onkogen-induzierte Seneszenz in primären Melanozyten	46
3.2.3 Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci (SAHF).....	48

3.2.4 Expression von BRAF ^{V600E} und NRAS ^{Q61K} führt in primären Melanozyten zur Bildung von Riesenzellen.....	49
3.3 BRAF ^{V600E} - und NRAS ^{Q61K} -exprimierende primäre Melanozyten sind phänotypisch unterschiedlich.....	52
3.3.1 Induktion des Tumorsuppressors p16INK4a.....	53
3.3.2 p16INK4a-Knockdown in NRAS ^{Q61K} -exprimierenden Melanozyten	54
3.4 Morphologie der p16INK4a-induzierten Seneszenz.....	56
3.4.1 Die p16INK4a-induzierbare Zelllinie WMM1175_A4.....	57
3.4.2 Expression von p16INK4a löst in WMM1175_A4 Proliferationsarrest aus.....	57
3.4.3 Expression von p16INK4a führt in WMM117_A4 zu verminderter Ki67-Aktivität. 58	
3.4.4 Expression von p16INK4a führt in WMM1175_A4 zu erhöhter β -Galaktosidase-Aktivität.....	60
3.4.5 Expression von p16INK4a löst in WMM1175_A4 Bildung von Seneszenz-assoziierten Heterochromatin-Foci (SAHF) aus	62
3.4.6 p16INK4a-Expression löst in WMM1175_A4 Bildung von Riesenzellen aus.....	63
3.4.7 Nachweis von p16INK4a in Naevuszellnaevi mit BRAF ^{V600E} - bzw. NRAS ^{Q61K} -Mutation	65
4. Diskussion	67
4.1 Auswirkungen von konsekutiver MAP-Kinase-Aktivierung auf humane Melanozyten.....	67
4.2 Vergleich der BRAF ^{V600E} - und NRAS ^{Q61K} -vermittelten Effekte auf das Wachstumsverhalten und die Seneszenzinduktion in humanen Melanozyten	67
4.3 Expression von BRAF ^{V600E} oder NRAS ^{Q61K} führt in primären Melanozyten zu einem distinkten Phänotyp.....	68
4.4 p16INK4a ist essentiell für die NRAS ^{Q61K} -vermittelte Änderung der Zellmorphologie.....	69
5. Zusammenfassung	72
6. Literaturverzeichnis.....	74

1. Einleitung

1.1 Das maligne Melanom

Das maligne Melanom ist ein Tumor melanozytärer Genese, der sich zu über 90% in der Haut manifestiert. Selten entstehen Melanome auch in Uvea (4,5%), Schleimhaut (1,3%) oder Konjunktiva (0,25%) [1]. Melanome sind meist stark pigmentiert, es kommen aber auch amelanotische Formen vor. Das maligne Melanom ist einer der aggressivsten Tumoren überhaupt [2], kennzeichnend ist eine verglichen mit anderen dermalen Tumoren früh einsetzende lymphogene und hämatogene Metastasierung und eine damit verbundene schlechte Prognose [3].

1.1.1 Epidemiologie

Die Inzidenz des malignen Melanoms steigt weltweit vor allem in der hellhäutigen Bevölkerung stetig an. In Deutschland hat sie sich seit den 1970er Jahren mehr als verdreifacht. Diese Entwicklung erklärt sich unter anderem durch Veränderungen des Lebensstils: Sport und Erholungsaktivitäten im Freien, Urlaubsreisen in die Berge oder in sonnige Länder sowie der Besuch von Solarien mit dem Ziel zu Bräunen sind seit den 1960er Jahren zunehmend beliebt [4, 5]. Die höchste Melanominzidenz findet sich in der australischen Bevölkerung mit jährlich 60 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner [3]. In Deutschland betrug im Jahr 2014 die durchschnittliche Inzidenz 19,0 Fälle pro 100.000 Einwohner. Für das Jahr 2018 wurde eine ebenso hohe Inzidenz prognostiziert [6]. Kaukasier entwickeln maligne Melanome vorwiegend am Körperstamm und an den Extremitäten. Afrikaner und Asiaten sind selten von Melanomen betroffen, die sich bei ihnen fast ausschließlich im Bereich der wenig pigmentierten Palmoplantarflächen oder den Schleimhäuten bilden. Dies zeigt, dass der Grad der Hautpigmentierung eine entscheidende Rolle bei der Entstehung maligner Melanome spielt [3, 7]. Frauen sind bei der Diagnosestellung im Durchschnitt 60 Jahre alt, Männer erkranken im Schnitt 7 Jahre später. Die Sterberate der Melanompatientinnen ist seit den 1980er Jahren um 10% zurückgegangen, während sich die Sterberate der männlichen Patienten um 10% erhöht hat. Seit im Jahr 2008 das Früherkennungsprogramm für Hautkrebs in den Leistungskatalog der gesetzlichen Krankenkassen aufgenommen wurde [8], ist die

Melanominzidenz verglichen mit den Vorjahren um 20% gestiegen, da nun auch vermehrt frühe Stadien von Melanomen entdeckt werden [6, 9]. Die Hälfte aller Melanome befindet sich zum Zeitpunkt der Diagnosestellung im Tumorstadium T1 mit einer Tumordicke von nicht mehr als 1 mm [10], in dem häufig eine Heilung durch eine vollständige Exzision zu erreichen ist. Insgesamt liegt die relative 5-Jahres-Überlebensrate bei Frauen mit malignem Melanom bei über 90% und bei Männern bei 87% [6].

1.1.2 Risikofaktoren der Melanomentstehung

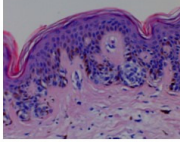
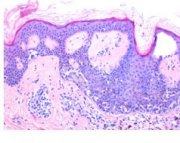
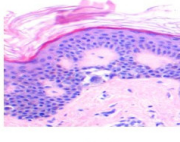
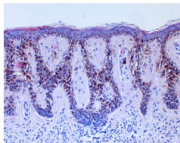
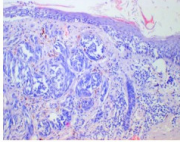
Der Einfluss von ultravioletter Strahlung (UV-Strahlung) durch Sonnenexposition ist der wichtigste Umwelt-Risikofaktor in der Entstehung von malignen Melanomen [11]. Dabei ist eine intermittierende, starke UV-Strahlenbelastung im Sinne eines Sonnenbrands stärker mit der Entstehung von Melanomen assoziiert, als eine chronische UV-Belastung – vor allem dann, wenn gehäuft Sonnenbrände in Kindheit und Jugend auftreten [12, 13]. Auch die UV-Exposition in Solarien erhöht das Risiko, an einem malignen Melanom zu erkranken, erheblich. Die World Health Organization (WHO) klassifiziert UV-Strahlen von Solarien mittlerweile als Kategorie 1-Karzinogen, da ein Kausalzusammenhang zwischen UV-Exposition in Solarien und der Entstehung von Hautkrebs gesichert ist [14, 15]. Die Anzahl erworbener melanozytärer Naevi ist der wichtigste unabhängige Risikofaktor für die Melanomentstehung, wobei die Wahrscheinlichkeit ein Melanom zu entwickeln beinahe linear mit der Anzahl der Naevi auf der Haut des Patienten ansteigt. Eine hohe Anzahl von Naevi kann außerdem mit einer familiären, genetischen Prädisposition für die Entstehung von Melanomen verknüpft sein. Als Suszeptibilitätsgene wurden in diesem Zusammenhang MC1R, CDKN2A, TYR, ASIP, TERT und SCL45A2 identifiziert, deren Genprodukte Einfluss auf Melaninproduktion und Zellzyklusregulation nehmen [16-19]. Histologische Studien belegen, dass melanozytäre Naevi nicht nur Risikofaktoren für die Melanomentstehung sind, sondern auch direkte Melanomvorläufer sein können [20-22]. Als weitere Risikofaktoren für maligne Melanome sind ionisierende Strahlung, freie Radikale und kanzerogene Chemikalien bekannt [23]. Auch Vorerkrankungen können ein Risikofaktor in der Melanomentstehung sein: Aktuelle Forschungsergebnisse weisen auf einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von malignen Melanomen und Morbus

Parkinson hin. Parkinson-Patienten haben verglichen mit der Normalbevölkerung ein 7fach erhöhtes Risiko, an einem malignen Melanom zu erkranken [19, 24, 25].

1.1.3 Molekulare Mechanismen der Melanomentstehung

Für die Entartung von Melanozyten zu Melanomzellen müssen zahlreiche verschiedene molekulare Mechanismen zusammenspielen: Für eine unbegrenzte Zellproliferation muss eine mutationsbedingte Unabhängigkeit von Wachstumssignalen erlangt werden [26], ebenso wie eine Unempfindlichkeit gegenüber wachstumshemmenden Signalen [27]. Gleichzeitig muss die Zelle eine genomische und epigenetische Instabilität tolerieren [28, 29], ohne den programmierten Zelltod durch Apoptose einzuleiten [30, 31]. Um ein uneingeschränktes replikatives Potential zu entwickeln, ist die Aktivierung der Telomerase notwendig, welche die Telomere an den Chromosomen wieder aufbaut [32]. Ab einer gewissen Tumorgröße ist auch die Befähigung zur Neoangiogenese essentiell für die Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff [33]. Um schließlich metastatisches Potenzial zu erlangen, müssen die Zellen befähigt sein, aus dem Zellverband auszubrechen [34]. Erst bei Erfüllung all dieser Voraussetzungen kann aus einem Melanozyten eine maligne Melanomzelle werden. Melanome können aus vorbestehenden Naevi entstehen [22]. In diesem Fall wird ein zellzyklussuppressiver Schutzmechanismus, die onkogen-induzierte Seneszenz [35], im Naevus überwunden. Häufiger als die Entartung eines melanozytären Naevus zum malignen Melanom ist jedoch das Auftreten von Melanomen an zuvor unauffälligen Hautstellen [13]. Die Mikrostagging-Methode nach Clark teilt die Melanomentstehung in fünf histopathologische Invasionslevels ein [36, 37]. Tabelle 1 stellt das Clark-Modell dar und bringt die einzelnen Stufen mit der korrelierenden molekularen Läsion in Zusammenhang.

Tab. 1: Clark-Level mit zugehörigen histologischen Merkmalen und molekularen Läsionen.
 Abbildung modifiziert nach Miller, A.J. und Mihm, M.C.Jr, „Melanoma“. N Engl J Med, 2006.
 Die histopathologischen Abbildungen wurden von PD Dr. Marion Wobser, Univ. Hautklinik
 Würzburg zur Verfügung gestellt.

Stufe	Histologische Merkmale	Molekulare Läsion
 Benigner Naevuszellnaevus	Ansammlung von Melanozyten in Nestern	BRAF-Mutation
 Dysplastischer Naevus	Atypisches Wachstum, dysplastische Zellen, ABCDE-Merkmale	Verlust von Tumorsuppressorgen (CDKN2A, PTEN)
 Radiale Wachstumsphase	Intraepidermales Wachstum	Keine Proliferationskontrolle
 Vertikale Wachstumsphase	Invasion von Dermis und Fettgewebe	Keine Proliferationskontrolle, Verlust von Kontrollelementen der Zelladhäsion
 Melanom	Metastasierung	Keine Proliferationskontrolle, Verlust von Kontrollelementen der Zelladhäsion

1.1.4 Alte und neue Therapieoptionen

Eine Exzision des malignen Melanoms mit entsprechendem Sicherheitsabstand ist der Goldstandard in der Therapie. Auch bei operablen Fernmetastasen wird Tumorfreiheit durch Operation angestrebt. Ist eine Operation nicht sinnvoll oder möglich, steht die Strahlentherapie auch als alleinige Therapieoption zur Verfügung. Bei inoperablen Rezidivtumoren und regionären Metastasen sowie bei Fernmetastasen ist eine Chemotherapie mit Dacarbazin oder Temzolomid indiziert. Diese beiden Substanzen erreichen jedoch lediglich Ansprechraten von 5-17% und nehmen keinen signifikanten Einfluss auf das Gesamtüberleben der Patienten [38]. Auch durch kombinierte Therapieschemata oder unterstützende Therapie mit Immunmodulatoren ist kein besserer Chemotherapieerfolg zu erzielen. Aufgrund dieser klinisch sehr unbefriedigenden Situation war das maligne Melanom lange als eines der therapieresistentesten Malignome bekannt [39]. Im Jahr 2002 wurde mit BRAF^{V600E} erstmalig eine aktivierende Mutation des Onkogens BRAF beschrieben, die in mehr als 60% aller malignen Melanome nachgewiesen werden kann [40]. Diese Erkenntnis wird als Durchbruch auf der Suche nach neuen, wirksameren Therapeutika für Melanome betrachtet. Durch ein besseres funktionelles Verständnis der Ras/Raf/MEK/ERK-MAPK-Signalkaskade, die die entscheidende Triebkraft in der Entstehung maligner Melanome darstellt, sind verschiedene molekulare Strukturen als mögliche Angriffspunkte für therapeutische Ansätze in den Fokus der Forschung gerückt, darunter die Protoonkogene B-Raf, N-Ras, MEK und c-kit [41]. Dieser Ansatz, bei dem sich Therapeutika gezielt gegen molekulare oder zytologische Eigenschaften des Tumorgewebes richten, wird als *Targeted Therapy* bezeichnet und wird zukünftig die Behandlungsoption der Wahl sein – nicht nur in der Melanomtherapie, sondern auch in allen anderen onkologischen Disziplinen [42]. Auch die Einteilung und Klassifikation von malignen Melanomen wird künftig wohl nicht mehr nach histologischen Gesichtspunkten erfolgen, sondern nach molekularen Eigenschaften und Mutationslage.

1.1.5 Targeted Therapy

1.1.5.1 Selektive Inhibitoren

Vemurafenib

Im August 2011 wurde mit dem Wirkstoff Vemurafenib (Zelboraf®) ein selektiver Inhibitor für B-Raf^{V600E} zur Behandlung von Patienten mit metastasiertem Melanom zugelassen [43]. Vemurafenib blockiert durch die Inhibition von B-Raf^{V600E} den MAPK-Signalweg und führt zu Wachstumsarrest und Apoptose der Tumorzellen [44]. Klinisch zeigt Vemurafenib eine signifikant höhere Wirksamkeit im Vergleich zu den früheren Standardchemotherapeutika Dacarbazin und Temzolomid: Das objektive Ansprechen beträgt für Vemurafenib 48%, für Dacarbazin lediglich 5% [38]. Nach 6 Monaten Therapie liegt das Gesamtüberleben bei Patienten unter Vemurafenib-Therapie bei 84%, während von den Patienten unter Dacarbazintherapie nur 64% überleben [45]. Insgesamt scheinen besonders Patienten mit einer hohen Tumorlast von Vemurafenib zu profitieren, bei ihnen sind mitunter dramatische Verbesserungen der Tumorsymptomatik zu beobachten [38]. Nach einer medianen Therapiezeit von etwa 6 Monaten zeigen jedoch die meisten BRAF^{V600E}-mutierten Tumoren unter Therapie mit Vemurafenib Resistenzen, die zu einer Reaktivierung des MAPK-Signalwegs und damit zu einem Progress der Erkrankung führen. Diese Resistenzen sind zum einen aktivierende Mutationen von NRAS, dessen Protein N-Ras B-Raf vorgeschaltet ist, zum anderen das Auftreten von B-Raf^{V600E}-Splicevarianten [46]. Diese rasche Resistenzentwicklung ist bezeichnend für die Dynamik der betroffenen Signalwege.

Dabrafenib

Im Mai 2013 wurde mit Dabrafenib (Tafinlar®) ein weiterer selektiver B-Raf-Inhibitor zugelassen. Dabrafenib ist ein reversibler adenosintriphosphat-kompetitiver Inhibitor, der sowohl B-Raf^{V600E} als auch das seltenere B-Raf^{V600K} hemmt, und darüber hinaus intrakranielle Wirksamkeit gegen Hirnmetastasen besitzt, was für Vemurafenib noch nicht gezeigt werden konnte. Die Wirksamkeit von Dabrafenib ist genauso hoch wie die von Vemurafenib, während das Nebenwirkungsprofil von Dabrafenib im Vergleich milder ist. Wie bei Vemurafenib zeigt die Mehrzahl der Patienten unter Dabrafenibtherapie initial ein gutes Ansprechen, nach einer gewissen Zeit entwickelt der Tumor jedoch Resistenzen gegen die B-Raf^{V600E} / B-Raf^{V600K}-Inhibition und die

Erkrankung schreitet fort. Aufgrund des milden Nebenwirkungsprofils erscheint jedoch eine Kombination von Dabrafenib mit Immunmodulatoren oder anderen gezielten Krebstherapeutika eine vielversprechende Möglichkeit der Therapieverbesserung zu sein [47].

1.1.5.2 Immuntherapeutika

Ipilimumab

Ipilimumab (Yervoy[®]) ist ein rekombinanter humaner IgG1 monoklonaler Antikörper, der im März 2011 als eines der ersten gezielten Therapeutika zur Behandlung von metastasiertem malignem Melanom zugelassen wurde. Ipilimumab bindet und blockiert damit den CTLA4-Rezeptor auf T-Lymphozyten und steigert so deren Aktivität und Proliferation. Die gesteigerte T-Zell-Aktivität führt zu einem immunologischen Erkennen der Tumorzellen durch die T-Zellen und zur Tumorerstörung durch das körpereigene Immunsystem [48]. Ipilimumab allein oder in Kombination mit dem Alkylans Dacarbazin verlängert im Vergleich zur Monotherapie mit Dacarbazin oder der Immunmodulation durch gp100-Vakzine die Gesamtüberlebensrate signifikant. Auch Hirnmetastasen sprechen auf die Behandlung an. [49-51].

Die PD-1/PD-L-Achse

Ähnlich wie bei Ipilimumab liegt die Strategie der Tumorbekämpfung mittels anti-PD-1-Antikörpern in der Steigerung der endogenen Antitumoraktivität des Immunsystems. Das *Programmed Cell Death Protein 1* (PD-1) wird auf reifen, aktivierten B- und T-Zellen exprimiert und durch *Programmed Cell Death 1 Ligand 1* (PD-L1) oder *Programmed Cell Death 1 Ligand 2* (PD-L2) aktiviert [52]. Durch die PD-1-PD-L-Interaktion wird die T-Zelle negativ reguliert [53]. Cytokinproduktion, Zellzyklusprogression und Proliferation – auch der Ras/Raf/MAPK-Signalweg – werden gehemmt, bei Antigen-spezifischen T-Zellen wird sogar Apoptose induziert [52]. In zahlreichen Tumoren wird PD-L1 konstitutiv exprimiert [54], die T-Zellen also konstitutiv supprimiert – so auch im malignen Melanom [55]. Da die T-Zell-vermittelte Immunantwort eine wichtige Rolle in der körpereigenen Tumorabwehr spielt, ist die konstitutive Aktivierung von PD-1 ein Evasionsmechanismus des Tumors vor dem Immunsystem [52, 56]. Die Antikörper Nivolumab [57], Pembrolizumab [58] und MPDL3280A [59, 60] richten sich gegen PD-1 und sollen zu einer Erholung der T-Zellen und damit zu einer Reaktivierung der

Immunabwehr gegen Tumorzellen führen [61]. In klinischen Studien sprach jeder dritte bis vierte Patient auf die Behandlung mit dem anti-PD-1-Antikörper an [58, 61]. Auch die Kombination von anti-PD-1-Antikörpern mit anderen Immuntherapeutika wie Ipilimumab bietet vielversprechende Möglichkeiten, die Melanomtherapie noch spezifischer zu gestalten [59, 62].

1.2 Der MAP-Kinase-Signalweg

Der *mitogen activated protein* (MAP)-Kinase-Signalweg spielt in zahlreichen zellulären Abläufen eine zentrale Rolle und vermittelt unter anderem Signale für Zellwachstum, Proliferation, Differenzierung, Migration und Apoptose [63]. Im Malignen Melanom ist der MAP-Kinase-Signalweg meist dereguliert und trägt entscheidend zur Weitergabe onkogener Stimuli bei [64]. Der MAP-Kinase-Signalweg besteht aus einem mehrstufigen Kinasemodul, in dem eine MAP-Kinase (MAPK) durch eine MAP-Kinase Kinase (MAPKK) phosphoryliert und aktiviert wird. Die MAPKK wird wiederum durch eine MAP-Kinase Kinase Kinase (MAPKKK) phosphoryliert und aktiviert. Die MAPKKK erhält ihre Aktivierung G-Protein-vermittelt durch extrazelluläre Stimuli [63, 65, 66]. In Säugern existieren mehrere verschiedene MAP-Kinasen mit ihren jeweils individuellen Aktivierungskaskaden, die jedoch untereinander interagieren. Der ERK-Signalweg ist der am besten untersuchte MAP-Kinase-Signalweg im Menschen. Die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 werden von der MAPKK MEK durch Phosphorylierung aktiviert [67]. MEK selbst wird durch die MAPKKK Raf phosphoryliert und aktiviert [68, 69]. Raf wiederum wird durch die GTPase Ras rekrutiert und aktiviert, die selbst durch ligandengesteuerte Rezeptortyrosinkinasen aktiviert wird, deren Reiz wiederum verschiedene Wachstumsfaktoren und Mitogene sind [70, 71]. Abb. 1 gibt einen schematischen Überblick über den MAPK-Signalweg sowie über den ERK-Signalweg.

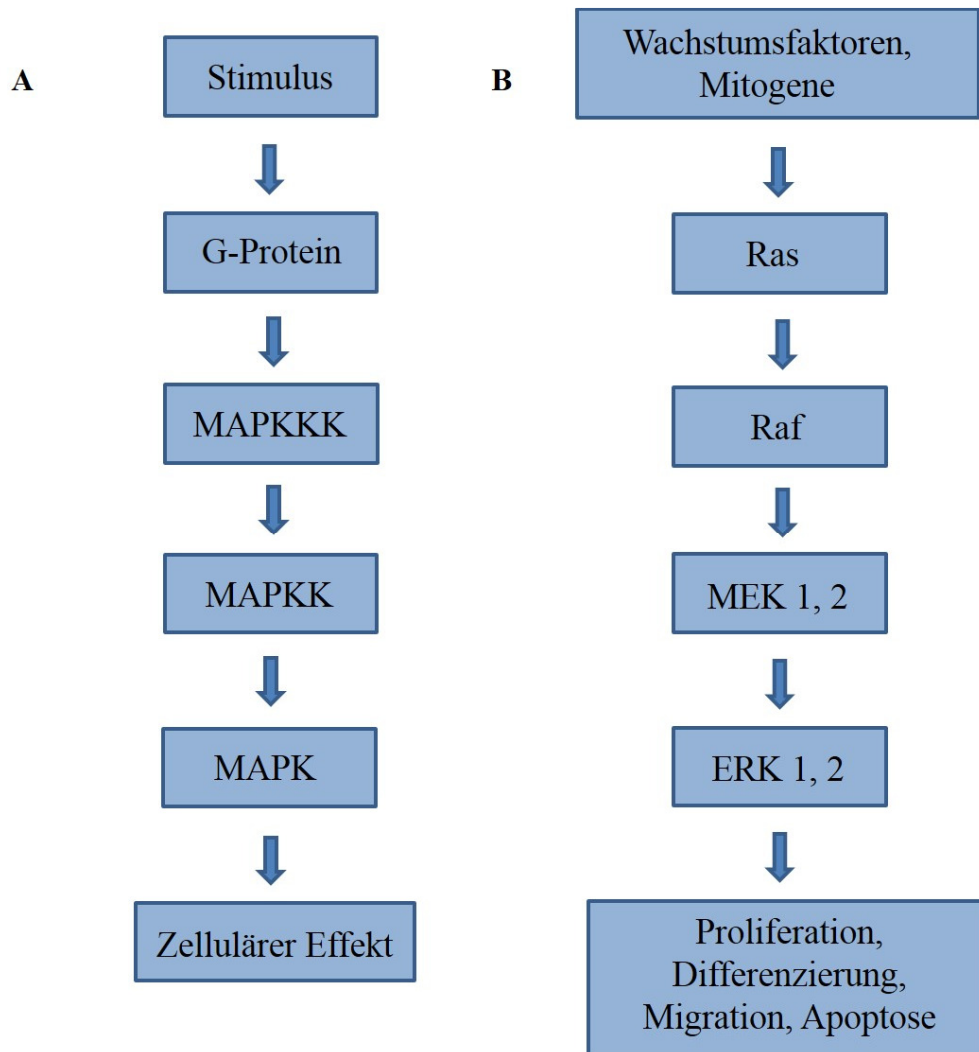


Abb. 1:
 Abbildung modifiziert nach Dhillon, A.S. und Hagan, S. „MAP Kinase signalling pathways in cancer“ *Oncogene*, 2007.
 A) Allgemeines Schema eines MAP-Kinase-Signalwegs
 B) ERK-Signalweg

Die Mehrzahl aller Malignom-assoziierten Mutationen, die zur konstitutiven Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs – hier im speziellen des ERK-Signalwegs – führen, finden sich in den frühen Ebenen des Signalwegs. Dazu gehören die Überexpression oder Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen, die fortwährende Produktion von aktivierenden Liganden, oder die im malignen Melanom besonders häufigen Mutationen von Ras und Raf. Die große Häufigkeit von aktivierenden Mutationen der Ras-Raf-Achse legt nahe, dass es sich hierbei um die regulatorische Schlüsselstelle des MAPK/ERK-Signalwegs handelt [66].

1.3 Das Onkogen BRAF

1.3.1 Aufbau und Regulation

BRAF ist ein humanes Gen, welches für das Protein B-Raf codiert. B-Raf ist neben A-Raf und C-Raf Mitglied einer Gruppe von zytoplasmatischen Serin/Threonin-Kinasen, die bedeutende Funktionen in Zelldifferenzierung, Apoptose, und zellulärer Wachstumsregulation einnehmen [72]. A-, B- und C-Raf haben einen ähnlichen Aufbau und bestehen aus drei konservierten Regionen: CR1 und CR2 am N-Terminus, und CR3 am C-Terminus, wobei sich in CR1 die *ras binding domain* (RBD) und in CR3 die Kinasedomäne befindet. Die Kinasedomäne in CR3 besteht aus N-Region, *glycine-rich loop* (GRL) und *activation segment* (AS). Abbildung 2 zeigt die Struktur von B-Raf.

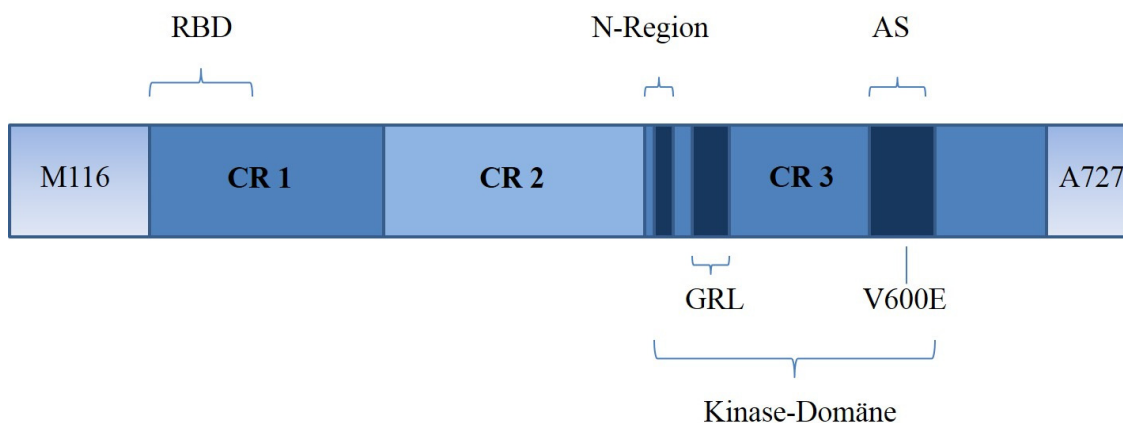


Abb. 2: Struktur von B-Raf. In CR1 ist die Ras binding domain (RBD) dargestellt, in CR3 die Kinasedomäne, bestehend aus N-Region, glycine-rich loop (GRL) und activation segment (AS). Die Mutationsstelle V600E ist eingezeichnet. Modifiziert nach Gray-Schopfer et al.: „The role of B-Raf in melanoma“.

Von B-Raf existieren mehrere Splicevarianten, die Proteine von 70-100 kDa Molekulargewicht produzieren. B-Raf wird durch Ras über Phosphorylierung aktiviert und überträgt im Rahmen des MAPK-Signalwegs mitogene Signale von Ras zu MEK. B-Raf ist durch seine molekulare Struktur leichter aktivierbar als seine Isoformen A-Raf und C-Raf und weist im Vergleich eine höhere basale Kinaseaktivität auf. Das bedeutet einerseits, dass B-Raf die Isoform ist, die hauptsächlich verantwortlich für die

Signaltransduktion zwischen Ras und MEK ist. Andererseits wird B-Raf dadurch wesentlich empfänglicher für Mutationen [73]. Eine Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch B-Raf spielt eine zentrale Rolle in der Melanozytenproliferation [74].

1.3.2 BRAF^{V600E}-Mutationen im malignen Melanom

In mehr als der Hälfte aller malignen Melanome liegt eine BRAF^{V600E}-Punktmutation vor, die meisten Mutationen betreffen hierbei das Codon 600 in der Region CR3. In 80% dieser Fälle ist die Aminosäure Valin durch Glutamat substituiert, diese häufigste Mutation wird als V600E (früher: V599E) bezeichnet [40] und betrifft das Aktivierungssegment der Kinase-Region in CR3 [73]. Substitutionen von Valin durch Lysin (V600K) oder Arginin (V600R) sind weniger häufig. Die Mutation erhöht konstitutiv die Kinaseaktivität von B-Raf und führt über eine verstärkte Aktivierung der nachgeschalteten MAPK-Signalkaskade zu einem ungebremsten Proliferationssignal in betroffenen Melanozyten [40]. Eine virale Transfektion von BRAF^{V600E} in humane Melanozyten führt zu einer erhöhten Expression von MAPK und dem Tumorsuppressor p16INK4a, und zu einer verringerten Expression des Proliferationsmarker Ki67. Die Expression des Tumorsuppressors p21 wird durch BRAF^{V600E} nicht beeinflusst. Eine virale Transfektion von wildtypischem BRAF in humane Melanozyten führt nicht zu veränderten Expressionsleveln der oben genannten Proteine. Daraus folgt, dass das Zuführen von exogenem BRAF^{V600E} zu einem seneszenzartigen Wachstumsarrest mit p16INK4a-Aktivierung in humanen Melanozyten führt. Die Abwesenheit von p21 spricht gegen eine Aktivierung von Apoptosemechanismen [73, 75]. BRAF^{V600E} findet sich hauptsächlich in superfiziell spreitenden Melanomen (49%) und an Hautstellen, die intermittierender UV-Belastung ausgesetzt sind, wie beispielsweise der Stamm [76]. Melanome mit einer V600E-Mutation entstehen wesentlich früher als Melanome mit BRAF^{WT}, das durchschnittliche Patientenalter liegt bei 49 Jahren. [77]. BRAF^{V600E} lässt sich auch in 82% aller Naevi nachweisen. Das bedeutet, dass die Aktivierung der Ras/Raf-MAPK-Kaskade ein entscheidender Schritt in der Entstehung einer melanozytären Neoplasie darstellt, aber allein für die Melanomentstehung nicht ausreicht [74]. BRAF^{V600E}-Mutationen, die im Primärtumor vorkommen, finden sich grundsätzlich auch in den zugehörigen Metastasen wieder, was dafür spricht, dass die BRAF^{V600E}-Mutation

ein frühes Ereignis in der Melanompathogenese ist, und während der Tumorprogression erhalten bleibt [78].

1.4 Das Onkogen NRAS

1.4.1 Aufbau und Regulation

Das humane Gen NRAS codiert für das Protein N-Ras. N-Ras ist neben H-Ras und K-Ras Mitglied der Ras-Proteinfamilie, die über intrinsische GTPase-Aktivität verfügt. Durch das Hin- und Herwechseln zwischen einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand und einem aktiven, GTP-gebundenen Zustand funktionieren Ras-Proteine wie Schalter in der Transmission von regulatorischen Zellsignalen [79]. In GTP-gebundenem Zustand aktiviert Ras die nachgeschalteten Raf-Proteine A-Raf, B-Raf und C-Raf, die wiederum die MAP-Kinasen MEK und ERK aktivieren – eine Signalkaskade, die bedeutenden Einfluss auf die Zellzyklusregulation nimmt [80]. In mutierter, onkogener Form befinden sich Ras-Proteine ausschließlich in ihrem aktivierten Zustand und verlieren ihre Stimulierbarkeit durch GTPase-aktivierende Proteine [81].

1.4.2 NRAS-Mutationen im malignen Melanom

Die Aktivierung der Ras/Raf/MEK-MAPK-Signalkaskade ist die entscheidende Triebkraft in der Entwicklung eines malignen Melanoms. Dieser Signalweg kann nicht nur durch Mutationen in BRAFV^{600E}, sondern auch durch Mutationen in NRAS aktiviert werden. Aktivierende NRAS-Punktmutationen kommen in 15-25% aller malignen Melanome vor [82, 83]. Die mit 82% am häufigsten vorkommende Mutation ist NRAS^{Q61}, die Codon 61 auf Exon 2 betrifft. Hierbei ist die Aminosäure Glutamin durch Arginin (NRAS^{Q61R}) bzw. durch Lysin (NRAS^{Q61K}) substituiert. Seltener sind NRAS^{G12} und NRAS^{G13} in Codon 12 und 13 auf Exon 1, die 18% der NRAS-Mutationen im malignen Melanom ausmachen. Eine Mutation von NRAS findet sich hauptsächlich in nodulären Melanomen, die zu 27% davon betroffen sind. Im Unterschied zu BRAF^{V600E}-mutierten Melanomen, die vorwiegend auf Hautarealen mit akut-intermittierender UV-Belastung auftreten, findet man Melanome mit NRAS-Mutationen häufiger auf

Hautarealen, die chronischer UV-Belastung ausgesetzt sind, wie beispielsweise Kopf, Nacken oder Hände [76]. Auch in Naevi findet man konstitutiv aktiviertes N-Ras: Etwa 15% aller Naevi tragen eine NRAS-Mutation [84], kongenitalen Naevi die zum Zeitpunkt der Geburt schon vorhanden waren, sind sogar zu 81% von mutiertem NRAS betroffen [85]. NRAS-Mutationen, die im Primärtumor vorhanden sind, finden sich auch in den zugehörigen Metastasen, was darauf hinweist, dass aktivierende NRAS-Mutationen – ebenso wie BRAF-Mutationen – bereits zu einem frühen Zeitpunkt in der Melanompathogenese eine Rolle spielen und während der Tumorprogression erhalten bleiben [78].

Während in anbehandelten malignen Melanomen im Rahmen der Resistenzentwicklung unter *Targeted Therapy* NRAS-Mutationen neben BRAF-Mutationen vorkommen können, findet sich in behandlungsnaiven Melanomen grundsätzlich entweder eine NRAS- oder eine BRAF-Mutation, niemals jedoch beide gleichzeitig [77].

1.4.3 Mutationsstatus als Prognosemarker

Der Mutationsstatus von NRAS und BRAF im malignen Melanom kann auch als Prognosemarker herangezogen werden. Im Stadium IV der Erkrankung sind Tumormutationen assoziiert mit dem Vorhandensein von Hirnmetastasen: Melanome mit BRAF-Mutationen weisen zu 24% eine metastatische ZNS-Beteiligung auf, Melanome mit NRAS-Mutationen zu 23%, Melanome mit wildtypischem BRAF oder NRAS jedoch nur zu 12%. Ab dem Zeitpunkt der Diagnosestellung Stadium IV haben Patienten mit NRAS-Mutation ein medianes Überleben von 8,2 Monaten, Patienten mit wildtypischem NRAS überleben mit 15,1 Monaten deutlich länger. Damit ist der NRAS-Mutationsstatus ein unabhängiger Prädiktor von kürzerem Überleben nach der Diagnose eines malignen Melanoms in Stadium IV [86].

1.5 Onkogen-induzierte Seneszenz

Zellen haben grundsätzlich eine limitierte Proliferationskapazität, das sogenannte Hayflick-Limit [87], nach dessen Ablauf sie in einen Proliferationsarrest in der G1-Phase des Zellzyklus übergehen [88, 89]. Dieser Zustand wird als replikative Seneszenz bezeichnet. Man geht davon aus, dass es sich bei diesem Wachstumsarrest um eine Folge

der Telomerverkürzung durch Zellteilung handelt [88, 90]. Seneszenz kann aber auch unabhängig von der Telomerlänge infolge von Onkogenaktivität auftreten. Man nennt sie dann vorzeitige oder onkogen-induzierte Seneszenz (OIS) [89].

1.5.1 Morphologie der onkogen-induzierten Seneszenz

Morphologisch ist die onkogen-induzierte Seneszenz nicht von der replikativen Seneszenz zu unterscheiden [89]. Seneszente Zellen nehmen im Vergleich zu ihren proliferierenden Klonen an Größe zu und weisen eine flache Morphologie auf. Das Zytoplasma ist oft reich an Vakuolen [87]. Die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase (SA- β -Gal) ist der am häufigsten verwendete Biomarker für seneszente Zellen [91, 92]. Es handelt sich hierbei um ein lysosomales Enzym, welches besonders in seneszenten Zellen überexprimiert wird [93] und bei pH 6 blau angefärbt werden kann [92]. Im Zellkern von seneszenten Zellen finden sich sogenannte Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci (SAHF) [94]. SAHF sind Chromatinstrukturen, an denen keine Transkription stattfindet, da das Chromatin aufgrund einer Histonvariante besonders dicht gepackt vorliegt. Die SAHF-Histonvariante K9M-H3 ist an Lysin 9 methyliert. Damit bildet sich eine Andockstelle für HP1-Proteine, die Chromatin zu transkriptional inaktivem Heterochromatin formieren [95]. Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci sind somit das morphologische Korrelat für die transkriptionale Inaktivität und damit für den Proliferationsarrest seneszenter Zellen [94].

1.5.2 Auslösende Onkogene

In kultivierten Zellen wird die onkogen-induzierte Seneszenz durch eine Reihe von Tumorsuppressorgenen ausgelöst, die in humanen Tumoren häufig mutiert vorliegen: INK4A (*inhibitor of cyclin-dependent kinase 4*), ARF (*alternative reading frame*), p53 und RB (*retinoblastoma tumor suppressor gene*) [87]. Die Rolle der assoziierten Proteine p16INK4a, p21^{CIP1}, cyclin-dependent kinase 4 (CDK 4), cyclin-dependent kinase 6 (CDK 6), p14^{ARF}, p53 und promyelocytic leukemia protein (PML) ist dabei noch nicht vollständig verstanden, jedoch stammen sie alle aus demselben funktionalen Kontext [89, 96, 97]. Das INK4A-Protein p16INK4a hemmt die Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen CDK 4 und CDK 6. Diese treiben durch die Phosphorylierung von Rb zu pRb den Zellzyklus an [98, 99]. Durch die p16INK4a-Aktivität bleibt pRb hypophosphoryliert

und bindet an den E2F-Transkriptionsfaktor, wodurch DNA-Replikation verhindert wird. So blockiert p16INK4a den Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus [100]. p14^{ARF} blockiert die Zellproliferation durch die Hemmung der p53-Ubiquitinligase hdm2, wodurch p53 stabilisiert und aktiviert wird [101, 102]. Mutierte Varianten der Onkogene BRAF und NRAS, die in der Mehrzahl aller malignen Melanome nachgewiesen werden können [40, 82], können ebenfalls onkogen-induzierte Seneszenz auslösen. Forciert man ihre Expression in normalen humanen Melanozyten, werden diese seneszent, ohne dass eine Telomerverkürzung nachgewiesen werden kann [75, 103]. Die BRAF- bzw. NRAS-induzierte onkogene Seneszenz ist außerdem unabhängig von p16INK4a und p53 [104]. In vivo konnte die BRAF- und NRAS-induzierte Seneszenz ebenfalls nachvollzogen werden. Im Zebrafisch- und im Mausmodell führt die Expression von BRAF^{V600E} oder NRAS^{Q61R} zu benignen melanozytären Hyperplasien, die Ähnlichkeiten mit humanen Naevi haben. Sind die Versuchstiere zusätzlich p16INK4a / p14^{ARF}- oder p53-defizient, führt die Expression von BRAF^{V600E} oder NRAS^{Q61R} zu Melanomen [105-107]. Diese Ergebnisse zeigen, dass p16INK4a und p53 notwendig sind, um die onkogen-induzierte Seneszenz zu erhalten [89].

1.5.3 Onkogen-induzierte Seneszenz als Schutz vor Melanomen

Dass zahlreiche bekannte Tumorsuppressoren an der onkogen-induzierten Seneszenz beteiligt sind, legt den Schluss nahe, dass die onkogen-induzierte Seneszenz selbst ein gewichtiger Antitumormechanismus ist [87]. Darüber hinaus findet man seneszente Zellen in prämaligen Läsionen wie Naevi [108], nicht aber in malignen Tumoren [103, 109, 110]. Bemerkenswert ist auch, dass alle bisher bekannten Melanomsuszeptibilitätsgene solche Gene sind, die in der onkogen-induzierten Seneszenz aktiviert werden [111]: In vivo führen Keimbahnmutationen der Gene, die für p16INK4a [112], CDK4 [113] oder p14 [114] codieren, zu einer familiär gehäuften Melanomprävalenz. In vitro verhindern funktionelle Defekte von Proteinen aus der ARF-, p53- oder pRB-Familie das Eintreten der onkogen-induzierten Seneszenz und führen zu unlimitierter Zellproliferation und zu krebsauslösenden Zellveränderungen [115-117].

1.6 Der Tumorsuppressor p16INK4a

p16INK4a ist ein Tumorsuppressor und Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen [100]. Auf zellulärer Ebene hemmt p16INK4a die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6. CDK 4 und 6 treiben durch Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins Rb zu pRb den Zellzyklus an [98, 99]. Durch die p16INK4a-Aktivität bleibt Rb in einem hypophosphorylierten, antiproliferativen Zustand [100]. Hypophosphoryliertes Rb bindet den Transkriptionsfaktor E2F1 und verhindert somit die Transkription von E2F1-Zielgenen, die essentiell für den Übertritt von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus sind [118]. So blockiert p16INK4a den Eintritt der Zelle in die S-Phase des Zellzyklus und ist damit ein Zellzyklusregulator am G1-Checkpoint [100]. Wird der Zellzyklus am G1-Checkpoint durch p16INK4a unterbrochen, geht die Zelle in einen irreversiblen Proliferationsarrest über, der als Seneszenz bezeichnet wird [119-121].

Für Etablierung und Erhalt der zellulären Seneszenz ist der Tumorsuppressor p16INK4a essentiell [122, 123]. In humanen Tumoren ist häufig ein Verlust von p16INK4a zu beobachten. Dieses Ereignis ermöglicht es präkanzerösen Läsionen, Seneszenz zu umgehen und zu entarten [124]. Das für p16INK4a codierende Gen CDKN2A liegt auf Chromosom 9p21 und codiert neben p16INK4a auch für ein weiteres Protein, den p53-Aktivator p14ARF [125]. Keimbahnmutationen in CDKN2A sind jedoch nicht mit einer hohen Tumorzinzidenz im Allgemeinen, sondern im Speziellen einer hohen Melanom-Inzidenz verknüpft [126, 127], was p16INK4a die Rolle eines Melanomsuppressors verleiht [108].

1.7 Zielsetzung dieser Arbeit

Verschiedene Onkogen können den MAP-Kinase-Signalweg konsekutiv aktivieren. Hierzu zählen auch die beim Melanom häufig mutierten Onkogene BRAF und NRAS. Ziel der Arbeit war es, Unterschiede zwischen einer BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-vermittelten MAP-Kinase-Aktivierung in humanen Melanozyten herauszuarbeiten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Technische Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	Tecnoclav 135S	Fedegari Autoclavi SPA Varioklav
Blotkammer	Mini Trans Blot® Mini PROTEAN	BioRad
Brutschrank (37°C, 5% CO ₂)	Heraeus Incubate Function Line	Thermo Scientific
Brutschrank (37°C)	BM 200	Memmert GmbH
Dampfgarer	MultiGourmet	Braun
Eismaschine	Scotsman AF-20	Scotsman Ice Systems
Einbettautomat	Tissue-Tek® AutoTEC®	Sakura
Geldokumentationssystem	Kamera E.A.S.Y. 429K UV-Transilluminator UVT-28M	Herolab
Gelkammer	OWL A2 Large Gel Systems V-Gel	Thermo Scientific Biostep®
Inversmikroskop	Wilowert 30 Labovert CK2	Helmut Hund Leitz Olympus
Kühlschrank	Liebherr Premium/Comfort	Liebherr
Mikroliterpipetten (0,5µl, 2µl, 10µl, 20µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	Eppendorf Reference® Research® Gilson Pipetman®	Eppendorf AG Gilson Inc.
Mikrowelle	Sharp R-3V10	Sharp Electronics
Multistep-Dispenser	Multipette® Plus	Eppendorf
Neubauer Zählkammer	Kammertiefe: 0,1 mm; 0,0025 mm ²	Marienfeld
PCR-Maschine	96-Well GeneAmp® PCR-System 9700	Applied Biosystems Inc.
PCR Workstation	Clean Lab	Herolab
Pipettierhilfe	Pipetus® Akku Accu-Jet®	Hirschmann Laborgeräte
Plattenphotometer	SLT Spectra Infinite® 200 PRO	Tecan
Rotationsmikrotom	RM2235	Leica

Gerät	Typ	Hersteller
Autoklav	Tecnoclav 135S	Fedegari Autoclavi SPA Varioklav
Schüttler für Bakterienkulturen	Innova	New Brunswick Scientific
Sonifikator	Sonoplus HD 70	Bandelin
Spannungsquelle	EPS Electrophoresis Power Supply Power Pac 300	Amersham Pharmacia Biotech Europe Brio Rad
Spektralphotometer	Eppendorf BioPhotometer	Eppendorf
Sterilwerkbank	Gelaire® Flow Laboratories TC 72 Heraeus Lamin Air® HB2448 Heraeus Lamin Air® HB2472	Gelaire Flow Laboratories Thermo Fisher Scientific
Stickstofftank	Biosafe MD® 120	Cryotherm
Thermoschüttler / Heizblock	Thermomixer 5436 Test Tube Thermostat Model TCR 100	Eppendorf Roth
Tiefkühlschrank	Thermo Electron ULT Freezer (-80°C) Liebherr Premium (-20°C) Liebherr Öko Super (-20°C)	Thermo Electron Corporation Liebherr
Vortexer	MS 1 Minishaker Vibrofix VF 1 Electronic	IKA® Werke
Vakuumpumpe	N920	Roth
Waage	Mettler P 160 Ohaus LS 5000	Mettler Waagen Ohaus
Wasserbad	Memmert WB-7	Memmert
Zellzähler	Handstückzähler Premium	Hartenstein
Zentrifuge	Hettich Rotanta/RP Heraeus Biofuge pico Heraeus Megafuge 1,0 R Heraeus Biofuge fresco	Thermo Fisher Scientific

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
6-/12-/24-/96-Well-Platten (Flachboden)	Greiner bio-one
Bechergläser	Schott
Deckgläser	Marienfeld
Drigalski-Spatel	Hartenstein
Erlenmeyerkolben	Schott
FACS-Röhrchen	BD Biosciences
Fujifilm Medical X-Ray Film	Fujifilm
Inserts	Thermo Scientific
Kanülen	Becton Dickinson
Kimwipes	Sigma Aldrich
Kryoröhrchen	Nunc
Messzylinder	Schott
Nitrozellulose	Amersham Pharmacia
Objektträger	Marienfeld
Parafilm	Sigma Aldrich
Pasteur-Pipetten	Roth
PCR-Platten / Realtime-PCR-Platten	Thermo Fisher Scientific GmbH
Petrischalen (100mm, 150mm)	Sarstedt
Pipetten, Pipettenspitzen	Sarstedt, Costar
Reaktionsgefäße	Biozym Scientific Eppendorf Sarstedt
Rührfische	Hartenstein
Schraubverschlussflaschen	Schott
Schraubverschlussröhrchen	Greiner bio-one
Spritzen	Becton Dickinson
Sterilfilter (Porengröße 0,2µm; 0,45µm)	Sartorius
UV-Küvetten	Eppendorf
Zellkulturflaschen	Greiner bio-one
Zellkulturinserts	Nunc

2.1.3 Reagenzien

Produkt	Hersteller
Antibody Retrieval Solution	Dako
Antifade Reagent ProLong Gold®	Life Technologies
Antigen Retrieval Solution	Dako
Agar noble	Difco
Agarose	Biozym Scientific
Alexafluor	Invitrogen
Aqua dest	Gibco
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich
BupH Tris-HEPES-SDS Running Buffer	Pierce
Calcein	Invitrogen
4',6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI)	Invitrogen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva
DNA-Probenpuffer	Fermentas
Ethanol 70% / 96% / 99,8%	Sigma Aldrich
Ethidiumbromid (EtBr)	AppliChem
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen
Fibronektin	Sigma Aldrich
Gentamycin	Invitrogen
Hämalaun	Roth
Hygromycin	Invitrogen
Hypermount	Thermo Scientific
Isopropanol	Sigma Aldrich
Isopropyl-β-D-1-Thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma Aldrich
Kollagen Typ 1	BD
Magermilchpulver	Merck
Methanol 99,8%	Sigma Aldrich
Mykokill AB	PAA
Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (10mg/ml)	PAN-Biotech
Peroxidase Blocking Reagent	Dako
Phosphatase-Inhibitor	Roche
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma Aldrich
Polybrene	Millipore
Proteine Blocking Reagent	Dako
Tris	Roth
Triton X	Sigma Aldrich
Trypanblau	Sigma Aldrich

Produkt	Hersteller
Antibody Retrieval Solution	Dako
Trypsin/EDTA (0,5%/0,2%)	PAN-Biotech
Tween20	Sigma Aldrich
Vectashield Mounting Medium	Vector Laboratories
Vectashield Mounting Medium + Dapi	Vector Laboratories
X-Gal	Clontech
Xylol	Roth

2.1.4 Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
Lane Marker Sample Buffer 5x	Proprietary pink tracking dye in - 0,3M Tris-HCl - 5% SCD - 50% Glycerol - 100mM Dithiothreitol (DTT)
β -Gal-Solution (pH6)	- 20% Zitronensäure / Natriumphosphatlösung - 5% 100mM Ferrocyanidkalium - 5% 100mM Kaliumhexacyanidoferrat - 3% 5M NaCl - 0,2% 1M MgCl ₂
Blockierlösung für Western Blot	- 5% Magermilchpulver in 0,05% Tween20/PBS
Elektrophoresepuffer (pH 8)	- 0,1M HEPES - 0,1M Tris - 3 mM SDS } in dH ₂ O
Ponceau S	- 0,1% Ponceau S - 5% Essigsäure
RIPA-Puffer	- 50mM Tris/HCl pH8 - 150mM NaCl - 1% NP40 - 0,5% Natriumdesoxycholat - 0,1% SDS
Transferpuffer	- 70% dH ₂ O - 20% Methanol - 10% 10x Tris/Glycin

2.1.5 Zellkulturmedien

Medium	Zusammensetzung
Komplettmedium (CM)	- 500ml RPMI 1640 (Sigma Aldrich) - 50ml FCS - 5ml Penicillin (100 U/ml)/ Streptomycin (10mg/ml)
Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM)	- 500ml DMEM (Sigma Aldrich) - 50ml FCS - 100µl Hygromycin
Keratinocyte Growth Medium (KGM)-2	- 0,06mM CaCl ₂ - 10µg/ml Transferrin - 0,39 µg/ml Epinephrin - 0,125 ng/ml Epidermal Growth Factor - 0,004 mg/ml Bovine Pituitary Extract - 0,33 µg/ml Hydrocortison - 5µg/ml Insulin
Konservierungsmedium	- 50ml FCS - 5ml DMSO

2.1.6 Komplettsysteme

Bezeichnung	Hersteller
10% Precise™ Protein Gels	Thermo Scientific
GenElite™ Gel Extraction Kit	Sigma Aldrich
Pierce® BCA Protein Assay Kit	Thermo Scientific
MISSION® TRC shRNA Library	Sigma Aldrich
Pierce ECL Western-Blotting Substrate	Thermo Scientific
Qiagen® Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAamp® DNA Mini Kit	Qiagen
Restore™ Plus Western-Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific
Super Signal® Western Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific
Vybrant® CFDA SE Cell Tracer Kit	Invitrogen

2.1.7 Größenstandards

Bezeichnung	Hersteller
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Fermentas
QuickLoad® 1kb DNA Ladder	New England Biolabs

2.1.8 Antikörper

Bezeichnung	Verdünnung	Hersteller
Anti c-myc tag	1:150	abcam
Anti Mouse Antikörper (HRP-konjugiert) (Rabbit)	1:1000	Dako
Anti Rabbit Antikörper (HRP-konjugiert) (Goat)	1:1000	Dako
Ki67/MIB	1:200	Santa Cruz Biotechnology
p16INK4aINK4a F12	1:50	Thermo Scientific
p16INK4aINK4a	1:200	Cell Signalling
p16INK4aN20	1:200	Santa Cruz Biotechnology
Tubulin	1:500	Sigma Aldrich

2.1.9 Zelllinien

Name	Eigenschaften
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzellen
WMM1175_A4	Zellen aus subkutaner Melanometastase mit homozygoter Deletion der CDKN2A-Region auf Chromosom 9p21 und Expression von wildtypischem CDK4 und pRb[128].
NHEM	Normale humane epidermale Melanozyten aus juveniler Vorhaut

2.1.10 Software

Bezeichnung	Anwendung	Hersteller
Microsoft Office	Datenauswertung	Microsoft
Magelan™ Data Analysis Software	Auswertung der Proteinbestimmung	Tecan
ImageJ	Western Blot Quantifizierung	NIH

2.2 Methoden

Alle molekularbiologischen Arbeiten sowie die Arbeit mit Zellen und Bakterien wurden unter Verwendung steriler Gefäße und steriler Lösungen durchgeführt. Alle Zellkulturarbeiten wurden zusätzlich unter einer Sterilwerkbank ausgeführt.

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Zellkultur

Die Zelllinie WMM1175_A4 wurde im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Als Nährmedium wurde Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) verwendet, das mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und 125µl Hygromycin angereichert wurde. Das Medium wurde alle 2-3 Tage gewechselt. WMM1175_A4 ist eine humane Melanomzelllinie, die von einer subkutanen Melanommetastase eines Patienten mit familiär gehäufte Melanomprävalenz stammt [129]. Die Zelllinie hat eine homozygote Deletion der CDKN2A-Region auf Chromosom 9p21, exprimiert aber wildtypisches CDK 4 und pRb [128]. CDKN2A wurde mittels Transfektion stabil in die Zelllinie integriert. Mit einem Lac-Switch-Expressionssystem, das mit Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert wird, wird die Expression vom integrierten Gen CDKN2A kontrolliert: Ist IPTG vorhanden, kann das Gen abgelesen werden, und das zugehörige Protein p16INK4a wird exprimiert. Hygromycin dient zur Selektion stabil transfizierter Zellen. Die Induktion von p16INK4a-Expression durch IPTG verursacht binnen 24 Stunden einen Wachstumsarrest der Zellen. Wird der IPTG-Spiegel darüber hinaus aufrechterhalten, werden die Zellen seneszent.

WMM1175_A4 ist eine adhärenente Zelllinie, die in 75ml-Zellkulturflaschen kultiviert wird. Zum Ablösen aus der Kulturflasche wurden die Zellen zunächst mit 5-10ml PBS gewaschen, anschließend mit 1-2 ml Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) bedeckt und 1-2 Minuten bei 37°C inkubiert. Trypsin ist eine Endopeptidase, die Peptidbindungen spaltet und so die adhärenenten Zellen vom Flaschenboden löst. Nach lichtmikroskopischer Kontrolle der flottierenden Zellen wurde die Trypsinreaktion durch Zugabe der doppelten Menge von DMEM+10% FCS abgestoppt. DMEM enthält Calcium und Magnesium, welche als Trypsin-Inhibitoren fungieren. Die Zellsuspension wurde anschließend 4 Minuten bei 1200 Upm (300g) zentrifugiert, um das Trypsin von den Zellen zu entfernen. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in DMEM mit 10% FCS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:10 mit Medium verdünnt und auf neue Zellkulturflaschen verteilt.

2.2.1.2 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Die Zellsuspension mit den zu zählenden Zellen wurde zuvor mit Trypanblau im Verhältnis 1:1 gemischt. Trypanblau färbt tote Zellen an, sodass diese nicht versehentlich mitgezählt werden. Die Zählkammer hat 8 Felder, die ausgezählt wurden. Aus der Summe aller Zellen wurde der Mittelwert pro Feld bestimmt. Mit Hilfe des Kammerfaktors wurde die Zellzahl berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \bar{\varnothing} \text{ Zellzahl pro Feld} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerfaktor}$$

$$\text{Verdünnungsfaktor} = 2$$

$$\text{Kammerfaktor} = 10^4$$

2.2.1.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur längeren Lagerung wurden die Zellen bei -170°C im Stickstofftank kryokonserviert. Zu diesem Zweck wurden die Zellen aus ihren Kulturflaschen gelöst, das Medium wurde durch eine 4-minütige Zentrifugierung bei 1200 Upm von den Zellen separiert und anschließend verworfen. Das Zellpellet wurde in Konservierungsmedium (FCS + 10% DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. DMSO verhindert die Bildung von Eiskristallen beim Einfrieren, welche die Zellen zerstören würde. Sofort im

Anschluss an die Überführung der Zellen in Kryoröhrchen wurden diese bei -80°C eingefroren, bevor sie schließlich in den Stickstofftank verbracht wurden. Zur Inkulturnahme gefrorener Zellen wurden die Kryoröhrchen 3-4 Minuten im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15ml-Falconröhrchen überführt und mit 5ml DMEM aufgefüllt. Durch 4-minütiges Zentrifugieren bei 1200 Upm wurden die Zellen vom Konservierungsmedium getrennt. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in DMEM + 10% FCS aufgenommen und auf Kulturflaschen verteilt.

2.2.1.4 Induzieren von Seneszenz in der Zelllinie WMM1175_A4

Um Zellen der Linie WMM1175_A4 seneszent werden zu lassen, muss ihnen IPTG im Verhältnis 1:100 zugegeben werden. IPTG steuert die Transkription des stabil integrierten und mittels eines Lac-Switch-Expressionssystem kontrollierten Gens CDKN2A. In Anwesenheit von IPTG kann das Gen transkribiert und translatiert werden, und das zugehörige Protein p16INK4a wird exprimiert. Zur Erstellung einer Wachstumskurve, welche seneszente Zellen mit proliferierenden Zellen vergleicht, wurden jeweils $1,5 \times 10^5$ Zellen der Linie WMM1175_A4 in 75ml-Kulturflaschen ausgesät. Der Hälfte der Zellen wurden einen, zwei, drei, fünf oder sieben Tage lang IPTG zugegeben, und anschließend die Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die andere Hälfte der Zellen wurde ohne Zugabe von IPTG kultiviert. Anhand der Auszählung der Zellen in der Neubauer-Zählkammer konnte die Proliferation der Zellen ohne IPTG-Zugabe bzw. der Proliferationsarrest der Zellen mit IPTG-Zugabe gemessen werden.

2.2.1.5 β -Galaktosidase-Assay

Der am Häufigsten verwendete Biomarker für Seneszenz ist die Seneszenz-assoziierte β -Galaktosidase [92]. Das Enzym hat im sauren Milieu der Lysosomen (pH 4,0-4,5) sein Reaktionsoptimum [91]. Eine erhöhte Aktivität der β -Galaktosidase in seneszenten Zellen kann durch einen in vitro-Assay nachgewiesen werden. Da β -Galaktosidase in seneszenten Zellen sowohl höher konzentriert als auch mit höherer Aktivität vorliegt, kann der Assay auch außerhalb des Reaktionsoptimums bei pH 6 erfolgen [130]. Dazu wurden runde Deckgläser in jede Vertiefung einer 6-Well-Platte gelegt und je 1×10^5

Zellen der Linie WMM1175_A4 darauf ausgesät. Nach 5-tägiger Seneszenzinduktion mittels IPTG wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen, um die Mediumreste vollständig aus den Wells zu entfernen. Pro Well wurde 1,5ml Fumaraldehyd-Fixierlösung (2% 25%iges Fumaraldehyd in PBS) zugegeben, und die Zellen wurden für 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurde die Fixierlösung abgesaugt und die Zellen erneut drei Mal mit PBS gewaschen. Pro Well wurden dann 1,5ml β -Gal-Färbelösung (5% X Gal in β -Gal-Solution bei pH 6) hinzugegeben und über Nacht in einem Brutschrank bei 37°C inkubiert. Zu beachten ist, dass der Brutschrank über keine zusätzliche CO₂-Zufuhr verfügen darf, da sich sonst der pH der Färbelösung ändert, und die Reaktion nicht ablaufen kann. Am folgenden Tag wurde die Färbelösung abgesaugt, und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Mit Hilfe einer Kanüle konnten nun die Deckgläser aus den Wells gehoben und mit Hypermount auf einem Objektträger fixiert werden. Die Auswertung der Färbung erfolgte lichtmikroskopisch, die angefärbte β -Galaktosidase stellt sich blau dar.

2.2.1.6 Herstellung von lentiviralen Vektoren und Infektion der Zielzelle

Transfektion bezeichnet das Einbringen von Plasmiden in Lentiviren. Transduktion bezeichnet das Zusammenbringen dieser Lentiviren mit eukaryontischen Zellen. Zur Proliferation integrieren die Lentiviren ihr Genom mit dem eingebrachten Plasmid in das Genom der Wirtszelle. Auf diese Weise wird Fremdgen in die Wirtszelle verbracht und exprimiert. In dieser Arbeit wurden die Onkogene BRAF und NRAS, jeweils zur Kenntlichmachung zusammen mit grün fluoreszierendem Protein (GFP), in primäre Melanozyten transduziert. Zur sicheren Identifikation wurden die transduzierten Onkogene mittels myc-tag markiert.

2.2.1.6.1 Transfektion

Für die Transfektion wurden HEK 293T Lenti X-Zellen verwendet. Es handelt sich hierbei um humane embryonale Nierenzellen, die nach Transfektion eine hohe Proteinexpression aufweisen. Die Sublinie Lenti X zeigt außerdem einen hohen Titer bei der Lentivirus-Produktion. Die Transfektion von HEK 293 Lenti X dient der Herstellung von Viruspartikeln, die den Expressionsvektor enthalten. Der Expressionsvektor beinhaltet außerdem die Verpackungssignal Ψ , und wird gemeinsam mit drei

Helferplasmiden in die HEK 293T-Zellen verbracht. Die Helferplasmide enthalten die Gene Gag, Pol, Rev und VSV-G, die für Virusintegration, Virusverpackung und die reverse Transkriptase verantwortlich sind. Auf diese Weise entstehen Viruspartikel, die ausschließlich den Expressionsvektor tragen, aber unfähig sind, sich nach einmaliger Replikation in der Wirtszelle weiter zu vermehren, da ihnen die Gene dazu fehlen[131]. Einen Tag vor der Transfektion wurden die HEK 293T-Zellen in einer 6-Well-Platte in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen pro Well in 2ml RPMI+10% FCS ausgesät. Am nächsten Tag war eine Konfluenz von etwa 80% erreicht. Für die Transfektion wurden für jede der 6 Wells 400µl RPMI und 4µg DNA (Vektor und Helferplasmide) abgemessen und zusammen mit 6µl Turbofectamin für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Turbofectamin unterstützt die Transfektion durch die Bildung von kationischen Lipidvesikeln, mit deren Hilfe negativ geladene DNA in Zellen eindringen kann. Helferplasmide und Vektor müssen in einem bestimmten Mengenverhältnis verwendet werden, um eine möglichst hohe virale Syntheserate zu erreichen. Tabelle 2 stellt das Verhältnis von Vektor zu Helferplasmiden dar.

Tab. 2: Mengenverhältnis von Vektor und Helferplasmiden, insges. 4µg DNA

Plasmid	Relativer DNA-Anteil	Absoluter DNA-Anteil
Vektor	1	1,78µg
p59 (pRSV rev) Helferplasmid	0,25	0,44µg
p60 (pHCMV-G) Helferplasmid	0,35	0,62
p61 (pMDLg/pRRE) Helferplasmid	0,65	1,16

Im Anschluss wurden 400µl des Transfektionsgemischs in jede Well zu den HEK 293T-Zellen pipettiert und für 24h im Brutschrank (37°C, 5% CO₂) inkubiert. Pro Well wurden dann 4ml CM zugefügt und für weitere 24h im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde der Inhalt der Wells durch einen Sterilfilter in ein Greinerröhrchen überführt, um den Virusüberstand von den Zellen zu trennen. Der gewonnene Virusüberstand wurde mit 1µg/µl Polybrene versetzt. Polybrene ist ein kationisch geladenes Polymer, welches die Transduktionseffizienz stark erhöht, indem es Wechselwirkungen zwischen Zelloberfläche und viralem Capsid neutralisiert [132, 133]. Es kann sich jedoch auch zytotoxisch auswirken, weshalb die Konzentration sorgfältig gewählt werden muss [134].

2.2.1.6.2 Transduktion

Für die Transduktion des viralen Vektors in die Zielzellen wurden diese am Tag vor der Virusernte in einer Konzentration von 5×10^5 Zellen pro Well in 2ml CM einer 6-Well-Platte ausgesät, um Adhäsion der Zellen zu erreichen. Am Folgetag wurde das CM entfernt und pro Well 2ml des mit Polybrene versetzten Virusüberstands zu den Zielzellen gegeben. Nach 24stündiger Inkubation im Brutschrank (37°C , 5% CO_2) wurde das infektiöse Medium entfernt, und 4ml CM pro Well zugegeben. Es erfolgte eine weitere Inkubationsphase von 24h, danach wurde je nach Bedarf mit den Zellen weiter verfahren.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Herstellung von Whole-Cell-Lysaten

Die zu untersuchenden Zellen wurden wie gewohnt kultiviert und am Tag der Ernte aus den Kulturflaschen abgelöst, in ein 15ml-Falconröhrchen überführt und 5 Minuten bei 2000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Zellen mit 500 μl PBS gewaschen und erneut für 5 Minuten bei 2000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen. Während der folgenden Schritte wurden alle Reaktionsgefäße stets auf Eis gestellt, um eine ständige Kühlung der Zellen zu gewährleisten. Je nach Pelletgröße erfolgte eine Resuspension der Zellen in 50-200 μl RIPA-Puffer versetzt mit Phosphataseinhibitor im Verhältnis 1:10 und Proteaseinhibitor im Verhältnis 1:15. Der Ansatz wurde für 10 Minuten bei 4°C geschüttelt, anschließend erfolgte eine 5-sekündige Ultraschallbehandlung zur Vollständigen Lyse der Zellen. Wieder wurde der Ansatz für 10 Minuten bei 4°C geschüttelt und anschließend für 10 Minuten bei 10.000 Upm und 4°C zentrifugiert. Nun wurde ein Bodensatz bestehend aus Zelltrümmern sichtbar. Der Überstand wurde vorsichtig aufgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Wurde mit den Lysaten nicht weitergearbeitet, erfolgte nun eine Lagerung bei -20°C . Zur Bestimmung der Gesamtproteinmenge der Lysate wurde das Pierce[®] BCA Protein Assay Kit von Thermo Scientific verwendet. Der Assay beruht auf der nach Smith et al 1985 beschriebenen Methode [135]: Die Peptidbindungen in Proteinen vermitteln eine alkalische Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ , die sogenannte Biuret-Reaktion. Cu^+ bildet mit Bicinchoninsäure (BCA) einen purpurnen Farbkomplex mit

einem Absorptionsmaximum bei 562nm. Die Korrelation zwischen Absorption und Proteingehalt ist nahezu linear. So kann der Proteingehalt der Lysate im Vergleich zu einer Standardprobe (Rinderserumalbumin) im Plattenphotometer gemessen werden.

2.2.2.2 Eindimensionale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen entlang ihrer molekularen Masse in einem elektrischen Feld mittels Durchwanderung eines Acrylamid-Gels. Die Proben mit jeweils gleichen Proteinmengen wurden mit RIPA-Puffer auf 20µl aufgefüllt. Außerdem wurden 5µl Lane Marker Reducing Sample Buffer hinzugegeben, der unter anderem die denaturierenden Reagenzien Natriumdodecylsulfat (SDS) und Dithiothreitol (DTT) enthält. SDS denaturiert Proteine, indem es jede Aminosäure mit durchschnittlich 1,4 negativen Ladungen maskiert. Somit tragen alle Proteine eine negative Ladung, nicht-kovalente Wechselwirkungen werden gelöst und damit die Tertiär- bzw. die Quartärstruktur der Proteine zerstört. DTT zerstört durch die Spaltung von Disulfid-Brücken kovalente intra- und intermolekulare Proteinbindungen. Um den Denaturierungsvorgang zu unterstützen, werden die Zellysate zusätzlich im Heizblock für 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Lysate auf die Geltaschen geladen. In dieser Arbeit wurden 4-20%ige Polyacrylamidgele verwendet. Es wurde eine Spannung von 110V angelegt, die Auftrennung erfolgte für 1-1,5h. Anschließend wurden die Proteine mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran transferiert.

2.2.2.3 Western Blot

Der Western Blot dient der Übertragung der mittels SDS-PAGE nach molekularer Masse aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran. Dazu wird ein elektrisches Feld senkrecht zum Polyacrylamidgel angelegt. Die Proteine wandern aus dem Gel, und bleiben aufgrund von ionischen Wechselwirkungen auf der Nitrozellulosemembran haften. Das Blotten erfolgt für 70 Minuten bei 400mA. Anschließend wurde die Membran für 5 Minuten mit PBS/0,05% Tween gewaschen. Um unbesetzte Bindestellen der Proteine zu blockieren, wurde die Membran für 60 Minuten mit einer Blocklösung aus 5% Magermilchpulver/PBS/0,05% Tween behandelt. So werden unspezifische Antikörperbindungen vermieden. Es folgte ein dreimaliges Waschen der Membran mit

PBS für jeweils 5 Minuten. Dann wurde der Primärantikörper, der gegen ein Epitop des gesuchten Proteins gerichtet ist, in entsprechender Verdünnung in 5%iger Milch aufgetragen und bei 4°C über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Am Folgetag wurde nach erneutem dreimaligem Waschen der Membran für 5 Minuten mit PBS der Sekundärantikörper in einer 1:1000-Verdünnung in 5%iger Milch aufgetragen und für eine Stunde bei Zimmertemperatur inkubiert. Der Sekundärantikörper bindet an der konservierten Fc-Region des Primärantikörpers. An ihn ist außerdem an das Enzym Horseradish-Peroxidase (HRP) gekoppelt, das bei der Sichtbarmachung der Proteine mitwirkt. Wiederum wurde die Membran für 5 Minuten mit PBS gewaschen, bevor die Proteinbanden mit dem Pierce ECL Western-Blotting Substrate bzw. dem Super Signal Western Femto sichtbar gemacht wurden. Diese Reagenzien enthalten Luminol, welches katalysiert durch HRP eine Lichtreaktion ablaufen lässt. Diese Lichtreaktion hinterlässt schwarze Banden auf einem untergelegten Fotofilm. Diese Banden sind das Korrelat des untersuchten Proteins. Sollten danach noch mit einem anderen Primärantikörper inkubiert werden, wurden die Antikörper und die Proteine der Blocklösung durch 15-minütiges Waschen mit Restore™ Plus Western-Blot Stripping Buffer abgelöst. Als Ladungskontrolle wurde β -Tubulin verwendet.

2.2.3 Histologische Methoden

2.2.3.1 Herstellung von Paraffinblöcken

Um Naevi mit dem Mikrotom schneiden zu können, wurden Paraffinblöcke hergestellt. Dazu wurden die Naevi in der Einbettkassette in ein mit flüssigem Paraffin gefülltes Becherglas überführt und auf 60°C erhitzt. Dadurch wurde das Paraffin in den Einbettkassetten wieder weich, sodass der Naevus mit einer angewärmten Pinzette aus der Einbettkassette entnommen und mit einem Skalpell in der Mitte durchgeschnitten werden konnte. Eine Metallform wurde mit flüssigem Paraffin gefüllt und auf einen kühlen Untergrund platziert, sodass das Paraffin am Boden der Form langsam erstarrte. Mit der Schnittfläche nach unten wurde der Naevus auf das erstarrende Paraffin gelegt. Die Einbettkassette wurde als Blockträger verwendet. Nach 30-minütiger Inkubation bei 4°C war der Block ausgehärtet und konnte aus der Metallform entfernt werden.

2.2.3.2 Herstellung von Schnittpräparaten mittels Rotationsmikrotom

Um Schnittpräparate von den eingebetteten Naevi herzustellen, wurde ein Rotationsmikrotom verwendet. Die Paraffinblöcke wurden gekühlt in den Probenhalter eingespannt und durch Trimmen bis zu einer Tiefe offengelegt, in der ein repräsentativer Schnitt gewonnen werden konnte. Die Schnitte wurden mit einer Pinzette auf die Oberfläche von 38°C warmem Wasser überführt und von dort aus auf unbeschichtete Objektträger aufgenommen und 1 Stunde bei 42°C auf dem Heizzrockner getrocknet. Danach konnten histologische oder immunhistochemische Färbungen erfolgen.

2.2.3.3 Immunhistochemische Färbung von Zellen

Zum immunhistochemischen Nachweis einzelner Proteine wurde in jede Vertiefung einer 6-Lochplatte ein rundes Deckglaschen platziert. Anschließend wurden die zu untersuchenden Zellen wie gewohnt abgelöst und $1,2 \times 10^5$ Zellen pro Loch abgemessen. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag waren die Zellen auf den Deckglaschen adhärent. Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit 3,7% Formaldehyd in PBS für 5 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Es folgte eine Waschung der Zellen mit PBS. Anschließend wurden die Zellen für 5 Minuten bei Zimmertemperatur mit 0,5% Triton X in PBS permeabilisiert. Triton X ist ein Detergens, das Lipide aus der Zellmembran herauslöst und sie damit für Antikörper durchlässig macht [136]. Es folgte erneutes zweimaliges Waschen mit PBS und ein Blockieren unbesetzter Bindestellen von Proteinen mit einer Lösung von 10% FCS in PBS für 60 Minuten bei Zimmertemperatur. Damit werden unspezifische Antikörperbindungen vermieden. Dann wurde der Primärantikörper in entsprechender Verdünnung aufgetragen und über Nacht auf dem Schüttler inkubiert. Am Folgetag wurden die Zellen auf den Deckglaschen dreimal mit PBS gewaschen, bevor der fluoreszenzmarkierte Sekundärantikörper in entsprechender Verdünnung aufgetragen wurde. Nach 2-stündiger Inkubation auf einem Schüttler unter Lichtausschluss wurden die Zellen auf den Deckglaschen erneut 3 Mal mit PBS gewaschen und mit Antifade Reagent auf einen Objektträger aufgebracht. Die immunhistochemisch angefärbten Proteine wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

2.2.3.4 Immunhistochemische Färbung von Schnittpräparaten

Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten unter einem Abzug. Die Schnittpräparate wurden durch zwei 10-minütige Tauchbäder in Xylol entparaffiniert. Verbleibende Paraffinreste wurden durch Tauchbäder in der absteigenden Alkoholreihe entfernt und die Schnittpräparate wieder in ein wässriges Milieu überführt. Nach einem Waschgang in destilliertem Wasser wurden die Schnittpräparate mit Antigen Retrieval Solution, einem 0,01-molaren Citratpuffer bei pH 6, eingedeckt, und 40 Minuten lang bei 96-99°C im Wasserdampf erhitzt. Nach einer Abkühlzeit von 20 Minuten erfolgte ein Waschgang in destilliertem Wasser, danach ein Waschgang in PBS. Die immunhistochemische Markierung erfolgt durch Anfärbung einer Peroxidase, die kovalent an den Sekundärantikörper gebunden vorliegt. Um unspezifische Färbungen durch endogene Peroxidase im Präparat zu vermeiden, wurde das Präparat 15 Minuten mit Peroxidase Blocking Reagent inkubiert, und danach zwei Mal mit PBS gewaschen. Um freie Proteinbindestellen zu blockieren und damit unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden folgte eine 5-minütige Inkubation mit Proteine Blocking Reagent. Im Anschluss wird ohne weiteren Waschgang das Blocking Reagent abgeschüttet und der im Verhältnis 1:400 in Antibody Retrieving Solution verdünnte Primärantikörper aufgetragen. Die Antikörperinkubation erfolgte in einer feuchten, dunklen Kammer bei 4°C über 24 Stunden. Am nächsten Tag wurden die Schnittpräparate mit PBS gewaschen. Der HRP-markierte Sekundärantikörper wurde in entsprechender Verdünnung aufgetragen und für 30 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgten zwei Waschgänge mit PBS. Danach wurde das Peroxidase-Chromogen Vector VIP aufgetragen, welches die an den Sekundärantikörper gebundene Peroxidase anfärbt. Es folgten ein weiterer Waschgang mit destilliertem Wasser und eine 30-sekündige Färbung mit Hämalaun, um die anderen Zellstrukturen zu kontrastieren. Danach wurden die Schnittpräparate gründlich mit Leitungswasser gespült, kurz in destilliertes Wasser getaucht, und in der aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Zur Fixierung wurden die gefärbten Schnittpräparate mit Hypermount behandelt und mit einem Deckglas eingedeckt. Die Präparate wurden über Nacht unter dem Abzug getrocknet und konnten am Folgetag unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden. Tabelle 3 gibt einen Überblick über die einzelnen Arbeitsschritte.

Tab. 3: Immunhistochemische Färbung von Schnittpräparaten

Reagenz	Zeit	Funktion
Xylol	10 min	Entparaffinieren
Xylol	10 min	
Ethanol 96% (v/v)	10 min	
Ethanol 96% (v/v)	10 min	
Ethanol 70% (v/v)	10 min	
Ethanol 50% (v/v)	10 min	
dH ₂ O	10 min	
Antigen Retrieval Solution	40 min	Puffern
-	20 min	Abkühlen
dH ₂ O	1 min	Waschen
PBS	1 min	Waschen
Peroxidase Blocking Reagent	15 min	Blocken der endogenen Peroxidase
Primärantikörper	24 h	Markierung der gesuchten Proteine
PBS	1 min	Waschen
Sekundärantikörper	30 min	Markierung des Primärantikörpers
PBS	2 x 1 min	Waschen
Vector VIP	10 min	Anfärben der Peroxidase
dH ₂ O	1 min	Waschen
Hämalaun	30 sec	Kontrastieren
Leitungswasser	10 min	Waschen
dH ₂ O	1 min	Waschen
Ethanol 50% (v/v)	10 min	Entwässern
Ethanol 70% (v/v)	10 min	
Ethanol 96% (v/v)	10 min	
Ethanol 96% (v/v)	10 min	
Hypermount	-	Eindecken

2.2.3.5 Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Schnittpräparaten

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (H.E.-Färbung) ist ein Standardverfahren in der Histologie. Das basische Hämalaun färbt saure Strukturen wie den Zellkern blau. Das saure Eosin färbt basischen Strukturen wie Zellplasmaproteine, Mitochondrien und Kollagen rot [137]. Alle folgenden Arbeitsschritte erfolgten unter einem Abzug. Vor der Färbung mussten die Schnittpräparate von Paraffin befreit werden. Dazu erfolgten zwei 10-minütige Bäder der Schnittpräparate in Xylol. Das verbleibende Paraffin wurde durch Tauchbäder der Präparate in einer absteigenden Alkoholreihe vollständig entfernt, und die Schnitte wieder in ein wässriges Milieu überführt. Nach einem Waschgang in destilliertem Wasser erfolgte die Färbung der Schnittpräparate für 8 Minuten in Hämalaun. Überschüssiger Farbstoff wurde unter fließendem Leitungswasser abgespült, danach wurde die Färbung durch ein kurzes Eintauchen in eine HCl-Lösung differenziert. Anschließend wurden die Schnittpräparate für 5 Minuten in Leitungswasser getaucht. Die dabei stattfindende Erhöhung des pH vermittelt den Farbumschlag von rotbraun zu blauviolett. Danach erfolgte die Eosinfärbung des Zytoplasmas. Dazu wurden die Schnitte für 1 Minute in Eosin getaucht. Überschüssiger Farbstoff wurde unter fließendem Leitungswasser abgespült. Es folgten Tauchbäder der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe, um den Schnitten Wasser zu entziehen. Um die gefärbten Schnittpräparate haltbar zu machen, wurden sie mit Isomount behandelt und mit einem Deckglas eingedeckt. Die Präparate wurden über Nacht unter dem Abzug getrocknet und konnten am Folgetag unter dem Lichtmikroskop betrachtet werden.

Tab. 4: Hämatoxylin-Eosin-Färbung von Schnittpräparaten

Reagenz	Zeit	Funktion
Xylol	10 min	Entparaffinieren
Xylol	10 min	
Ethanol 96% (v/v)	10 min	
Ethanol 96% (v/v)	10 min	
Ethanol 70% (v/v)	10 min	
Ethanol 50% (v/v)	10 min	
dH ₂ O	10 min	
Hämalaun	8 min	Hämalaun-Färbung
Leitungswasser	1 min	
HCl-Lösung	2x eintauchen	
Leitungswasser	5 min	Bläuen
Eosin	1 min	Eosin-Färbung

Leitungswasser	1 min	
Ethanol 50% (v/v)	10 min	Entwässern
Ethanol 70% (v/v)	10 min	
Ethanol 96% (v/v)	10 min	
Ethanol 96% (v/v)	10 min	
Isomount		Eindecken

Die auf Objektträgern befindlichen Paraffinschnitte werden durch ein 2x 10minütiges Bad in Xylol entparaffiniert und anschließend in der absteigenden Alkoholreihe wieder in ein wässriges Milieu überführt: Hierzu werden die Schnitte 2x 10 Minuten in 100% Ethanol, 10 Minuten in 96% Ethanol und 10 Minuten in 70% Ethanol getaucht. Nach einem Waschgang in destilliertem Wasser werden die Schnitte in Antigen Retrieval Solution (DAKO), einem 0,01-molaren Citratpuffer bei pH6, 40 Minuten bei 96-99 °C im Wasserdampf erhitzt. Nach einer Abkühlzeit von 20 Minuten erfolgt ein Waschgang in destilliertem Wasser sowie in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 12 mM Phosphat, pH 7,4).

2.2.4 DNA-analytische Methoden

2.2.4.1 DNA-Isolierung aus Zellen

Die DNA-Isolierung erfolgte unter Verwendung des QIAamp Mini Kit. Die Zellen wurden wie gewohnt abgelöst und für 6 Minuten bei 1.600 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 200µl PBS resuspendiert und in ein 1,5ml-Eppendorftube überführt. 20µl Proteinase K und 200µl AL-Puffer wurden zugegeben, durch Vortexen kurz vermischt, und bei 56°C im Heizblock für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 200µl Ethanol zugefügt. Es folgte eine 15-sekündige Ultraschallbehandlung zur Lyse der Zellen, danach wurde für 1 Minute bei 1.000 Umdrehungen zentrifugiert. Die Lösung wurde in eine QIAamp spin column überführt und für 1 Minute bei 8.000 Upm zentrifugiert. Das Sammel tube der spin column wurde mit der darin enthaltenen Flüssigkeit verworfen. Die Säule wurde in ein neues Sammel tube gestellt. 500µl AW1-Puffer wurden zugefügt und 1 Minute bei 8.000 Upm zentrifugiert. Wiederum wurde das Sammel tube mit der darin enthaltenen Flüssigkeit verworfen, und die Säule in ein neues Sammel tube gestellt. 500µl AW2-Puffer wurde

zugefügt, es folgte eine 3-minütige Zentrifugation bei 14.000 Upm. Zur Elution wurde die Säule in ein 1,5ml-Eppendorftube gestellt, 50µl AE-Puffer zugefügt und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 Minute bei 8.000 Upm zentrifugiert. Die Säule wurde verworfen. Der DNA-Gehalt der isolierten DNA wurde mittels Plattenphotometer gemessen. Danach wurde die isolierte DNA bei -20°C eingefroren.

3. Ergebnisse

3.1 Konsekutive Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs in primären humanen Melanozyten

3.1.1 Etablierung eines lentiviralen Vektorsystems zum Gentransfer in humane Melanozyten

Zu Beginn der Arbeit wurde eine Methode zum lentiviralen Gentransfer in primäre humane Melanozyten etabliert. Hierzu wurden wie im Abschnitt Methoden beschrieben Lentiviren als Vektoren der Onkogene BRAF^{V600E} und NRAS^{Q61K} generiert. Um die Auswirkung der Expression dieser Onkogene zu charakterisieren, wurden BRAF^{V600E} und NRAS^{Q61K} mit Hilfe der oben genannten Methoden in primären Melanozyten lentiviral transduziert. Als Expressionskontrolle wurden jeweils Vektoren verwendet, die neben den Onkogenen auch das grün fluoreszierende Protein (GFP) kodieren. Die Expression des GFP-Reportergens ist fluoreszenzmikroskopisch leicht nachweisbar. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass Zellen, die nach Infektion grün fluoreszieren, erfolgreich infiziert wurden.

3.1.2 Etablierung von optimalen Versuchsbedingungen

Um optimale Versuchsbedingungen zu erzielen, wurden ausführliche Vorversuche durchgeführt. Zunächst wurde die optimale *multiplicity of infection* (MOI) ermittelt. Hierbei handelt es sich um das Verhältnis von Virus zu Zielzelle, das folgendermaßen berechnet wird [138]:

$$MOI = \frac{\text{Volumen (Virus)} \times \text{Konzentration (Virus)}}{\text{Volumen (Zellkultur)} \times \text{Konzentration (Zellkultur)}}$$

Abbildung 3 stellt dar, dass mit einer 24-stündige Behandlung primärer Melanozyten mit virushaltigem Medium (MOI 15) eine Transduktionsrate von 65% erreicht werden kann. Im Folgenden wurde versucht, die Transduktionsrate durch Zugabe von Polybrene zu steigern. Polybrene ist ein kationisch geladenes Polymer, das wie Wechselwirkung zwischen Zelloberfläche und viralem Kapsid neutralisiert und so das Eindringen der Lentiviren in die Zelle erleichtert [132, 133]. Da Polybrene auch zytotoxische Effekte zeigt, muss es sorgfältig dosiert werden [134]. Durch Zugabe von 4µg/ml Polybrene zum virushaltigen Medium (MOI 15) konnte die Infektionsrate deutlich gesteigert werden. 48 Stunden nach Exposition der Melanozyten mit dem virushaltigen Medium konnte in knapp über 80% der Zellen das Reportergen GFP nachgewiesen werden. Dementsprechend wurden eine MOI von 15 und die Verwendung von 4 µg/ml Polybrene als Versuchsstandard festgelegt.

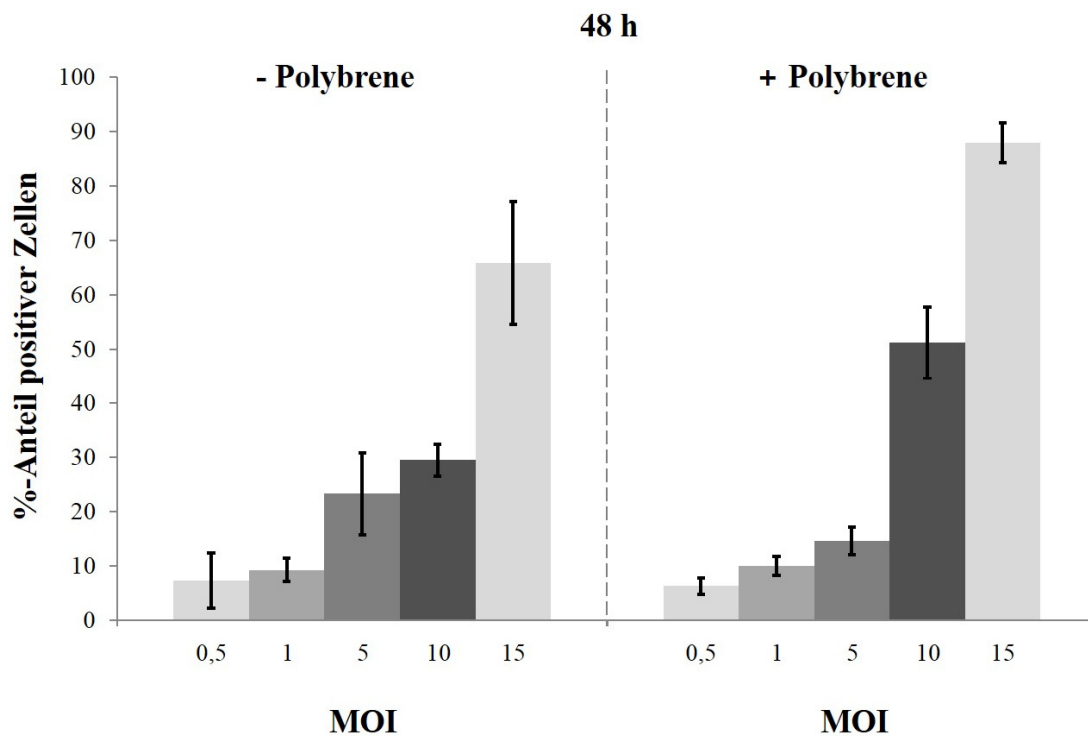
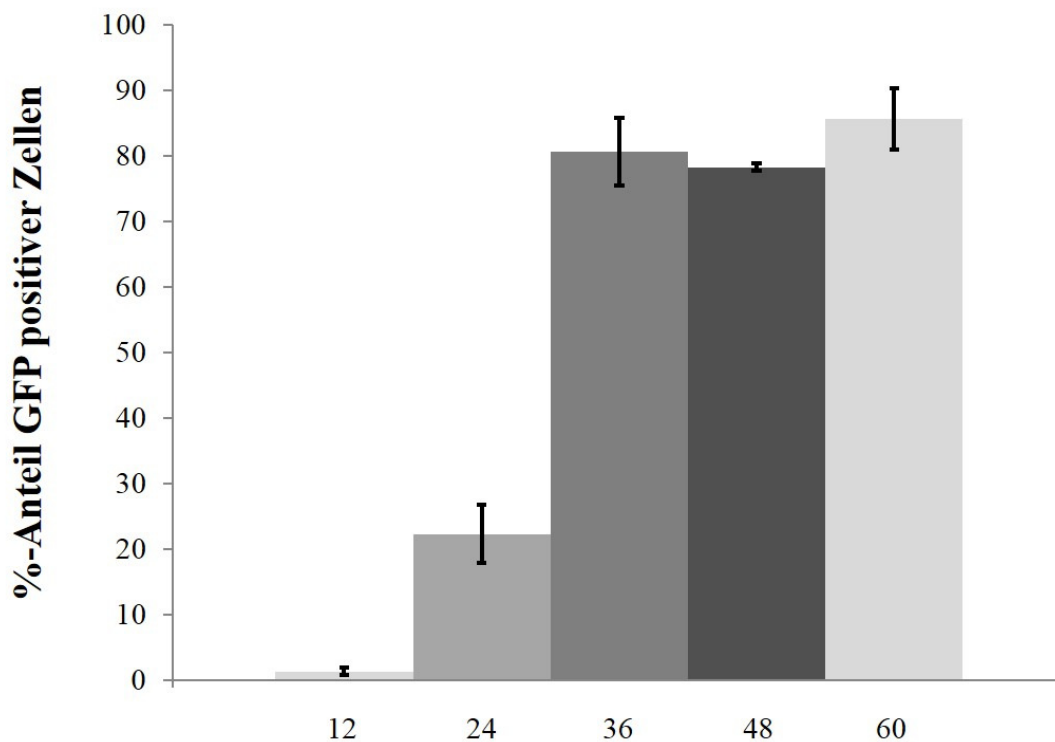


Abb. 3: Experimentelle Evaluation der optimalen MOI in An- und Abwesenheit von 4 μ g/ml Polybrene bei 24-stündiger Inkubation der Zellen mit virushaltigem Überstand. Die Expression des GFP-Reportergens wurde 36 Stunden nach Exposition der Zellen mit dem virushaltigen Überstand untersucht.

Als nächstes wurde die Expression der Zielproteine im zeitlichen Verlauf bei 24-stündiger Exposition der Melanozyten mit dem Virusüberstand (4 μ g/ml Polybrene, MOI 15) untersucht. Abbildung 4 zeigt, dass 36 Stunden nach Wechsel von virushaltigem auf virusfreies Medium etwa 80% der Melanozyten das Reportergen GFP exprimieren. Ein längerer Zeitverlauf erhöht diese Rate nur noch unwesentlich.



Stunden nach Exposition mit virushaltigem Überstand

Abb. 4: Expression des GFP-Reporterproteins im zeitlichen Verlauf. Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurden die Viruspartikel durch Waschen der Zellen mit PBS, gefolgt von einem Mediumwechsel, entfernt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil GFP-exprimierender Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Mediumwechsel.

Im Anschluss sollte die Frage adressiert werden, ob eine längere Inkubationszeit der Melanozyten mit dem Virusüberstand mit einer höheren Infektionsrate einhergeht. Die zuvor ermittelte optimale MOI von 15 sowie der Einsatz von Polybrene (4µg/ml) fanden in diesem Versuch Anwendung. Abbildung 5 zeigt, dass nach einer 24-stündigen Inkubationszeit der Zielzellen mit dem Virusüberstand etwa 80% der Zielzellen GFP exprimieren und damit erfolgreich infiziert wurden. Die Analyse wurden entsprechend der Vorversuche 36 Stunden nach Wechsel auf virusfreies Medium durchgeführt. Längere Inkubationszeiten der Zielzellen mit dem Virusüberstand erzielten keine Verbesserung dieser Rate. Eine Inkubationszeit von 24 Stunden wurde daher als Versuchsstandard festgelegt.

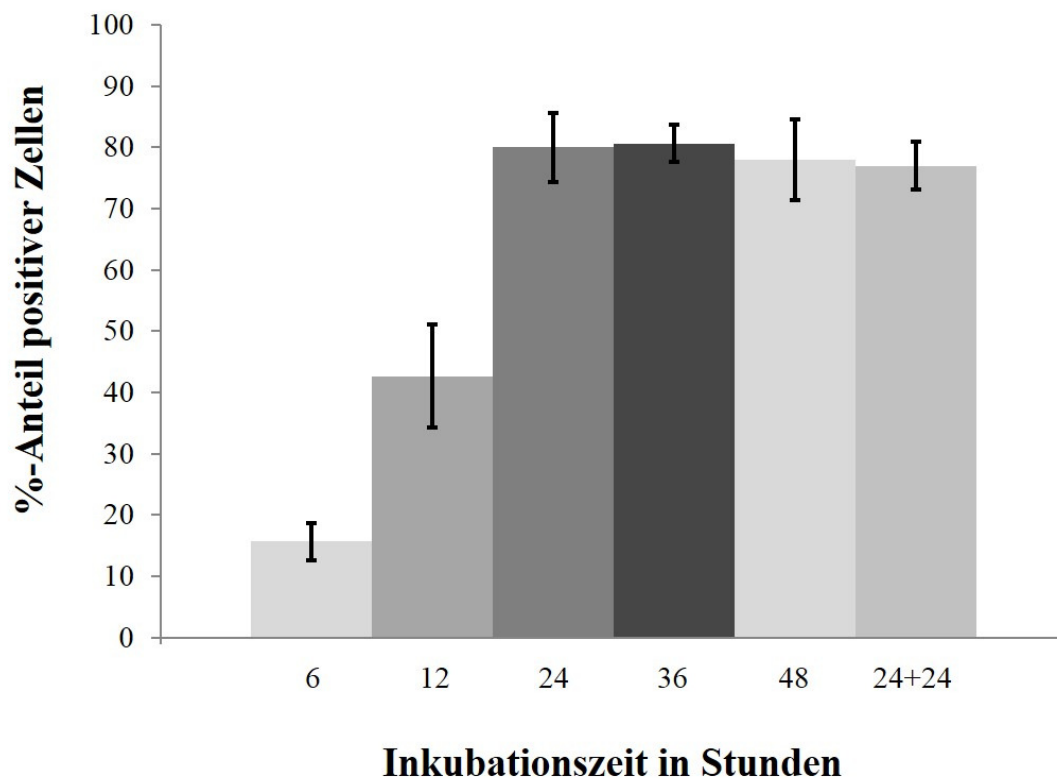


Abb. 5: Experimentelle Evaluation der optimalen Inkubationszeit mit Virusüberstand unter Zugabe von Polybrene 4µg/ml. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurden die Viruspartikel durch Waschen der Zellen mit PBS, gefolgt von einem Mediumwechsel, entfernt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil GFP-exprimierender Zellen 36 Stunden nach Mediumwechsel.

3.2 Effekte einer onkogen-vermittelten, konsekutiven Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs auf primären humanen Melanozyten

Nach Abschluss der Vorversuche wurden die Onkogene BRAF^{V600E} und NRAS^{Q61K} unter den ermittelten Versuchsbedingungen (MOI 15, Polybrene 4µg/ml, 24-stündige Inkubation mit Virusüberstand) zusammen mit dem GFP-Reporter gen in primäre Melanozyten transduziert. Als Kontrolle wurde ein GFP-Leervektor unter den gleichen Bedingungen transduziert. Ziel dieser Experimente war es, die Effekte bzw. Unterschiede einer BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-vermittelten MAP-Kinase-Aktivierung zu untersuchen. Im Western Blot (Abbildung 6) zeigt sich eine Onkogen-vermittelte Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs angezeigt durch die Hyperphosphorylierung von ERK.

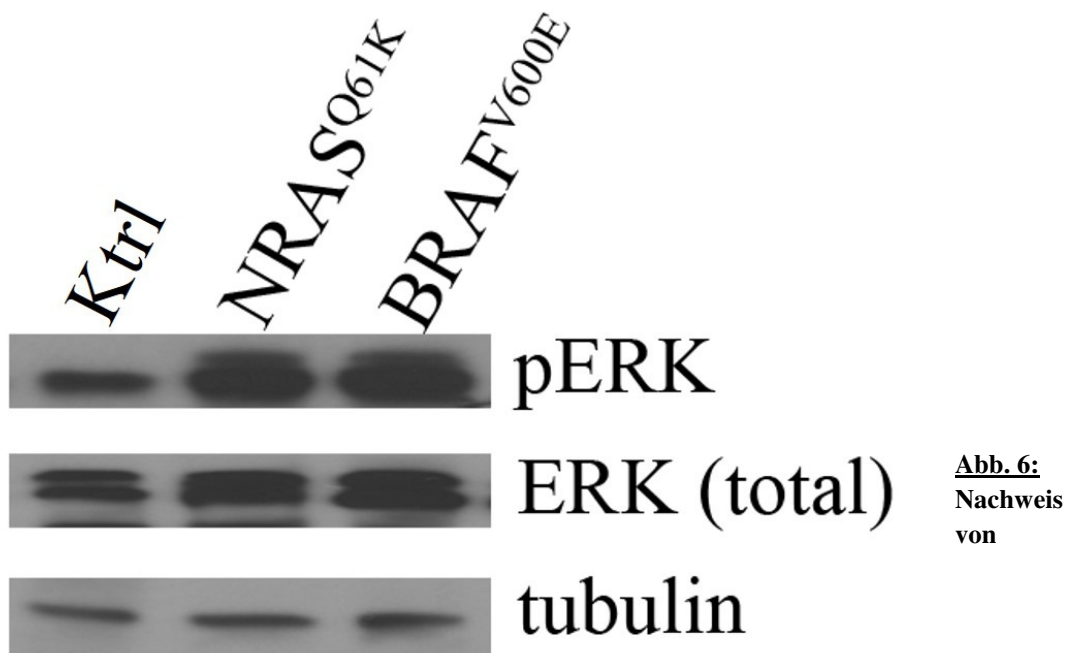


Abb. 6:
Nachweis
von

hyperphosphoryliertem ERK (pERK) in BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten und der Kontrolle (GFP) im Western Blot. Tubulin wurde als Ladungskontrolle verwendet.

3.2.1 Wachstumsverhalten von BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden Melanozyten

Um die Auswirkungen der Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurden Wachstumskurven erstellt. Die in Abbildung 7 dargestellte Proliferationskurve zeigt, dass BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierende Melanozyten über den Untersuchungszeitraum von 10 Tagen ihre Proliferationsaktivität nahezu gänzlich einstellen, wohingegen die GFP-exprimierenden Kontrollzellen eine kontinuierliche Vermehrung aufweisen. Das Ki67-Protein ist in humanen Zellen in der aktiven Phase des Zellzyklus, also in der G₁-, S-, G₂- und der Mitosephase, nachweisbar und markiert die sogenannte Wachstumsfraktion von Zellen. Ruhende Zellen in der G₀-Phase exprimieren Ki67 nicht [139]. Erwartungsgemäß ist Ki67 in seneszenten Zellen auch nicht nachweisbar, da seneszente Zellen sich nicht in einer aktiven Phase des Zellzyklus befinden. Im Zusammenhang mit anderen Parametern kann also die Abwesenheit von Ki67 als Seneszenzmarker verstanden werden [140]. Um die Proliferationsrate der BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten

zu messen, wurde Ki67 wie in Abbildung 8 A dargestellt mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Die Kontrollzellen (Ktrl) zeigen ein deutliches Fluoreszenzsignal als Zeichen der aktiven Zellproliferation. In den BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten ist das Fluoreszenzsignal als Zeichen der stagnierenden Zellproliferation deutlich reduziert. Abbildung 8 B stellt den prozentualen Anteil Ki67-positiver Zellen in BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten sowie in den Kontrollzellen (Ktrl) dar. In der Population der mit dem Leervektor transduzierten Kontrollmelanozyten weisen im kompletten Beobachtungszeitraum zwischen 40 und 50% der Zellen eine Positivität für den Proliferationsmarker Ki67 auf. In den BRAF^{V600E}-exprimierenden primären Melanozyten hingegen liegt die Rate der Ki67-positiven Zellen bereits 3 Tage nach der Transduktion des Onkogens bei nur 14% und reduziert sich weiter auf 2% der Zellen nach 12 Tagen. Die Rate der Ki67-Expression der NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten liegt 3 Tage nach der Virusbehandlung bei 17%, reduziert sich nach 7 Tagen auf 3% und fällt nach 12 Tagen weiter auf 2% ab.

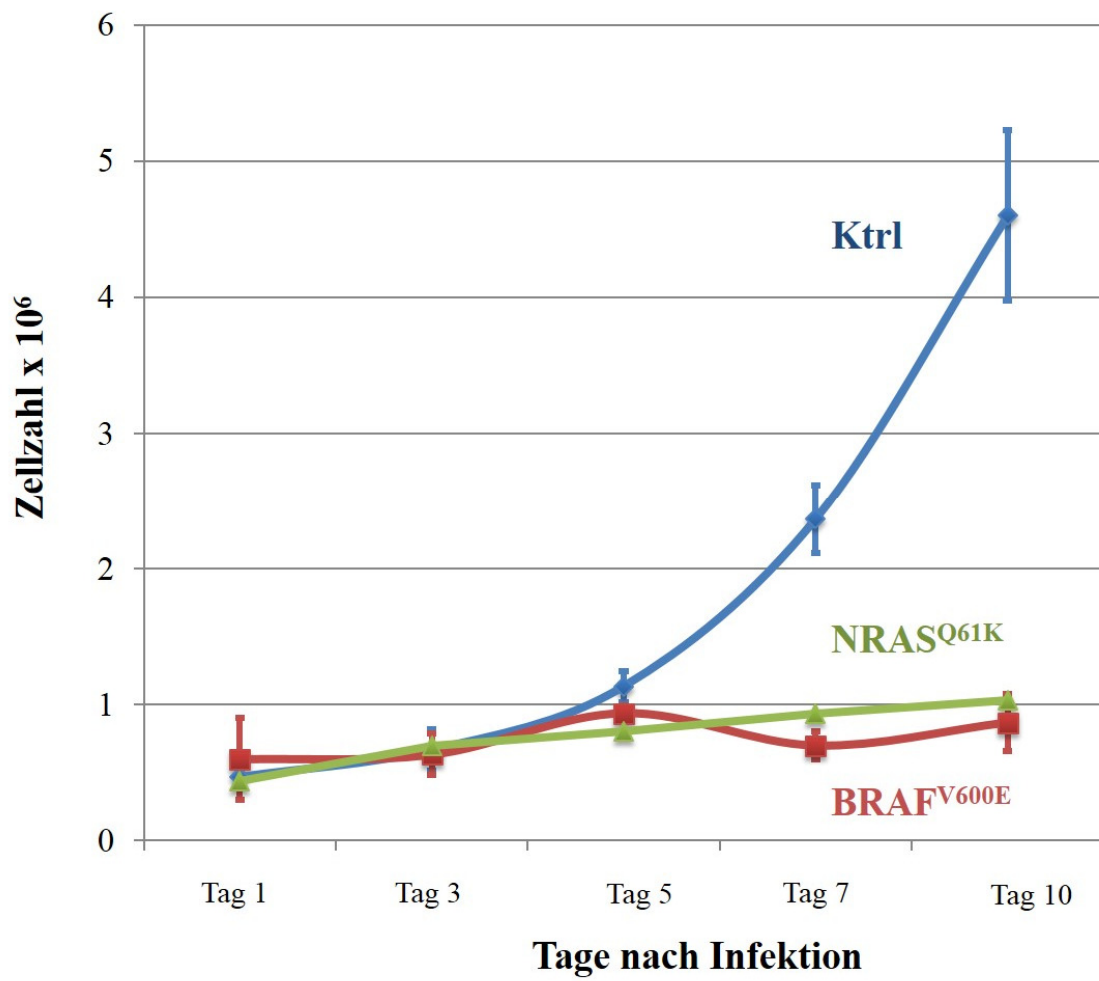


Abb. 7: Proliferationskurve von BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten sowie der Kontrolle (Ktrl).

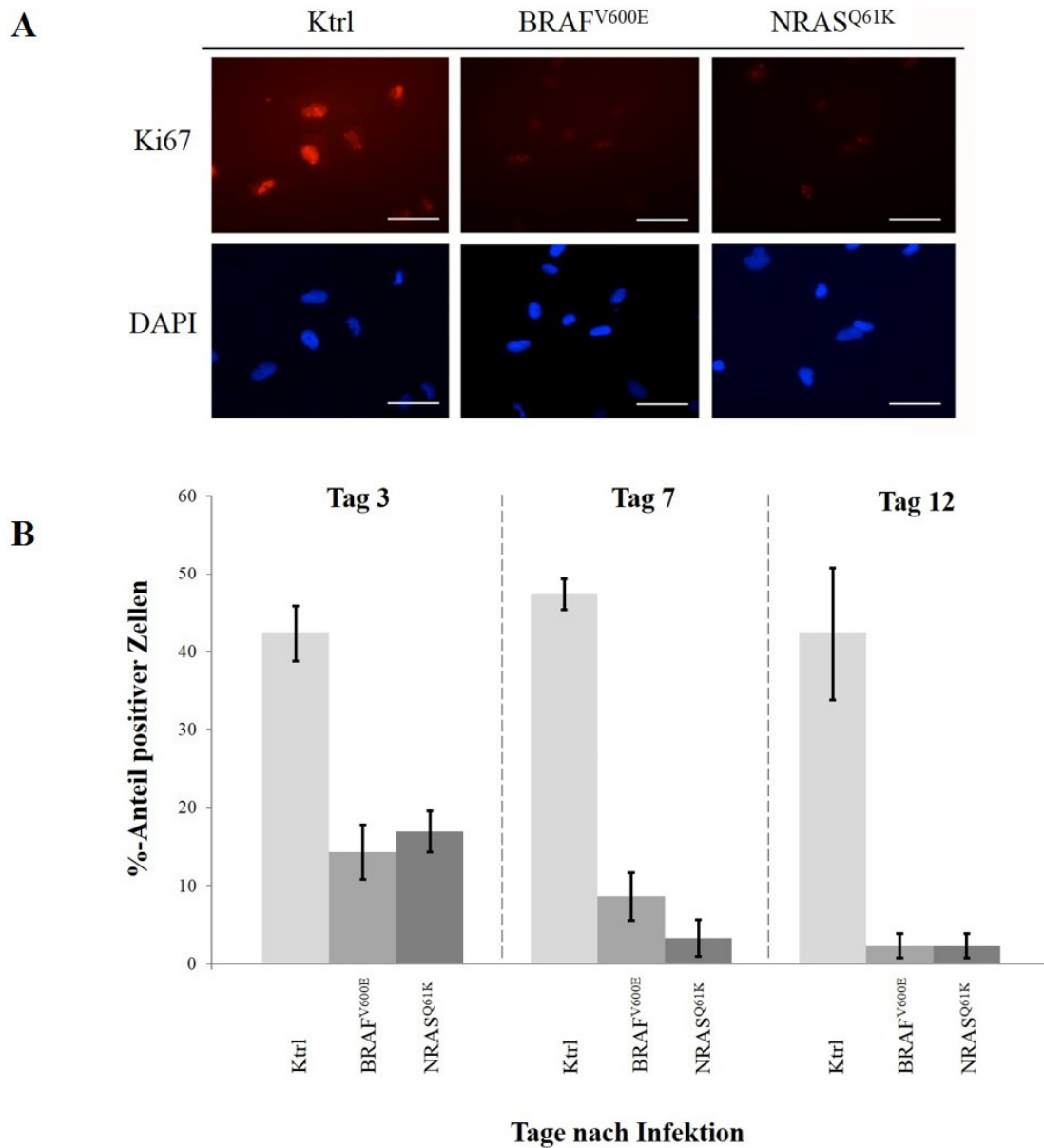


Abb. 8

A) Immunfluoreszenz von Ki67 und DAPI-Färbung.

B) Prozentualer Anteil von Ki67 in BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten und den Kontrollmelanozyten (Ktrl).

3.2.2 Onkogen-induzierte Seneszenz in primären Melanozyten

Dass Onkogene im Allgemeinen und BRAF^{V600E} und NRAS^{Q61K} im Speziellen zelluläre Seneszenz auslösen können, ist in der Literatur beschrieben [35, 75, 103, 141-144]. Um nachzuweisen, dass die Expression von BRAF^{V600E} und NRAS^{Q61K} in den wachstums-arretierten primären Melanozyten tatsächlich zur Seneszenz führt, wurde die Zellen auf das Vorhandensein etablierter Seneszenzmarker untersucht. Zusätzlich sollten Unterschiede einer BRAF- bzw. NRAS-vermittelten MAP-Kinase-Kaskade-Aktivierung herausgearbeitet werden.

Der Nachweis einer erhöhten Aktivität der Seneszenz-assoziierten β -Galaktosidase ist ein etablierter Seneszenzmarker [92, 93, 130]. Abbildung 9 A illustriert den anhand einer blauen Färbung nachvollziehbaren Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität von BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden Melanozyten sowie der Kontrollzellen im mikroskopischen Hellfeld und im Phasenkontrast. Ein blauer Farbumschlag ist Indikator für die Enzymaktivität der β -Galaktosidase bei einem pH von 6,0. In den Kontrollzellen (Ktrl) ist keine Blaufärbung zu erkennen, während die BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden Zellen deutlich positiv angefärbt sind. Abbildung 9 B stellt den prozentualen Anteil der Zellen mit einer erhöhten Aktivität der lysosomalen β -Galaktosidase dar. Die Messungen erfolgten an Tag 3, 7 und 12 nach dem lentiviralen Gentransfer in primäre Melanozyten. Die Kontrollzellen zeigen über den gesamten Untersuchungszeitraum mit weniger als 5% einen sehr geringen Anteil mit erhöhter β -Galaktosidase-Aktivität. 7 Tage nach der Transduktion des BRAF^{V600E}-Onkogens zeigen hingegen 11% der primären Melanozyten eine erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität. Nach 12 Tagen Zellkultur ist mit 46% nahezu die Hälfte aller BRAF^{V600E}-exprimierende primäre Melanozyten positiv für diesen Seneszenzmarker. Ein ähnliches Ergebnis präsentieren die NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten: 7 Tage nach Transduktion des Onkogens zeigen 45% der Zellen eine erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität. Nach 12 Tagen nimmt dieser Anteil weiter auf 62% zu. Damit führt sowohl die Expression von BRAF^{V600E} als auch die Expression von NRAS^{Q61K} in primären Melanozyten zu einer erhöhten Aktivität des Seneszenzmarkers β -Galaktosidase.

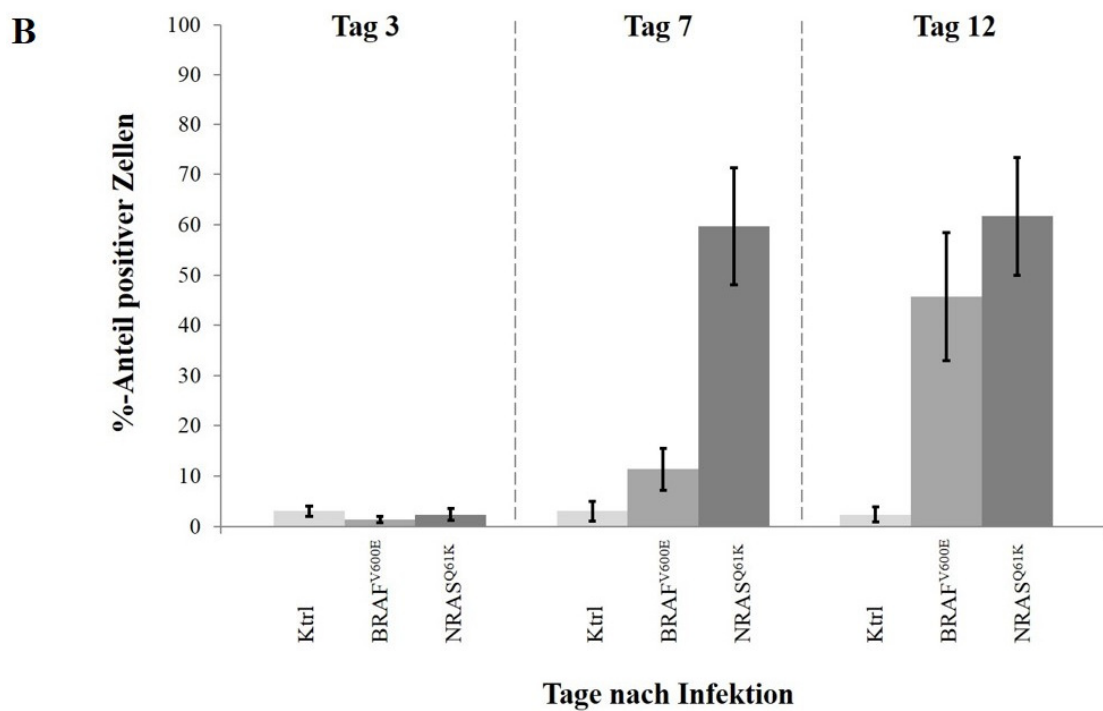
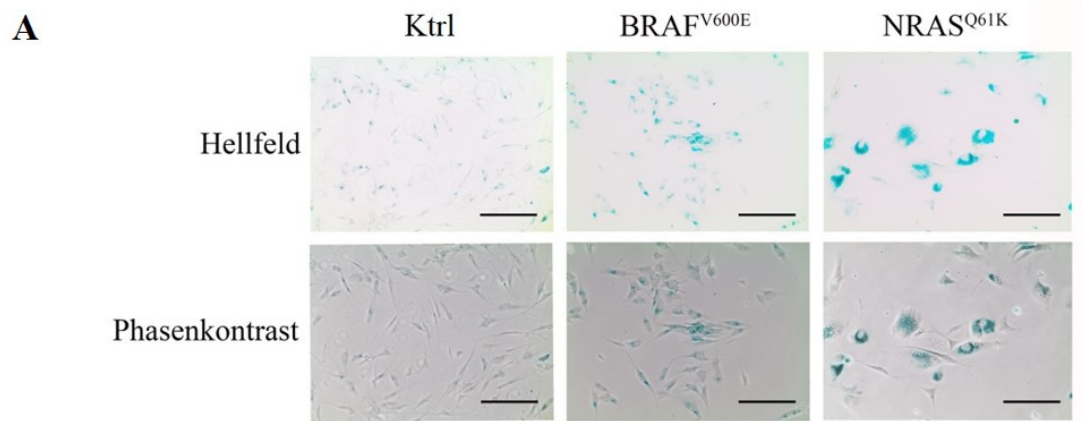


Abb. 9:

A) β -Galaktosidase-Assay. Maßstableiste entspricht 100 μ m.

B) Prozentualer Anteil der Zellen mit erhöhter β -Galaktosidase-Aktivität in BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden Melanozyten und den Kontrollzellen (Ktrl).

3.2.3 Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci (SAHF)

Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci sind ein Charakteristikum der zellulären Seneszenz [94, 145, 146]. Um die Anzahl an SAHF in BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten zu evaluieren, wurden DAPI-Kernfärbungen angefertigt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Ab 5 erkennbaren Heterochromatin-Foci pro Zellkern wurde dieser als positiv gewertet. Abbildung 10 A zeigt eine DAPI-Färbung eines Zellkerns einer Kontrollzelle und eines BRAF^{V600E}- bzw. NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten. Der Zellkern der Kontrollzelle erscheint homogen, während die Zellkerne der BRAF^{V600E}- bzw. NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten inhomogen und mit unterschiedlich großen Knötchen – den Seneszenz-assoziierten Heterochromatin-Foci – zur Darstellung kommen. Abbildung 10 B stellt den prozentualen Anteil an Heterochromatin-positiv gewerteten Zellen unter den BRAF^{V600E}- bzw. NRAS^{Q61K}-exprimierenden Zellen im Vergleich zur Kontrolle (Ktrl) dar. In den Zellkernen der Kontrollzellen sind nahezu keine Heterochromatin-Foci nachzuweisen. Von den BRAF^{V600E}-exprimierenden Melanozyten weisen 7 Tage nach Transduktion des Onkogens 10% der Zellen Heterochromatin-Foci auf. Nach 12 Tagen Zellkultur steigt die Rate auf 45% weiter an. In der NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozytenkultur sind 7 Tage nach Transduktion des Onkogens in 25% aller Zellen im Zellkern Heterochromatin-Foci zu erkennen. Nach 12 Tagen präsentieren 60% aller Zellen Heterochromatin-Foci. Aus diesem Ergebnis kann der Schluss gezogen werden, dass sowohl die Expression von NRAS^{Q61K} als auch die von BRAF^{V600E} in primären Melanozyten zu einer Zunahme der SAHF-Aktivität führt.

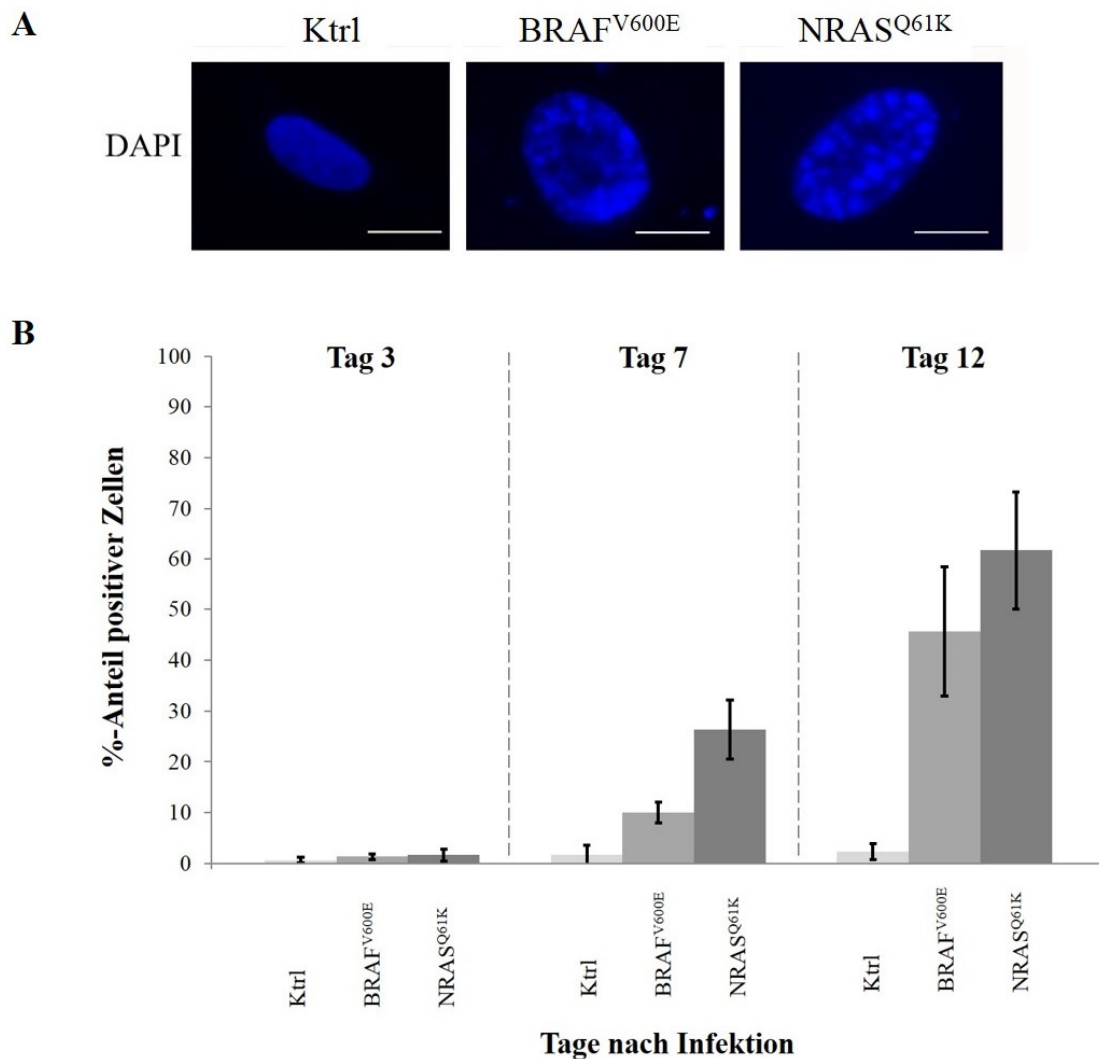


Abb. 10:

A) DAPI-Färbung, Darstellung von Seneszenz-assoziierten Heterochromatin-Foci (SAHF) in BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten sowie der Kontrolle (Ktrl).

B) Vergleich der prozentualen Anzahl von Seneszenz-assoziierten Heterochromatin-Foci (SAHF) in BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten sowie der Kontrolle (Ktrl).

3.2.4 Expression von BRAF^{V600E} und NRAS^{Q61K} führt in primären Melanozyten zur Bildung von Riesenzellen

Die morphologische Veränderung von Zellen hin zu einem ausgedehnten, vakuolenreichen Zytoplasma und großen, gelappten oder sogar mehrfach vorliegenden Zellkernen ist ein weiteres Charakteristikum der zellulären Seneszenz. Um die Anzahl dieser sogenannten Riesenzellen in BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden Zellen zu evaluieren, wurden GFP-Aufnahmen angefertigt, und unter dem

Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Alle Zellen mit einem Maß von mindestens 150 µm in Länge und Breite wurden als Riesenzelle gewertet und ausgezählt. Abb. 11 A zeigt eine Phasenkontrastaufnahme sowie GFP der BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten und der Kontrollzellen (Ktrl). Kontrollzellen und BRAF^{V600E}-exprimierende Zellen sind schlank und spindelförmig, die Aufnahme der NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten zeigt eine Riesenzelle mit ausgedehntem Zytoplasma und doppeltem Zellkern. Abbildung 11 B stellt den prozentualen Anteil an Riesenzellen unter BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten sowie der Kontrolle (Ktrl) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem lentiviralen Gentransfer dar. Unter den Kontrollzellen finden sich über alle 3 Beobachtungszeiträume bereits 1-3% Riesenzellen, was ein bekanntes Artefakt der zweidimensionalen Zellkultur ist [147]. Unter den BRAF^{V600E}-exprimierenden primären Melanozyten finden sich nach 3 Tagen Zellkultur etwa 5% Riesenzellen, der Anteil steigt jedoch auch nach 12 Tagen Zellkultur nur knapp über 10% an. NRAS^{Q61K}-exprimierende primäre Melanozyten präsentieren nach 3 Tagen Zellkultur 7% Riesenzellen, nach 7 Tagen Zellkultur steigt der Anteil deutlich auf 60% an, und verändert sich auch nach 12 Tagen Zellkultur nicht mehr. Es zeigt sich hier deutlich, dass die Expression des Onkogens NRAS^{Q61K} einen wesentlich größeren Einfluss auf die Zellmorphologie nimmt, als BRAF^{V600E}.

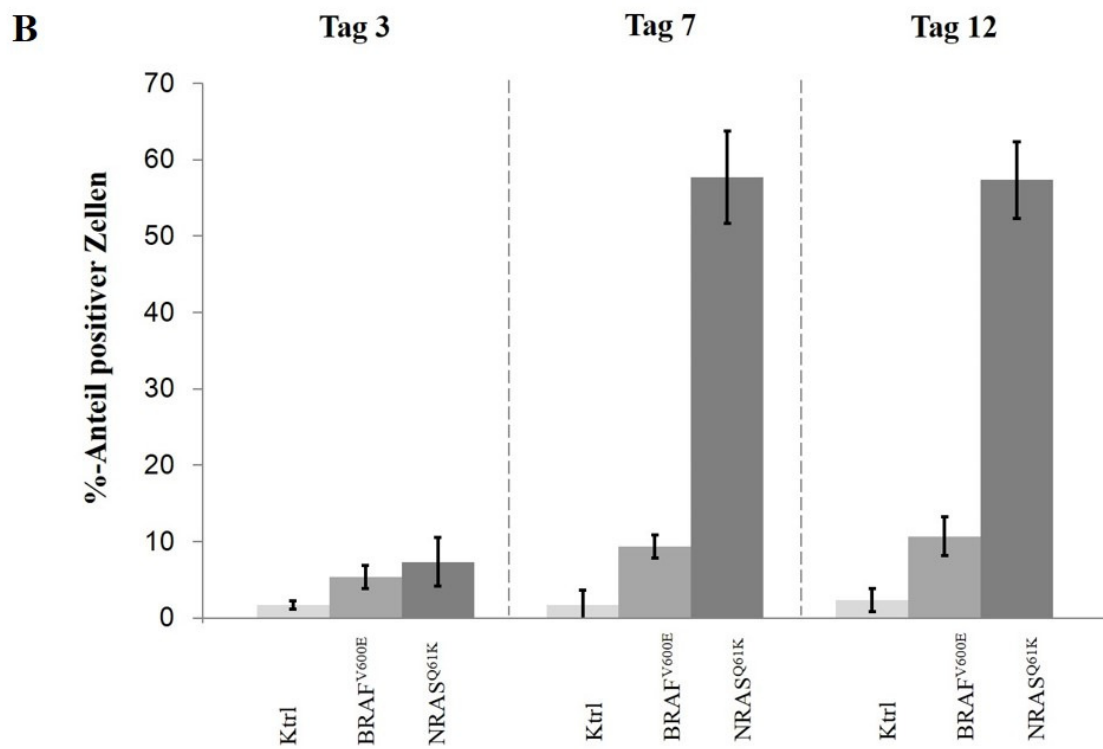
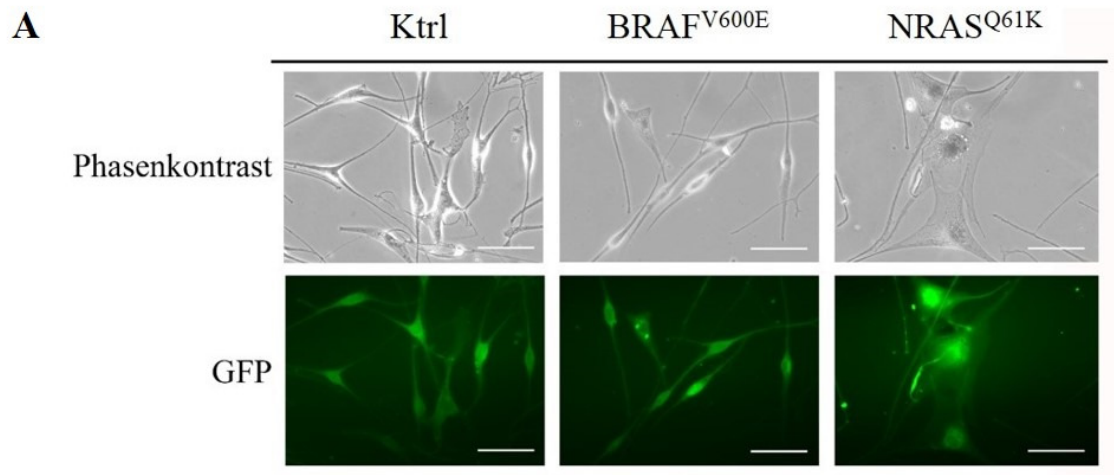


Abb. 11:

A) Phasenkontrastaufnahme und GFP von spindelförmigen Zellen (Ktrl, BRAF^{V600E}) und einer Riesenzelle (NRAS^{Q61K}). Maßstableiste entspricht 100µm.

B) Vergleich der prozentualen Anzahl von Riesenzellen in BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten sowie der Kontrolle (Ktrl).

3.3 BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierende primäre Melanozyten sind phänotypisch unterschiedlich

Im vorangehenden Abschnitt wurden die Auswirkungen einer Expression der Onkogene BRAF^{V600E} und NRAS^{Q61K} in primären Melanozyten untersucht und miteinander verglichen. Sowohl die BRAF^{V600E}- als auch die NRAS^{Q61K}-Expression führt in primären Melanozyten zur Induktion des Schutzprogramms Seneszenz. Neben einem Zellzyklusarrest konnten wir eine erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität sowie morphologische Zell- und Kernveränderungen nachweisen. Diese morphologischen und biochemischen Veränderungen sind Charakteristika und Indikatoren der zellulären Seneszenz [94, 147, 148].

Im direkten Vergleich zueinander zeigen sich zwischen BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten deutliche phänotypische Unterschiede. Primäre Melanozyten, in denen BRAF^{V600E} exprimiert wird, weisen genau wie die Kontrollzellen eine spindelförmige und schlanke Konfiguration auf. Die Zellen, in denen NRAS^{Q61K} exprimiert wird, erscheinen plump mit einem im Vergleich zur Kontrolle deutlich vergrößerten und ausgedehnten Zytoplasma. Außerdem kommen zahlreiche sogenannte Riesenzellen, teilweise mit mehreren Zellkernen, zur Darstellung. Insgesamt scheint die Expression von NRAS^{Q61K} einen wesentlich stärkeren Einfluss auf die Zellmorphologie zu nehmen als die Expression von BRAF^{V600E}.

Abbildung 12 stellt die Morphologie von BRAF^{V600E}- bzw. NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten und einer Leervektor-Kontrolle (Ktrl) 7 Tage nach Transduktion der Onkogene dar.

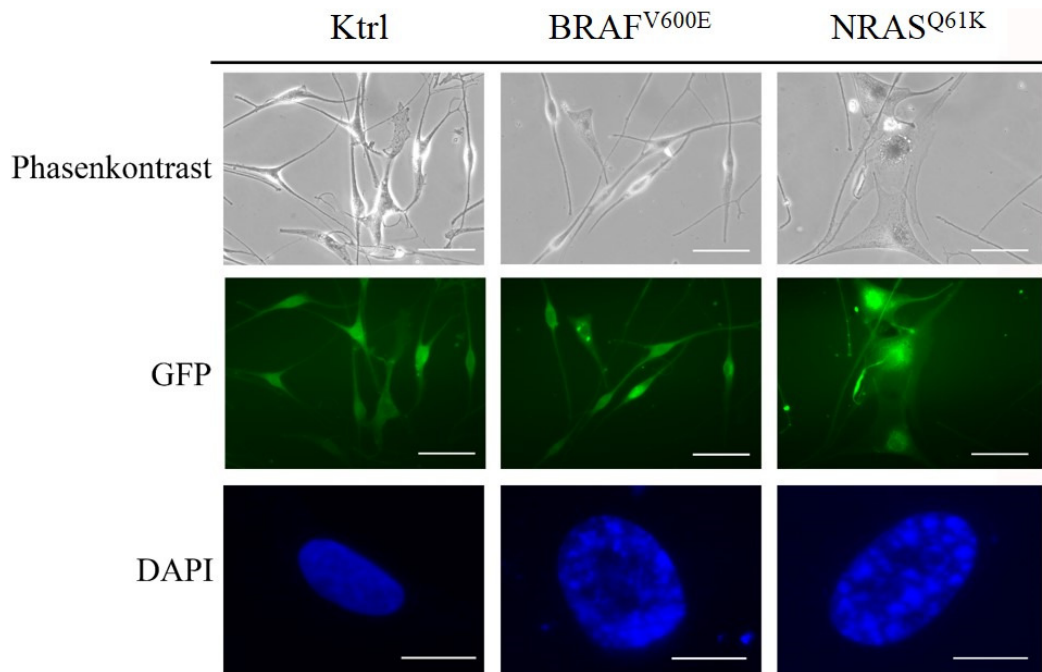


Abb. 12: Morphologischer Vergleich von BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten und der Kontrolle (Ktrl).

Verglichen werden jeweils eine Hellfeld-Aufnahme, eine fluoreszenzmikroskopische Aufnahme und eine Kernfärbung mit DAPI. Maßstableiste der Phasenkontrast- und GFP-Darstellung entspricht 100µm, Maßstableiste in der DAPI-Kernfärbung entspricht 10µm.

3.3.1 Induktion des Tumorsuppressors p16INK4a

Auf der Suche nach einer Erklärung für den unterschiedlichen Phänotyp der BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden Melanozyten wurde der p16INK4a-Spiegel beider Zelllinien mittels Western-Blot untersucht. Abbildung 13 zeigt, dass es in den NRAS^{Q61K}-exprimierenden Melanozyten zu einer deutlich ausgeprägteren Induktion des Tumorsuppressors p16INK4a kommt als in den BRAF^{V600E}-exprimierenden Melanozyten. Zur sicheren Differenzierung der eingebrachten Onkogene BRAF^{V600E} und NRAS^{Q61K} von endogenem BRAF und NRAS wurde eine myc-tag-Markierung verwendet.

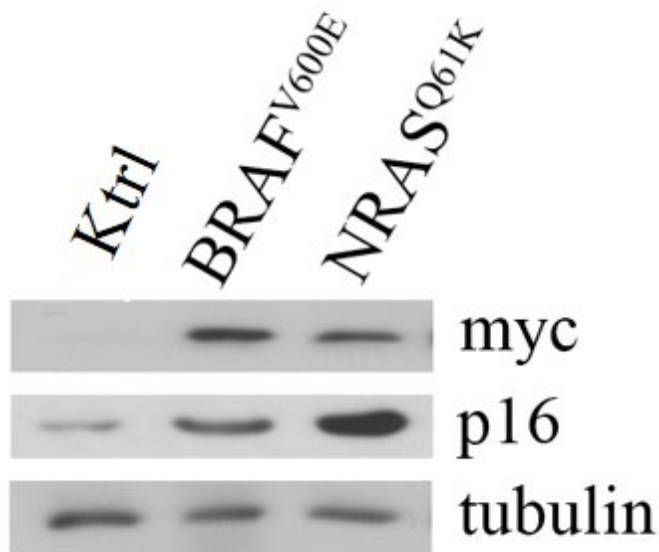


Abb. 13: Vergleich der p16INK4a-Expression von BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten und der Kontrolle (Ktrl) im Western Blot. Tubulin wurde als Ladungskontrolle verwendet.

3.3.2 p16INK4a-Knockdown in NRAS^{Q61K}-exprimierenden Melanozyten

Um festzustellen, ob es einen Zusammenhang zwischen den morphologischen Charakteristika und der erhöhten p16INK4a-Expression in NRAS^{Q61K}-exprimierenden Zellen gibt, wurde ein Knockdown von p16INK4a mittels small hairpin RNA (shRNA) in NRAS^{Q61K}-exprimierenden Zellen durchgeführt.

Abbildung 14 zeigt vergleichend die Zellen nach dem Knockdown: Kontrolle (Ktrl), NRAS^{Q61K}-exprimierende primäre Melanozyten nach dem Knockdown sowie NRAS^{Q61K}-exprimierende Zellen, die nicht mit shRNA behandelt wurden. Sowohl in der Phasenkontrast- als auch in der GFP-Aufnahme zeigen sich deutliche morphologische Veränderungen: NRAS^{Q61K}-exprimierende Zellen, die mit shRNA behandelt wurden, weisen nun kleine Zellkörper mit schlanker, spindelförmiger Konfiguration auf, die der Morphologie der Kontrollzellen ähnelt. Der Zellkern erscheint homogen. NRAS^{Q61K}-exprimierende Zellen, in denen kein p16INK4a-Knockdown erfolgte, präsentieren ein ausgedehntes Zytoplasma mit großen Zellkernen. In den Zellkernen ist deutlich Heterochromatin zu erkennen.

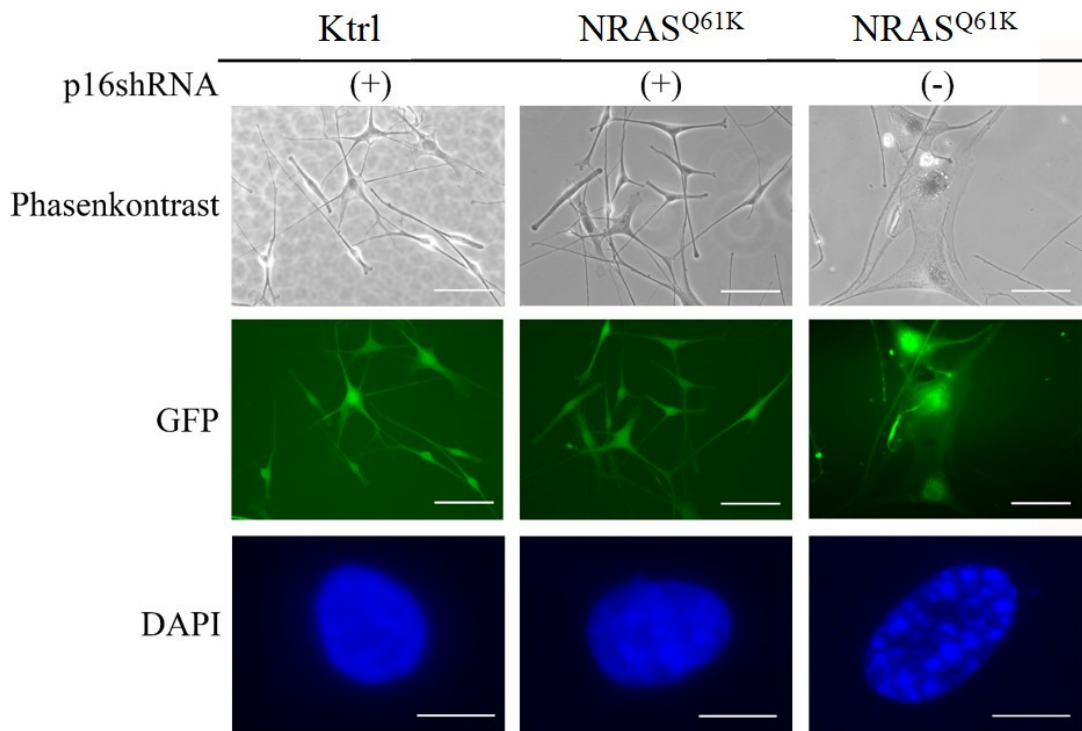


Abb. 14: Morphologischer Vergleich von NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten und Kontrolle (Ktrl) vor und nach shRNA-Knockdown von p16INK4a. Maßstableiste der Phasenkontrastaufnahme und der GFP-Aufnahme entspricht 100µm, Maßstableiste der DAPI-Färbung entspricht 10µm.

Um den Erfolg des Knockdowns abzubilden, wurde zusätzlich die Restexpression von p16INK4a mittels Westernblot untersucht. Abbildung 15 zeigt einen vollständigen Knockdown von p16INK4a in Kontrolle (Ktrl) und NRAS^{Q61K}-exprimierenden Zellen, jedoch eine deutliche p16INK4a-Expression in den NRAS^{Q61K}-exprimierenden Zellen, die nicht mit shRNA behandelt wurden.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die morphologischen Veränderungen, die NRAS^{Q61K}-exprimierende Zellen im Vergleich zu BRAF^{V600E}-exprimierenden Zellen zeigen, mit der erhöhten Expression von p16INK4a verknüpft sind. Der p16INK4a-Knockdown nimmt keinen Einfluss auf den NRAS^{Q61K}-induzierten Wachstumsarrest der primären Melanozyten. Auch die β-Galaktosidase-Aktivität als Seneszenzmarker bleibt nach p16INK4a-Knockdown erhalten[149].

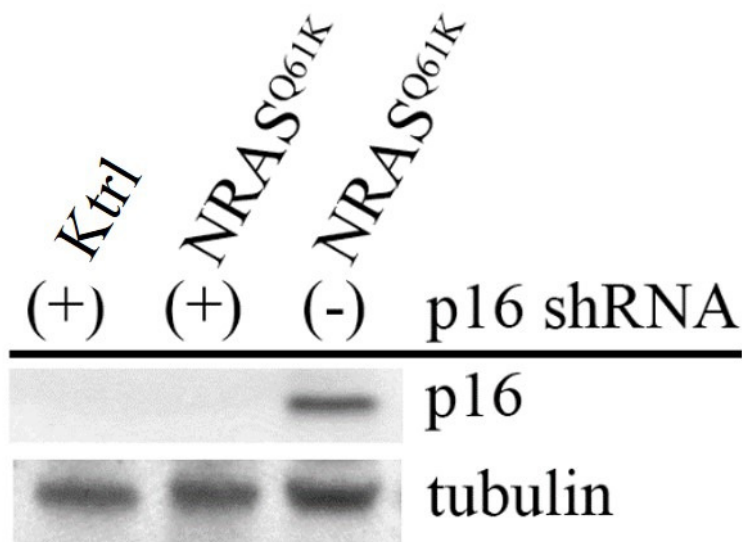


Abb. 15: Westernblot-Untersuchung von p16INK4a-Restexpression nach shRNA-Knockdown in NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten und Kontrolle (Ktrl). Tubulin als Ladungskontrolle.

3.4 Morphologie der p16INK4a-induzierten Seneszenz

Die Ergebnisse des vorangehenden Kapitels legen nahe, dass eine hohe p16INK4a-Expression, wie sie in NRAS^{Q61K}-exprimierenden Melanozyten vorliegt, ursächlich für die morphologischen Veränderungen der Zellen hin zu großvolumigen, plumpen Riesenzellen ist. Um diese Beobachtung experimentell zu untermauern, wurde für weitere Analysen ein p16INK4a-induzierbares Zellsystem verwendet. Mit Hilfe dieses Systems können p16INK4a-vermittelte Effekte auf Zellwachstum und Morphologie unabhängig von einer BRAF^{V600E}- bzw. NRAS^{Q61K}-Überexpression untersucht werden. Außerdem bietet das p16INK4a-induzierbare Zellsystem die Möglichkeit, p16INK4a-Spiegel zu titrieren, und so die morphologischen Veränderungen in Abhängigkeit zum jeweiligen p16INK4a-Spiegel zu beobachten.

3.4.1 Die p16INK4a-induzierbare Zelllinie WMM1175_A4

Für die folgenden Versuche wurde die Zelllinie WMM1175_A4 verwendet. Es handelt sich dabei um eine humane Melanomzelllinie, die aus einer subkutanen Metastase gewonnen wurde. WMM1175_A4 enthält eine homozygote Deletion der CDKN2A-Region auf Chromosom 9p21[150], exprimiert aber wildtypisches CDK4 und pRb[128]. Mittels eines IPTG-induzierbaren Lac-Switch-Systems wurde das Gen CDKN2A unter IPTG-Expressionskontrolle stabil integriert. WMM1175_A4 ist dementsprechend eine p16INK4a-leere Linie, in der ektopes p16INK4a durch Zugabe von IPTG induziert werden kann [129].

3.4.2 Expression von p16INK4a löst in WMM1175_A4 Proliferationsarrest aus

Analog zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens von BRAF^{V600E}- bzw. NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten wurde die Zellproliferationsaktivität von WMM1175_A4 untersucht. Abbildung 16 zeigt die Proliferationskurven von WMM1175_A4 ohne und mit Zugabe von IPTG. Die unbehandelten Zellen (- IPTG) zeigen wie erwartet exponentielles Proliferationsverhalten. Die Zellkohorte, in der mittels IPTG eine Überexpression von p16INK4a induziert wurde (+ IPTG), zeigt jedoch eine stagnierende Zellproliferation. Dieses Ergebnis legt nahe, dass die Überexpression von p16INK4a in WMM1175_A4 zum Proliferationsarrest führt.

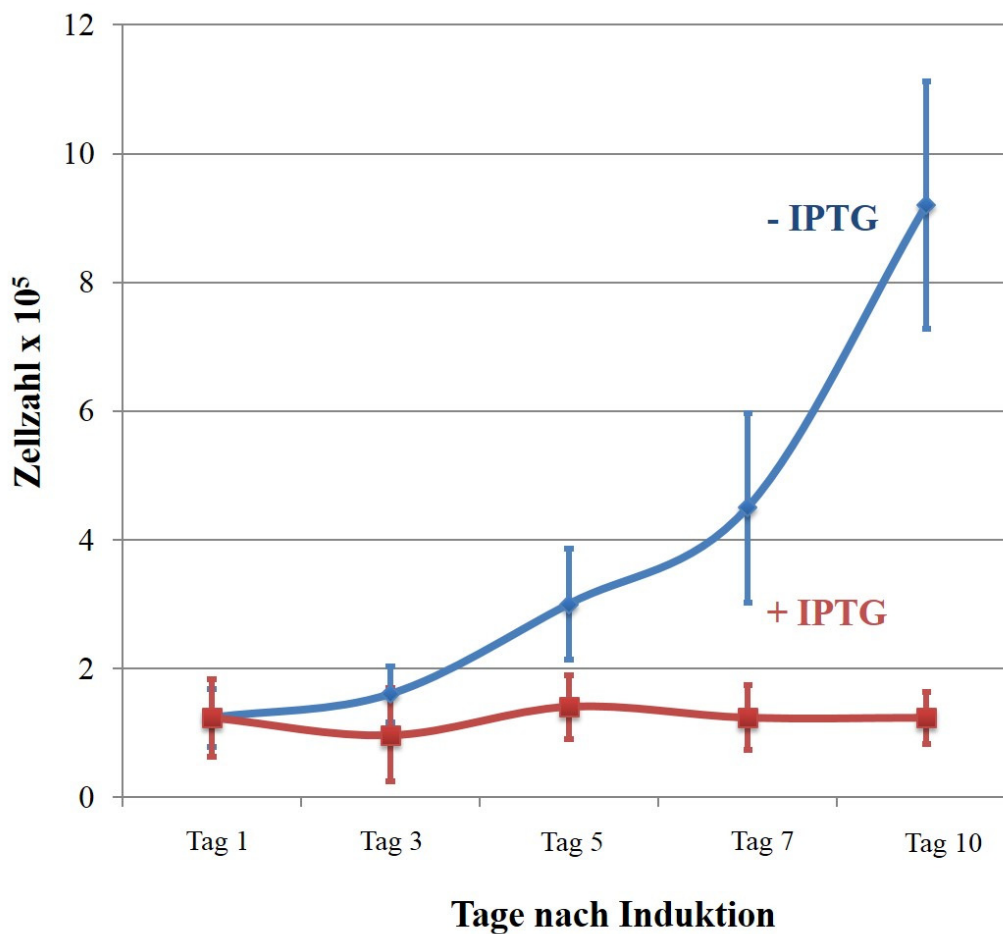


Abb. 16: Proliferationskurve von unbehandelten (-IPTG) und p16INK4a-überexprimierenden (+IPTG) Zellen der Linie WMM1175_A4.

3.4.3 Expression von p16INK4a führt in WMM117 A4 zu verminderter Ki67-Aktivität

Zusätzlich zur Wachstumskurve wurde die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 untersucht. Hierzu wurde wiederum p16INK4a mittels Zugabe von IPTG überexprimiert und mit einer Kontrolle verglichen. Abbildung 17 A zeigt eine Immunfluoreszenzfärbung von Ki67 und DAPI. Die Kontrollzellen (-IPTG) zeigen ein deutliches Fluoreszenzsignal als Zeichen der aktiven Zellproliferation. Die induzierten Zellen (+IPTG) mit p16INK4a-Überexpression zeigen kein Signal. Abbildung 15 B stellt den prozentualen Anteil Ki67-positiver Zellen in WMM1175_A4 ohne und mit p16INK4a-Überexpression nach 3, 5 und 7 Tagen Inkubation dar. Die Kontrolle (-IPTG) zeigt, dass ohne Überexpression von p16INK4a zu allen Messzeitpunkten etwa 50% aller Zellen positiv für Ki67 sind und damit proliferieren. Nach Überexpression von

p16INK4a (+IPTG) liegt die Anzahl von Ki67-positiven Zellen bereits nach 3 Tagen unter 10%. An Tag 7 ist der Anteil an proliferierenden Zellen auf 5% abgesunken.

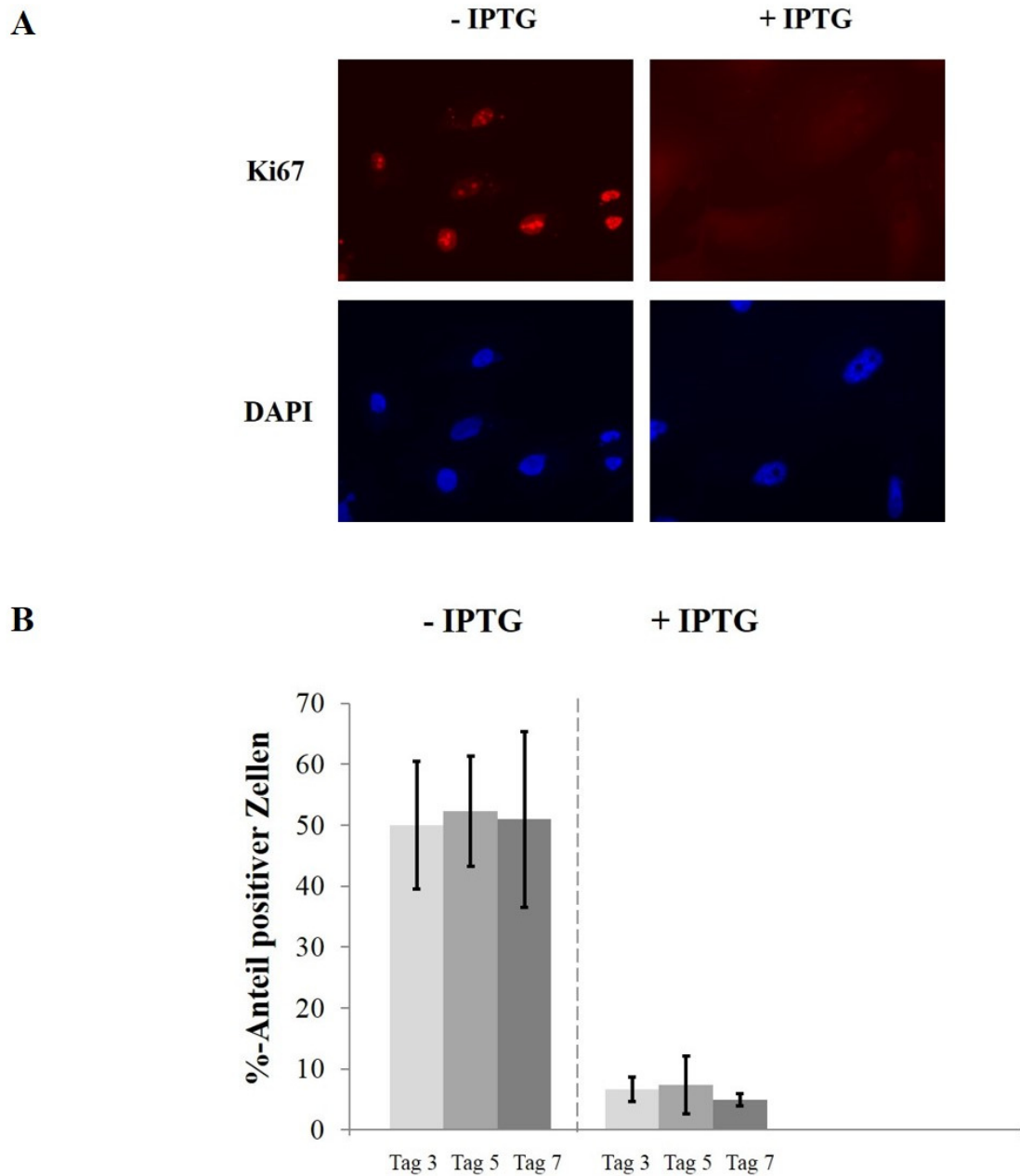


Abb. 17

A) Immunfluoreszenz von Ki67 und DAPI-Färbung in WMM1175_A4 ohne (-IPTG) und mit (+IPTG) Überexpression von p16INK4a.

B) Prozentualer Anteil von Ki67 in WMM1175_A4 ohne (-IPTG) und mit (+IPTG) Überexpression von p16INK4a nach 3, 5 und 7 Tagen Inkubation.

Dieses Ergebnis untermauert die Beobachtung der stagnierenden Wachstumskurve und zeigt, dass die Überexpression von p16INK4a auch auf Proteinebene zum Wachstumsarrest führt.

3.4.4 Expression von p16INK4a führt in WMM1175 A4 zu erhöhter β -Galaktosidase-Aktivität

Analog zur Untersuchung der β -Galaktosidase-Aktivität in BRAF^{V600E}- bzw. NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten wurde in der Linie WMM1175_A4 die Aktivität der β -Galaktosidase gemessen. Abbildung 18 A zeigt Zellen der Linie WMM1175_A4 im lichtmikroskopischen Phasenkontrast ohne (-IPTG) und mit (+IPTG) Überexpression von p16INK4a. In der Kontrolle (-IPTG) ist keine Blaufärbung zu sehen. Die induzierten Zellen (+IPTG) zeigen deutliche Aktivität der β -Galaktosidase, die am blauen Farbumschlag zu erkennen ist.

Abbildung 18 B zeigt den prozentualen Anteil der Zellen mit einer erhöhten Aktivität der lysosomalen β -Galaktosidase dar. Die Messungen erfolgten an Tag 3, 5 und 7 nach Zugabe von IPTG. In der Kontrolle (-IPTG) liegt der Anteil der β -Galaktosidase-positiv gemessenen Zellen über alle 3 Messungszeitpunkte konstant bei weniger als 10%. Wird jedoch mittels Zugabe von IPTG die Expression von p16INK4a induziert, steigt die Anzahl der β -Galaktosidase-positiven Zellen auf 27% nach 3 Tagen Inkubation, auf 43% nach 5 Tagen Inkubation und auf bis zu 60% nach 7 Tagen Inkubation. Dieses Ergebnis zeigt, dass sich nach Überexpression von p16INK4a in WMM1175_A4 in der Mehrzahl der Zellen der Seneszenzmarker β -Galaktosidase nachweisen lässt.

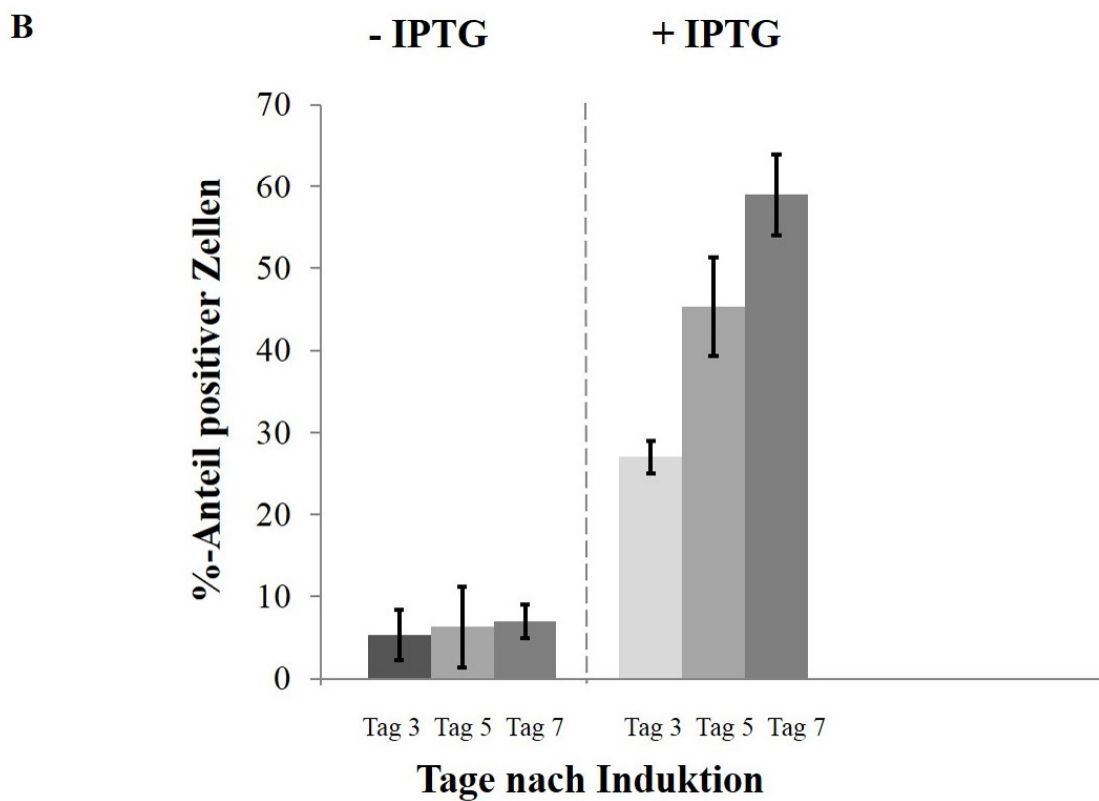
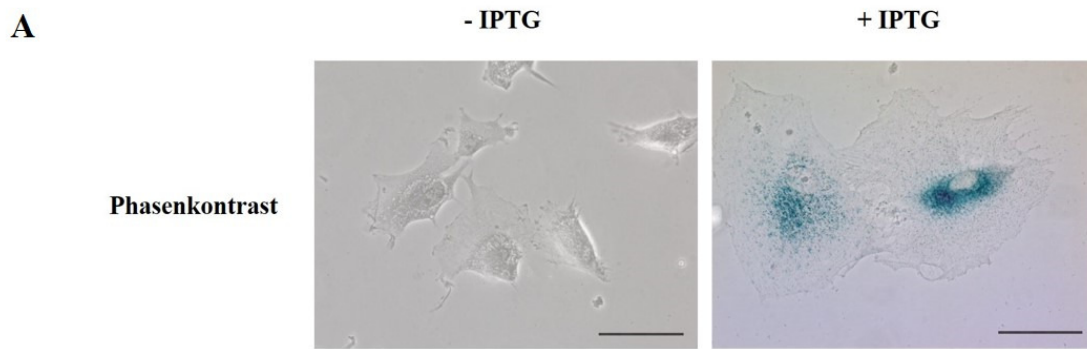


Abb. 18

A) β -Galaktosidase-Assay in WMM1175_A4 ohne (-IPTG) und mit (+IPTG) p16INK4a-Überexpression. Maßstableiste entspricht 100 μ m.

B) Prozentualer Anteil der β -Galaktosidase-Aktivität ohne (-IPTG) und mit (+IPTG) p16INK4a-Überexpression.

3.4.5 Expression von p16INK4a löst in WMM1175_A4 Bildung von Seneszenz-assozierten Heterochromatin-Foci (SAHF) aus

Analog zu den Versuchen mit BRAF^{V600E}- bzw. NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten wurden auch von der Zelllinie WMM1175_A4 nach p16INK4a-Induktion mittels IPTG DAPI-Kernfärbungen angefertigt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Ab 5 erkennbaren Heterochromatin-Foci wurde ein Zellkern als positiv gewertet. Abbildung 19 A zeigt vergleichend eine DAPI-Färbung eines positiven Zellkerns mit deutlich erkennbaren Heterochromatin-Foci, sowie einen Zellkern der Kontrolle mit homogener Binnenstruktur. Abbildung 19 B zeigt den prozentualen Anteil an Heterochromatin-positiven Zellen der Linie WMM1175_A4 im Vergleich zur Kontrolle (- IPTG) nach 3, 5 und 7 Tagen Zellkultur und p16INK4a-Expressionsinduktion mittel IPTG dar. In den Zellkernen der Kontrolle lassen sich über alle 3 Beobachtungszeitpunkte weniger als 3% positiver Zellen mit Heterochromatin-Foci nachweisen. In den Zellen, in denen mittels Zugabe von IPTG die Expression von p16INK4a ausgelöst wurde, weisen bereits nach 3 Tagen Inkubation 40% der Zellen Heterochromatin-Foci auf. Nach 5tägiger Induktion der p16INK4a-Expression sind bereits mehr als 60% aller Zellen positiv für Heterochromatin-Foci. Dieser Wert bleibt nach 7 Tagen in etwa konstant. Wie erwartet zeigt sich, dass die Überexpression von p16INK4a in der induzierbaren Zelllinie WMM1175_A4 in der Mehrzahl der Zellen zum Auftreten des Seneszenzmarkers SAHF führt.

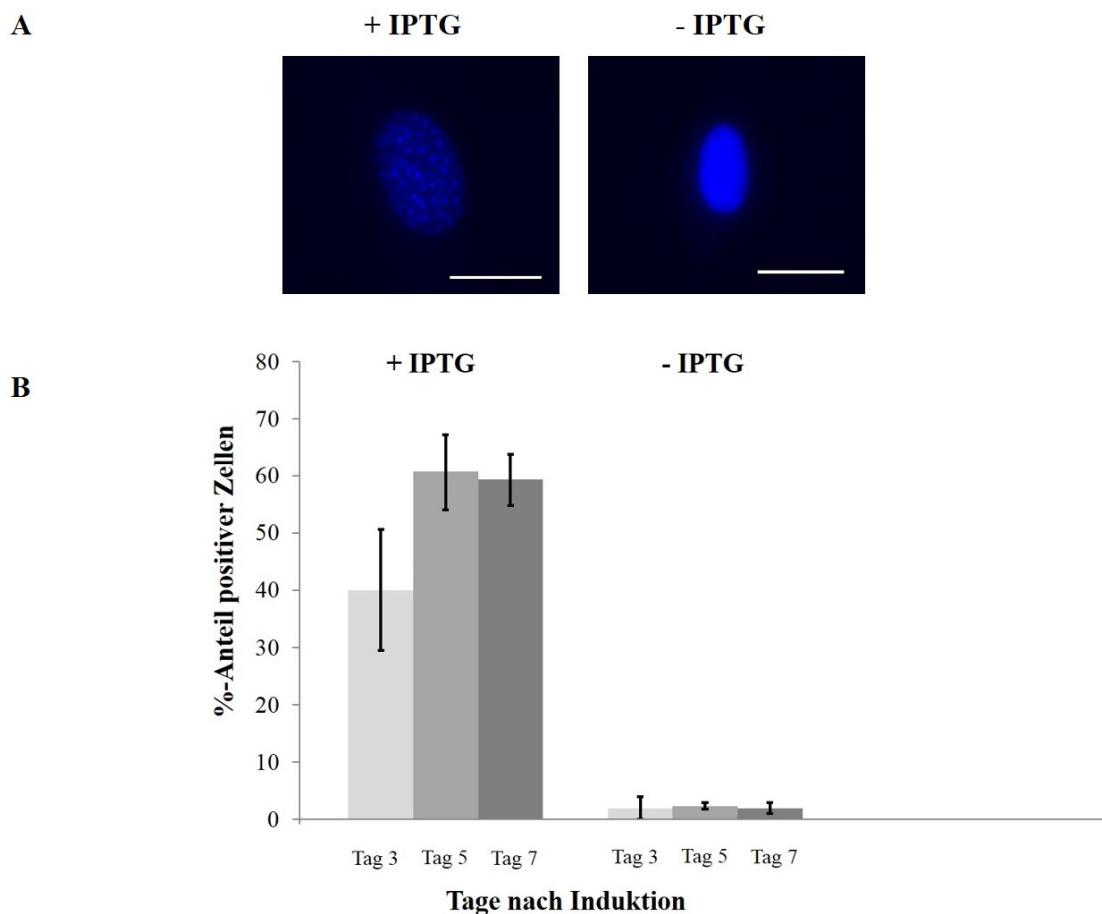


Abb. 19

A) DAPI-Färbung, Darstellung von Seneszenz-assoziierten Heterochromatin-Foci (SAHF) in WMM1175A4 7 Tage nach Induktion (+IPTG) sowie der Kontrolle (-IPTG). Maßstableiste entspricht 10µm.

B) Vergleich der prozentualen Anzahl von Heterochromatin-Foci in Zellen der Linie WMM1175_A4 nach 3, 5 und 7 Tagen Zellkultur mit und ohne Überexpression von p16INK4a durch Zugabe von IPTG.

3.4.6 p16INK4a-Expression löst in WMM1175 A4 Bildung von Riesenzellen aus

Analog zu den Versuchen mit BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten wurde auch in der Linie WMM1175_A4 die Anzahl der Riesenzellen nach Überexpression von p16INK4a mittels Induktion durch IPTG evaluiert. Es wurden GFP-Färbungen angefertigt und unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Ab einem Zelldurchmesser von 100µm wurde eine Zelle als Riesenzelle gewertet und ausgezählt. Abbildung 20 A zeigt vergleichend eine Riesenzelle (+IPTG) und eine Kontrollzelle (-IPTG). Abbildung 20 B stellt den prozentualen Anteil an Riesenzellen in der Linie WMM1175_A4 mit und ohne p16INK4a-Überexpression durch Zugabe von IPTG dar.

Während in den Zellen ohne p16INK4a-Überexpression der Anteil an Riesenzellen über alle Beobachtungszeiträume hinweg unter 20% liegt, präsentieren sich bereits 3 Tage nach Induktion von p16INK4a-Überexpression mittels IPTG mehr als 70% aller Zellen als Riesenzellen. Der prozentuale Anteil an Riesenzellen steigt nach 5 Tagen p16INK4a-Überexpression weiter auf 82% an. Nach 7 Tagen p16INK4a-Überexpression sind 84% aller Zellen Riesenzellen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Überexpression von 16 in WMM1175_A4 dazu führt, dass die Mehrzahl der Zellen einen Seneszenz-typischen Phänotyp annimmt.

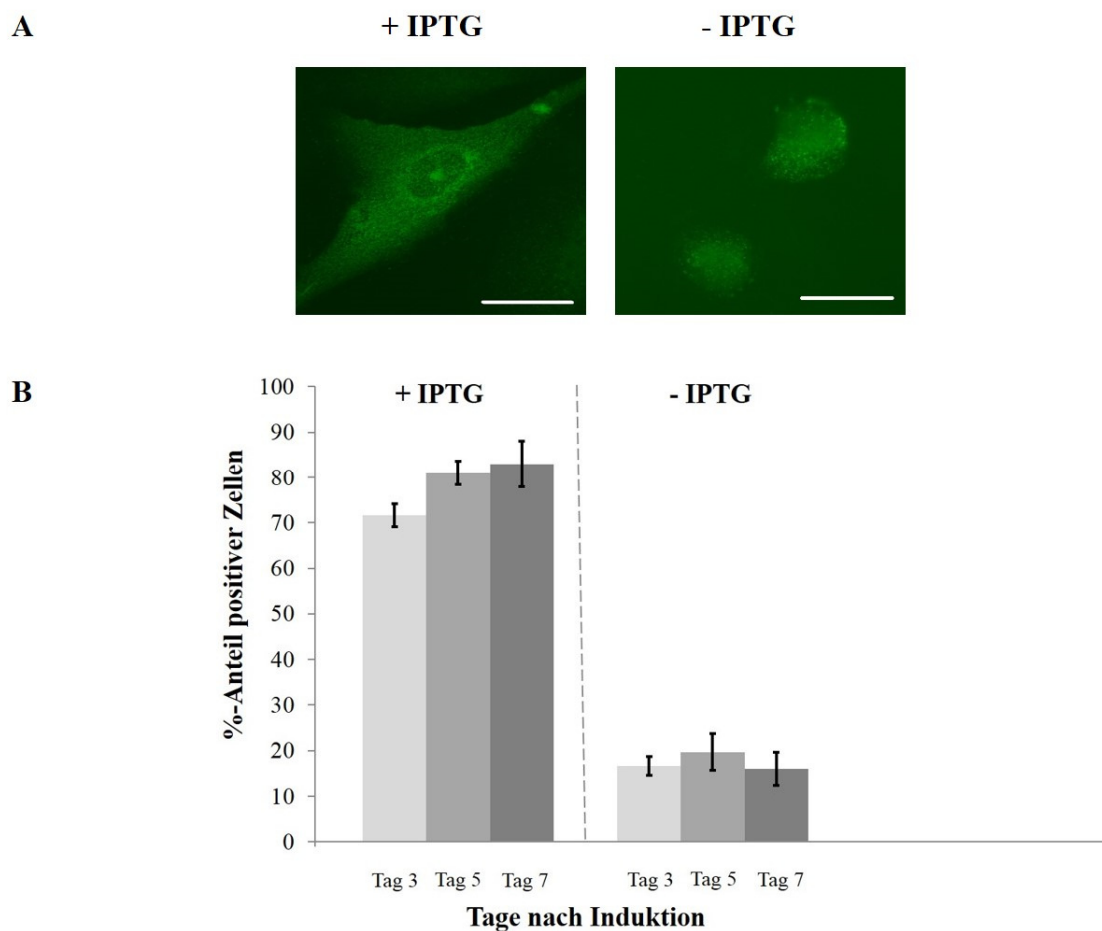


Abb. 20

A) Immunfluoreszenzaufnahme einer Riesenzelle (+IPTG) und der Kontrolle (-IPTG). Maßstableiste entspricht 50µm.

B) Vergleich des prozentualen Anteils an Riesenzellen in Zellen der Linie WMM1175_A4 nach 3, 5 und 7 Tagen Zellkultur mit und ohne Überexpression von p16INK4a durch Zugabe von IPTG.

3.4.7 Nachweis von p16INK4a in Naevuszellnaevi mit BRAF^{V600E} - bzw. NRAS^{Q61K}-

Mutation

Die in-vitro-Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass NRAS^{Q61K}-exprimierende Zellen einen höheren p16INK4a-Spiegel haben als BRAF^{V600E}-exprimierende Zellen, und sich morphologisch durch einen Seneszenz-typischen Phänotyp mit ausgedehntem Zytoplasma (Riesenzellen) und großen Zellkernen deutlich von BRAF^{V600E}-exprimierenden Zellen abgrenzen. Um zu untersuchen, ob sich diese Ergebnisse auch in vivo darstellen lassen, wurden die Expression von p16INK4a in Naevuszellnaevi mit einer BRAF^{V600E}- bzw. einer NRAS^{Q61K}-Mutation untersucht. Dazu erfolgte eine immunhistochemische Färbung von p16INK4a in Naevi mit positivem BRAF^{V600E}- bzw. NRAS^{Q61K}-Mutationsstatus. Abbildung 21 zeigt in Übersicht-, Nah- und Detailaufnahme die p16INK4a-Expression eines untersuchten Naevuszellnaevus. Abhängig vom Mutationsstatus der Naevi zeigen p16INK4a-exprimierende Zellen innerhalb des Naevus ein unterschiedliches Verteilungsmuster: In Naevuszellnaevi mit einer BRAF^{V600E}-Mutation sind die p16INK4a-exprimierenden Zellen nestartig angeordnet. Diese Zellnester konzentrieren sich auf einige wenige Areale im Naevus. In Naevuszellnaevi mit einer NRAS^{Q61K}-Mutation sind die p16INK4a-exprimierenden Zellen filamentartig angeordnet und verteilen sich flächiger im Naevus. In Naevi beider Mutationsstatus fallen p16INK4a-positive Zellen mit ausgedehntem Zytoplasma und großen Zellkernen auf.

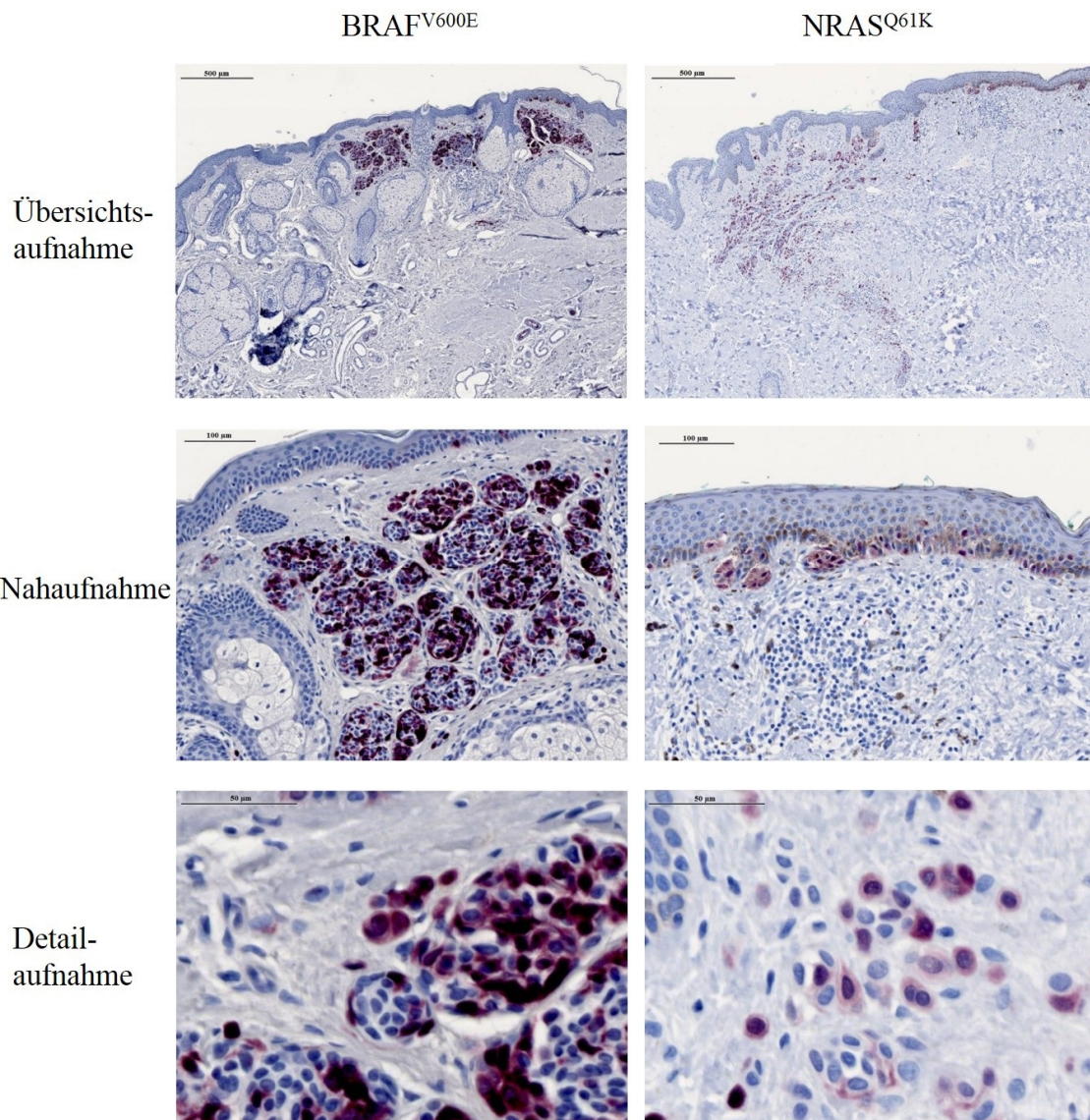


Abb. 21: Immunhistochemische Färbung von p16INK4a in BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden Naevuszellnaevi. Maßstableiste der Übersichtsaufnahme entspricht 500µm, Maßstableiste der Nahaufnahme entspricht 100µm, Maßstableiste der Detailaufnahme entspricht 50 µm.

4. Diskussion

4.1 Auswirkungen von konsekutiver MAP-Kinase-Aktivierung auf humane Melanozyten

Im Rahmen der beschriebenen Versuche wurde gezeigt, dass die Expression der Onkogene BRAF^{V600E} und NRAS^{Q61K} in primären humanen Melanozyten zur konsekutiven Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs führen. Anders als zu erwarten führt diese Signalweg-Aktivierung zum Wachstumsarrest der Melanozyten. Dieses Phänomen lässt sich dadurch erklären, dass eine konsekutive Aktivierung des Signalwegs Seneszenz induzieren kann. Durch Darstellung von Wachstumskurven zeigt sich ein reversibler Proliferationsarrest, der sich auch in der Immunfluoreszenz-Darstellung des Proliferationsmarkers Ki67 nachvollziehen lässt. Im β -Galaktosidase-Assay präsentieren sich BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierende primäre Melanozyten deutlich positiv. In der DAPI-Färbung kann das Vorkommen von Seneszenz-assoziierten Heterochromatin-Foci nachgewiesen werden. Ebenso zeigen sich Riesenzellen sowohl in BRAF^{V600E}- als auch in NRAS^{Q61K}-exprimierenden primären Melanozyten. Damit werden alle bekannten Seneszenzkriterien erfüllt [92, 145, 147, 151]. Die Erkenntnis, dass die Expression von aktivierten Onkogenen im Allgemeinen [152] und die Expression von BRAF^{V600E} und NRAS^{Q61K} im Speziellen in Melanozyten Seneszenz auslöst, ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Michaloglou et. al, Narita et. al und Serrano et. al [75, 94, 141].

4.2 Vergleich der BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-vermittelten Effekte auf das Wachstumsverhalten und die Seneszenzinduktion in humanen Melanozyten

Im direkten Vergleich der Effekte der beiden Onkogene BRAF und NRAS zeigt sich deutlich, dass die NRAS^{Q61K}-vermittelten Veränderungen ausgeprägter sind als die durch das BRAF-Onkogen. In der Immunfluoreszenz-Darstellung des Proliferationsmarkers Ki67 sind nach 7 Tagen deutlich weniger NRAS^{Q61K}-exprimierende Zellen positiv als BRAF^{V600E}-exprimierende Zellen. Im β -Galaktosidase-Assay färben sich nach 7 Tagen

bereits 60% der NRAS^{Q61K}-exprimierenden Zellen positiv, während sich lediglich 10% der BRAF^{V600E}-exprimierenden Melanozyten positiv anfärben lassen. In der Immunfluoreszenz zeigen sich nach 7 Tagen 25% der NRAS^{Q61K}-exprimierenden Zellen positiv für Seneszenz-assoziierte Heterochromatin-Foci, während sich die BRAF^{V600E}-exprimierenden Zellen nur zu 10% positiv zeigen. In der Zählung der Riesenzellen sind nach 7 Tagen Inkubation 60% der NRAS^{Q61K}-exprimierenden Zellen positiv, in der BRAF^{V600E}-Kohorte sind es lediglich 10%. Diese Ergebnisse legen nahe, dass NRAS^{Q61K} ein potenterer und schnellerer Seneszenz-Auslöser ist als BRAF^{V600E}. Diese Vermutung ist in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Jonsson et al, die beschreiben, dass mutiertes NRAS generell eine ausgeprägtere Tendenz zeigt, Seneszenz auszulösen, als mutiertes BRAF [153]. Darüber hinaus ist beschrieben, dass BRAF^{V600E} eine 50fach niedrigere Transformationsaktivität besitzt als die RAS-Mutante HRAS^{G12V}[40]. Es wird angenommen, dass der Grund hierfür die große Anzahl an RAS-Effektormolekülen und die Komplexität der RAS-Signalkaskade ist [154, 155], während RAF nach heutigem Wissensstand hauptsächlich den ERK-MAPK-Signalweg aktiviert [156, 157] und damit eine geringere Bandbreite an Effektormolekülen erreicht als RAS. Da alle Mitglieder der RAS-Familie in dieselben Signalkaskaden eingebunden sind [66, 158-160], lässt sich diese Vermutung auch auf NRAS^{Q61K} übertragen.

4.3 Expression von BRAF^{V600E} oder NRAS^{Q61K} führt in primären Melanozyten zu einem distinkten Phänotyp

Im Vergleich zeigen BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierende primäre Melanozyten nach Einsetzen der Seneszenz deutliche morphologische Unterschiede. BRAF^{V600E}-exprimierende Zellen sind schlank und spindelförmig, mit fadenartig ausgezogenen Ausläufern, während NRAS^{Q61K}-exprimierenden Zellen volumenreich, rundlich und plump erscheinen. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit anderen Beobachtungen, die phänotypische Veränderungen von Zellen unter Expression von BRAF^{V600E} und NRAS^{Q61K} beschreiben[161, 162].

Auf der Suche nach einer molekularbiologischen Erklärung für die unterschiedliche Zellmorphologie zeigt sich, dass sich in NRAS^{Q61K}-exprimierenden Zellen eine deutlich höhere Konzentration des Tumorsuppressors p16INK4a nachweisen lässt. Um festzustellen, ob die erhöhte p16INK4a-Konzentration ausschlaggebend für die morphologischen Unterschiede ist, wurde ein vollständiger p16INK4a-Knockdown in den NRAS^{Q61K}-exprimierenden Zellen durchgeführt. Daraufhin verändert sich die Morphologie der NRAS^{Q61K}-exprimierenden Zellen: Sie verlieren ihre großvolumige, plumpe Konfiguration und ähneln wieder den BRAF^{V600E}-exprimierenden Zellen mit schlanken, spindelförmigen Zelleibern und fadenförmigen Ausläufern. Auch in vivo gibt es Hinweise darauf, dass die Expression von onkogenem BRAF zu charakteristischen Phänotypen führt. BRAF^{V600E} korreliert in Naevi mit bestimmten dermatoskopischen und histopathologischen Mustern [163, 164] und ist besonders häufig in retikulären oder globulären Naevi nachweisbar [165]. Zu beachten ist jedoch die Tatsache, dass die Häufigkeit von BRAF^{V600E}-Nachweisen in Naevi von der Testmethode abhängig zu sein scheint [84, 164]. Ein Zusammenhang zwischen der Expression von onkogenem NRAS und bestimmten histopathologischen Mustern in Naevi wurde zwar untersucht, konnte jedoch nicht nachgewiesen werden [84, 163]. Auf Malignomebene findet sich eine BRAF^{V600E}-Mutationen häufiger in superfiziell spreitenden Melanomen, während NRAS^{Q61K}-Mutationen häufiger in nodulären Melanomen vorkommen [76]. In der in-vivo-Untersuchung dieser Arbeit, bei der p16INK4a in BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden Naevi untersucht wurde, zeigen sich in Naevi beider Mutationsstatus auffallend große Zellen. Die Morphologie insgesamt stellt sich jedoch heterogen dar, sodass die Aussage dieser Untersuchung als limitiert zu betrachten ist.

4.4 p16INK4a ist essentiell für die NRAS^{Q61K}-vermittelte Änderung der Zellmorphologie

Die Ergebnisse dieser Arbeit legen nahe, dass für die riesenzellartige, plumpe Morphologie der NRAS^{Q61K}-exprimierenden Melanozyten ein hoher p16INK4a-Spiegel ausschlaggebend ist. Es ist bekannt, dass sowohl die Expression von onkogenem BRAF als auch die Expression von onkogenem RAS in primären Melanozyten und in anderen humanen Zellarten Seneszenz auslöst und zu einer Anreicherung von p16INK4a führt

[108, 141]. In welchem Maße die Onkogene jeweils zu einem Anstieg von p16INK4a führen, war bislang unklar. Während sich in vitro im Western Blot deutlich mehr p16INK4a in NRAS^{Q61K}-exprimierenden Melanozyten nachweisen lässt als in BRAF^{V600E}-exprimierenden Melanozyten, zeigt der immunhistologische Nachweis von p16INK4a in BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden melanozytären Naevi hingegen keine wegweisende Differenzierung zwischen beiden Mutationsstatus. p16INK4a scheint jedoch eine Schlüsselrolle in der Entstehung und Erhaltung der Seneszenz-typischen großvolumigen und flachen Morphologie von Zellen einzunehmen, und die Seneszenzmorphologie zu regulieren. In humanen Fibroblasten wurde gezeigt, dass der Verlust von p16INK4a nach Seneszenzinduktion zu einem Verlust der Seneszenz-typischen Morphologie führt, die Seneszenz jedoch erhalten bleibt [166]. Darüber hinaus ist beschrieben, dass Knockdown von p16INK4a in NRAS^{Q61K}-exprimierenden Melanozyten keinen Einfluss auf den Proliferationsarrest und die erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität nimmt, und die Onkogen-induzierte Seneszenz auch hier erhalten bleibt [149]. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Erkenntnissen dieser Arbeit und zeigen, dass Seneszenz ein komplexer zellulärer Vorgang ist, an dessen Erhalt noch zahlreiche weitere Effektoren beteiligt sind [141, 167]. Im direkten Vergleich der BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-induzierten Seneszenz zeigt sich, dass NRAS^{Q61K} in primären Melanozyten schnell und potent Seneszenz auslöst und mit einem hohen zellulären p16INK4a-Spiegel assoziiert ist, während BRAF^{V600E} im Vergleich ein schwächerer und langsamerer Seneszenzinduktor ist, und die betreffenden Zellen einen weniger hohen p16INK4a-Spiegel aufweisen.

Ein hoher zellulärer p16INK4a-Spiegel scheint jedoch keine Voraussetzung für die NRAS^{Q61K}-induzierte Seneszenz zu sein. In humanen Melanozyten wurde gezeigt, dass die Anwesenheit von p16INK4a für die Onkogen-induzierte Seneszenz nicht zwingend notwendig ist. Auch nach p16INK4a-Knockdown wurden humane Melanozyten bei der Expression von NRAS^{Q61K} seneszent. [149].

Im Gegensatz dazu gibt es für humane Fibroblasten die Beobachtung, dass die Anwesenheit von onkogenem RAS nur in Zellen mit hoher p16INK4a-Expression zur Seneszenz führt. Bei Fibroblasten in früher Zellpassage mit niedrigem p16INK4a-Expressionslevel führt onkogenes RAS nicht zur Seneszenz. [168].

Die besonders schnelle und effektive Seneszenzinduktion von NRAS^{Q61K} im Vergleich zur BRAF^{V600E} lässt die Überlegung zu, dass NRAS^{Q61K} möglicherweise nicht nur durch seine bloße Präsenz als Onkogen Seneszenz auslöst, sondern mehrere Angriffsstellen zur Seneszenzinduktion gleichzeitig bedient. Für onkogenes HRAS ist bereits gezieltes epigenetisches Silencing durch Hypermethylierung beschrieben [169]. Da alle RAS-Moleküle in dieselben Signalkaskaden eingebunden sind, lässt sich diese Überlegung auch auf NRAS übertragen. Es gibt bereits Beobachtungen dazu, welche Genorte in Melanomen von RAS-induzierter Hypermethylierung betroffen sein können [170, 171]. Denkbar ist damit die Hypothese, dass NRAS^{Q61K} in humanen Melanozyten nicht nur durch seine Anwesenheit als Onkogen Seneszenz induziert, sondern auch durch NRAS^{Q61K}-induziertes epigenetisches Silencing durch Hypermethylierung von Genen, deren Proteinprodukte zur Zellzyklusprogression unerlässlich sind, wie CDK4 und CDK6, oder die, wie p53, ebenfalls eine Rolle in der Seneszenzinduktion und Seneszenzerhaltung spielen.

5. Zusammenfassung

Das maligne Melanom ist ein gefährlicher Tumor mit weltweit ansteigender Inzidenz. Mit der Entdeckung, dass die meisten malignen Melanome Mutationen der Onkogene BRAF oder NRAS enthalten, wurde die Tür zu neuen, besseren Therapiekonzepten geöffnet. BRAF^{V600E} und NRAS^{Q61K} sind im malignen Melanom die am häufigsten vorkommenden Mutationen [40, 82]. Sie aktivieren den MAP-Kinase-Signalweg, der eine entscheidende Rolle in der Proliferation und im Überleben von malignen Zellen spielt [172]. Der MAP-Kinase-Signalweg kann sowohl pro-onkogene als auch tumorsuppressive Signale vermitteln, wobei der dominierende Effekt vom Aktivierungskontext abhängig ist [173].

Seneszenz beschreibt einen irreversiblen Proliferationsarrest in somatischen Zellen und gilt als zelluläres Schutzprogramm gegen Malignomentwicklung. Seneszenz kann unter anderem durch Onkogenaktivität ausgelöst werden [141], so auch durch die Onkogene BRAF^{V600E} und NRAS^{Q61K} und der damit einhergehenden konsekutiven Aktivierung der MAP-Kinase-Signalkaskade [75, 141, 174]. Für Etablierung und Erhalt der zellulären Seneszenz ist der Tumorsuppressor p16INK4a essentiell [122, 123]. Der Tumorsuppressor p16INK4a gilt als Melanomsuppressor [108], da Keimbahnmutationen im p16INK4a-Genlocus *INK4a/ARF* eng mit gesteigerter Melanominzidenz verknüpft sind [126].

Im Rahmen dieser Arbeit habe ich BRAF^{V600E} und NRAS^{Q61K} in humanen primären Melanozyten überexprimiert, damit den MAP-Kinase-Signalweg konsekutiv aktiviert und die Veränderungen der Zellen mit Hinblick auf Seneszenzentwicklung und Zellmorphologie untersucht. Ich zeige hier, dass die Anwesenheit der Onkogene BRAF^{V600E} und NRAS^{Q61K} und die damit verbundene Aktivierung des MAP-Kinase-Signalwegs in primären Melanozyten zur zellulären Seneszenz führt. Darüber hinaus wird deutlich, dass NRAS^{Q61K} für humane Melanozyten ein sehr viel schnellerer und potenterer Seneszenz-Auslöser und damit ein stärkerer Stimulus im MAP-Kinase-Signalweg zu sein scheint als BRAF^{V600E}.

In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung zeigt sich, dass primäre Melanozyten, in denen NRAS^{Q61K} überexprimiert wird, auch den Seneszenzmarker und Tumorsuppressor

p16INK4a in signifikant höherem Maße exprimieren als primäre Melanozyten mit BRAF^{V600E}-Überexpression.

Des Weiteren zeige ich, dass sich die Morphologie von BRAF^{V600E}- und NRAS^{Q61K}-exprimierenden humanen Melanozyten deutlich voneinander unterscheidet. NRAS^{Q61K}-exprimierende Zellen erscheinen plump, rundlich und abgeflacht, während BRAF^{V600E}-exprimierende Zellen schlank und spindelförmig bleiben. Nach p16INK4a-Knockout in den NRAS^{Q61K}-exprimierenden humanen Melanozyten verändern diese ihre Morphologie und werden wieder schlank und spindelförmig, was darauf hinweist, dass die initial großvolumige, plumpe Morphologie von NRAS^{Q61K}-exprimierenden humanen Melanozyten direkt mit dem Vorhandensein und der Menge von p16INK4a zusammenhängt.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass NRAS^{Q61K} mit einem hohen zellulären p16INK4a-Spiegel assoziiert ist und einen größeren Einfluss auf die Zellmorphologie nimmt als BRAF^{V600E}. Dies legt nahe, dass NRAS^{Q61K} auch der potentere Seneszenzauslöser ist und den MAP-Kinase-Signalweg stärker aktiviert als BRAF^{V600E}.

6. Literaturverzeichnis

1. Chang, A.E., L.H. Karnell, and H.R. Menck, *The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma: a summary of 84,836 cases from the past decade. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. Cancer*, 1998. **83**(8): p. 1664-78.
2. Gray-Schopfer, V., C. Wellbrock, and R. Marais, *Melanoma biology and new targeted therapy. Nature*, 2007. **445**(7130): p. 851-7.
3. Garbe, C., et al., *Treatment of melanoma. Dtsch Arztebl Int*, 2008. **105**(49): p. 845-51.
4. de Vries, E., et al., *Changing epidemiology of malignant cutaneous melanoma in Europe 1953-1997: rising trends in incidence and mortality but recent stabilizations in western Europe and decreases in Scandinavia. Int J Cancer*, 2003. **107**(1): p. 119-26.
5. Koster, B., et al., *Vacations to sunny destinations, sunburn, and intention to tan: a cross-sectional study in Denmark, 2007-2009. Scand J Public Health*, 2011. **39**(1): p. 64-9.
6. *Malignes Melanom der Haut*, in *Krebs in Deutschland 2017*. 2017, Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.: Berlin. p. 60-63.
7. Bradford, P.T., *Skin cancer in skin of color. Dermatol Nurs*, 2009. **21**(4): p. 170-7, 206; quiz 178.
8. Gemeinsamer Bundesausschuss, *Krebsfrüherkennungsrichtlinie Hautkrebs-Screening*, in *Bundesanzeiger 2007*, Bundesministerium für Gesundheit: Berlin.
9. Stadler, R., *Rettet Hautkrebs-Screening Leben?*, in *8th World Melanoma Congress 2013*: Hamburg.
10. Trotter, S.C., et al., *A Global Review of Melanoma Follow-up Guidelines. J Clin Aesthet Dermatol*, 2013. **6**(9): p. 18-26.
11. Krickler, A., et al., *Ambient UV, personal sun exposure and risk of multiple primary melanomas. Cancer Causes Control*, 2007. **18**(3): p. 295-304.
12. Dusza, S.W., et al., *Prospective study of sunburn and sun behavior patterns during adolescence. Pediatrics*, 2012. **129**(2): p. 309-17.
13. Miller, A.J. and M.C. Mihm, Jr., *Melanoma. N Engl J Med*, 2006. **355**(1): p. 51-65.
14. Fisher, D.E. and W.D. James, *Indoor tanning--science, behavior, and policy. N Engl J Med*, 2010. **363**(10): p. 901-3.
15. *Chemical agents and related occupations. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum*, 2012. **100**(Pt F): p. 9-562.
16. Bauer, J. and C. Garbe, *Acquired melanocytic nevi as risk factor for melanoma development. A comprehensive review of epidemiological data. Pigment Cell Res*, 2003. **16**(3): p. 297-306.
17. Chatzinasiou, F., et al., *Comprehensive field synopsis and systematic meta-analyses of genetic association studies in cutaneous melanoma. J Natl Cancer Inst*, 2011. **103**(16): p. 1227-35.

18. Bataille, V., *Melanoma. Shall we move away from the sun and focus more on embryogenesis, body weight and longevity?* Med Hypotheses, 2013.
19. Nikolaou, V. and A.J. Stratigos, *Emerging trends in the epidemiology of melanoma.* Br J Dermatol, 2013.
20. Clark, W.H., Jr., et al., *A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma.* Hum Pathol, 1984. **15**(12): p. 1147-65.
21. Kruger, S., et al., *Epidemiologic evidence for the role of melanocytic nevi as risk markers and direct precursors of cutaneous malignant melanoma. Results of a case control study in melanoma patients and nonmelanoma control subjects.* J Am Acad Dermatol, 1992. **26**(6): p. 920-6.
22. Skender-Kalnenas, T.M., D.R. English, and P.J. Heenan, *Benign melanocytic lesions: risk markers or precursors of cutaneous melanoma?* J Am Acad Dermatol, 1995. **33**(6): p. 1000-7.
23. Anand, P., et al., *Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes.* Pharm Res, 2008. **25**(9): p. 2097-116.
24. Olsen, J.H., S. Friis, and K. Frederiksen, *Malignant melanoma and other types of cancer preceding Parkinson disease.* Epidemiology, 2006. **17**(5): p. 582-7.
25. Bertoni, J.M., et al., *Increased melanoma risk in Parkinson disease: a prospective clinicopathological study.* Arch Neurol, 2010. **67**(3): p. 347-52.
26. Malumbres, M. and M. Barbacid, *To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer.* Nat Rev Cancer, 2001. **1**(3): p. 222-31.
27. Siegel, P.M. and J. Massague, *Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer.* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(11): p. 807-21.
28. Sieber, O.M., K. Heinemann, and I.P. Tomlinson, *Genomic instability--the engine of tumorigenesis?* Nat Rev Cancer, 2003. **3**(9): p. 701-8.
29. Fensterle, J., *[A trip through the signaling pathways of melanoma].* J Dtsch Dermatol Ges, 2006. **4**(3): p. 205-17.
30. Brown, J.M. and L.D. Attardi, *The role of apoptosis in cancer development and treatment response.* Nat Rev Cancer, 2005. **5**(3): p. 231-7.
31. Debatin, K.M., *Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy.* Cancer Immunol Immunother, 2004. **53**(3): p. 153-9.
32. Maser, R.S. and R.A. DePinho, *Connecting chromosomes, crisis, and cancer.* Science, 2002. **297**(5581): p. 565-9.
33. Carmeliet, P. and R.K. Jain, *Angiogenesis in cancer and other diseases.* Nature, 2000. **407**(6801): p. 249-57.
34. Bogenrieder, T. and M. Herlyn, *Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis.* Oncogene, 2003. **22**(42): p. 6524-36.
35. Braig, M. and C.A. Schmitt, *Oncogene-induced senescence: putting the brakes on tumor development.* Cancer Res, 2006. **66**(6): p. 2881-4.
36. Clark, W.H., Jr., et al., *The histogenesis and biologic behavior of primary human malignant melanomas of the skin.* Cancer Res, 1969. **29**(3): p. 705-27.

37. Clark, W.H., Jr., et al., *Model predicting survival in stage I melanoma based on tumor progression*. J Natl Cancer Inst, 1989. **81**(24): p. 1893-904.
38. Pflugfelder, A., et al., *Malignes melanom s3-leitlinie "diagnostik, therapie und nachsorge des melanoms"*. J Dtsch Dermatol Ges, 2013. **11 Suppl 6**: p. 1-126.
39. Homet, B. and A. Ribas, *New Drug Targets in Metastatic Melanoma*. J Pathol, 2013.
40. Davies, H., et al., *Mutations of the BRAF gene in human cancer*. Nature, 2002. **417**(6892): p. 949-54.
41. Kudchadkar, R.R., et al., *Targeted therapy in melanoma*. Clin Dermatol, 2013. **31**(2): p. 200-8.
42. Sawyers, C., *Targeted cancer therapy*. Nature, 2004. **432**(7015): p. 294-7.
43. Flaherty, K.T., U. Yasothan, and P. Kirkpatrick, *Vemurafenib*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(11): p. 811-2.
44. Joseph, E.W., et al., *The RAF inhibitor PLX4032 inhibits ERK signaling and tumor cell proliferation in a V600E BRAF-selective manner*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(33): p. 14903-8.
45. Chapman, P.B., et al., *Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation*. N Engl J Med, 2011. **364**(26): p. 2507-16.
46. Chapman, P.B., *Mechanisms of Resistance to RAF Inhibition in Melanomas Harboring a BRAF Mutation*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2013: p. 80-2.
47. Menzies, A.M., G.V. Long, and R. Murali, *Dabrafenib and its potential for the treatment of metastatic melanoma*. Drug Des Devel Ther, 2012. **6**: p. 391-405.
48. Sondak, V.K., et al., *Ipilimumab*. Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(6): p. 411-2.
49. Hodi, F.S., et al., *Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2010. **363**(8): p. 711-23.
50. Robert, C., et al., *Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma*. N Engl J Med, 2011. **364**(26): p. 2517-26.
51. Jang, S. and M.B. Atkins, *Which drug, and when, for patients with BRAF-mutant melanoma?* Lancet Oncol, 2013. **14**(2): p. e60-9.
52. Merelli, B., et al., *Targeting the PD1/PD-L1 axis in melanoma: Biological rationale, clinical challenges and opportunities*. Crit Rev Oncol Hematol, 2013.
53. Fourcade, J., et al., *PD-1 is a regulator of NY-ESO-1-specific CD8+ T cell expansion in melanoma patients*. J Immunol, 2009. **182**(9): p. 5240-9.
54. Dong, H., et al., *Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion*. Nat Med, 2002. **8**(8): p. 793-800.
55. Hino, R., et al., *Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma*. Cancer, 2010. **116**(7): p. 1757-66.
56. Blank, C., T.F. Gajewski, and A. Mackensen, *Interaction of PD-L1 on tumor cells with PD-1 on tumor-specific T cells as a mechanism of immune*

- evasion: implications for tumor immunotherapy. Cancer Immunol Immunother*, 2005. **54**(4): p. 307-14.
57. Reichert, J.M., *Which are the antibodies to watch in 2013?* *MAbs*, 2013. **5**(1): p. 1-4.
 58. Hamid, O., et al., *Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma.* *N Engl J Med*, 2013. **369**(2): p. 134-44.
 59. Sullivan, R.J., P.M. Lorusso, and K.T. Flaherty, *The intersection of immune-directed and molecularly targeted therapy in advanced melanoma: where we have been, are, and will be.* *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(19): p. 5283-91.
 60. Krepler, C. and D. Herlyn, *Highlights of Melanoma Research Presented at the 49th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO) in Chicago, 2013.* *Pigment Cell Melanoma Res*, 2013.
 61. Topalian, S.L., et al., *Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer.* *N Engl J Med*, 2012. **366**(26): p. 2443-54.
 62. Wolchok, J.D., et al., *Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma.* *N Engl J Med*, 2013. **369**(2): p. 122-33.
 63. Lewis, T.S., P.S. Shapiro, and N.G. Ahn, *Signal transduction through MAP kinase cascades.* *Adv Cancer Res*, 1998. **74**: p. 49-139.
 64. Sullivan, R.J. and K. Flaherty, *MAP kinase signaling and inhibition in melanoma.* *Oncogene*, 2013. **32**(19): p. 2373-9.
 65. Errede, B., et al., *Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways.* *Mol Reprod Dev*, 1995. **42**(4): p. 477-85.
 66. Dhillon, A.S., et al., *MAP kinase signalling pathways in cancer.* *Oncogene*, 2007. **26**(22): p. 3279-90.
 67. Crews, C.M., A. Alessandrini, and R.L. Erikson, *The primary structure of MEK, a protein kinase that phosphorylates the ERK gene product.* *Science*, 1992. **258**(5081): p. 478-80.
 68. Kyriakis, J.M., et al., *Raf-1 activates MAP kinase-kinase.* *Nature*, 1992. **358**(6385): p. 417-21.
 69. Dent, P., et al., *Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH 3T3 cells and in vitro.* *Science*, 1992. **257**(5075): p. 1404-7.
 70. Warne, P.H., P.R. Viciana, and J. Downward, *Direct interaction of Ras and the amino-terminal region of Raf-1 in vitro.* *Nature*, 1993. **364**(6435): p. 352-5.
 71. Leever, S.J., H.F. Paterson, and C.J. Marshall, *Requirement for Ras in Raf activation is overcome by targeting Raf to the plasma membrane.* *Nature*, 1994. **369**(6479): p. 411-4.
 72. Houben, R., et al., *Constitutive activation of the Ras-Raf signaling pathway in metastatic melanoma is associated with poor prognosis.* *J Carcinog*, 2004. **3**(1): p. 6.
 73. Gray-Schopfer, V.C., S. da Rocha Dias, and R. Marais, *The role of B-RAF in melanoma.* *Cancer Metastasis Rev*, 2005. **24**(1): p. 165-83.
 74. Pollock, P.M., et al., *High frequency of BRAF mutations in nevi.* *Nat Genet*, 2003. **33**(1): p. 19-20.
 75. Michaloglou, C., et al., *BRAFE600-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi.* *Nature*, 2005. **436**(7051): p. 720-4.

76. Lee, J.H., J.W. Choi, and Y.S. Kim, *Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis*. Br J Dermatol, 2011. **164**(4): p. 776-84.
77. Bucheit, A.D., et al., *Clinical characteristics and outcomes with specific BRAF and NRAS mutations in patients with metastatic melanoma*. Cancer, 2013.
78. Omholt, K., et al., *NRAS and BRAF mutations arise early during melanoma pathogenesis and are preserved throughout tumor progression*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(17): p. 6483-8.
79. Barbacid, M., *ras genes*. Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 779-827.
80. Platz, A., et al., *Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site*. Mol Oncol, 2008. **1**(4): p. 395-405.
81. Trahey, M. and F. McCormick, *A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants*. Science, 1987. **238**(4826): p. 542-5.
82. Albino, A.P., et al., *Analysis of ras oncogenes in malignant melanoma and precursor lesions: correlation of point mutations with differentiation phenotype*. Oncogene, 1989. **4**(11): p. 1363-74.
83. Kelleher, F.C. and G.A. McArthur, *Targeting NRAS in melanoma*. Cancer J, 2012. **18**(2): p. 132-6.
84. Tschandl, P., et al., *NRAS and BRAF mutations in melanoma-associated nevi and uninvolved nevi*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69639.
85. Bauer, J., et al., *Congenital melanocytic nevi frequently harbor NRAS mutations but no BRAF mutations*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(1): p. 179-82.
86. Jakob, J.A., et al., *NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma*. Cancer, 2012. **118**(16): p. 4014-23.
87. Mooi, W.J. and D.S. Peeper, *Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer*. N Engl J Med, 2006. **355**(10): p. 1037-46.
88. Hayflick, L. and P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Exp Cell Res, 1961. **25**: p. 585-621.
89. Giuliano, S., et al., *Advances in melanoma senescence and potential clinical application*. Pigment Cell Melanoma Res, 2011. **24**(2): p. 295-308.
90. Steinert, S., J.W. Shay, and W.E. Wright, *Transient expression of human telomerase extends the life span of normal human fibroblasts*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. **273**(3): p. 1095-8.
91. Dimri, G.P., et al., *A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(20): p. 9363-7.
92. Itahana, K., J. Campisi, and G.P. Dimri, *Methods to detect biomarkers of cellular senescence: the senescence-associated beta-galactosidase assay*. Methods Mol Biol, 2007. **371**: p. 21-31.
93. Lee, B.Y., et al., *Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase*. Aging Cell, 2006. **5**(2): p. 187-95.

94. Narita, M., et al., *Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence*. Cell, 2003. **113**(6): p. 703-16.
95. Lachner, M., et al., *Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins*. Nature, 2001. **410**(6824): p. 116-20.
96. Kamijo, T., et al., *Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF*. Cell, 1997. **91**(5): p. 649-59.
97. Sharpless, N.E., et al., *The differential impact of p16(INK4a) or p19(ARF) deficiency on cell growth and tumorigenesis*. Oncogene, 2004. **23**(2): p. 379-85.
98. Weinberg, R.A., *The retinoblastoma protein and cell cycle control*. Cell, 1995. **81**(3): p. 323-30.
99. Lim, S. and P. Kaldis, *Cdks, cyclins and CKIs: roles beyond cell cycle regulation*. Development, 2013. **140**(15): p. 3079-93.
100. Serrano, M., G.J. Hannon, and D. Beach, *A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4*. Nature, 1993. **366**(6456): p. 704-7.
101. Pomerantz, J., et al., *The Ink4a tumor suppressor gene product, p19Arf, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53*. Cell, 1998. **92**(6): p. 713-23.
102. Stott, F.J., et al., *The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2*. EMBO J, 1998. **17**(17): p. 5001-14.
103. Collado, M., et al., *Tumour biology: senescence in premalignant tumours*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 642.
104. Zhuang, D., et al., *C-MYC overexpression is required for continuous suppression of oncogene-induced senescence in melanoma cells*. Oncogene, 2008. **27**(52): p. 6623-34.
105. Ackermann, J., et al., *Metastasizing melanoma formation caused by expression of activated N-RasQ61K on an INK4a-deficient background*. Cancer Res, 2005. **65**(10): p. 4005-11.
106. Bardeesy, N., et al., *Dual inactivation of RB and p53 pathways in RAS-induced melanomas*. Mol Cell Biol, 2001. **21**(6): p. 2144-53.
107. Goel, V.K., et al., *Melanocytic nevus-like hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice*. Oncogene, 2009. **28**(23): p. 2289-98.
108. Gray-Schopfer, V.C., et al., *Cellular senescence in naevi and immortalisation in melanoma: a role for p16?* Br J Cancer, 2006. **95**(4): p. 496-505.
109. Braig, M., et al., *Oncogene-induced senescence as an initial barrier in lymphoma development*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 660-5.
110. Chen, Z., et al., *Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis*. Nature, 2005. **436**(7051): p. 725-30.
111. Bennett, D.C., *Human melanocyte senescence and melanoma susceptibility genes*. Oncogene, 2003. **22**(20): p. 3063-9.

112. Gruis, N.A., et al., *Homozygotes for CDKN2 (p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds*. Nat Genet, 1995. **10**(3): p. 351-3.
113. Wolfel, T., et al., *A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma*. Science, 1995. **269**(5228): p. 1281-4.
114. Rizos, H., Puig, S. Badenas, C. et al., *A melanoma-associated germline mutation in exon 1 beta inactivates p14ARF*. Oncogene, 2001. **20**: p. 5543-7.
115. Dannenberg, J.H., et al., *Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions*. Genes Dev, 2000. **14**(23): p. 3051-64.
116. Sage, J., et al., *Targeted disruption of the three Rb-related genes leads to loss of G(1) control and immortalization*. Genes Dev, 2000. **14**(23): p. 3037-50.
117. Tanaka, N., et al., *Cellular commitment to oncogene-induced transformation or apoptosis is dependent on the transcription factor IRF-1*. Cell, 1994. **77**(6): p. 829-39.
118. Rayess, H., M.B. Wang, and E.S. Srivatsan, *Cellular senescence and tumor suppressor gene p16*. Int J Cancer, 2012. **130**(8): p. 1715-25.
119. Vogt, M., et al., *Independent induction of senescence by p16INK4a and p21CIP1 in spontaneously immortalized human fibroblasts*. Cell Growth Differ, 1998. **9**(2): p. 139-46.
120. McConnell, B.B., et al., *Induced expression of p16(INK4a) inhibits both CDK4- and CDK2-associated kinase activity by reassortment of cyclin-CDK-inhibitor complexes*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(3): p. 1981-9.
121. Dai, C.Y. and G.H. Enders, *p16 INK4a can initiate an autonomous senescence program*. Oncogene, 2000. **19**(13): p. 1613-22.
122. Collado, M., M.A. Blasco, and M. Serrano, *Cellular senescence in cancer and aging*. Cell, 2007. **130**(2): p. 223-33.
123. Alcorta, D.A., et al., *Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(24): p. 13742-7.
124. LaPak, K.M. and C.E. Burd, *The molecular balancing act of p16(INK4a) in cancer and aging*. Mol Cancer Res, 2014. **12**(2): p. 167-83.
125. Quelle, D.E., et al., *Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest*. Cell, 1995. **83**(6): p. 993-1000.
126. Goldstein, A.M., et al., *Features associated with germline CDKN2A mutations: a GenoMEL study of melanoma-prone families from three continents*. J Med Genet, 2007. **44**(2): p. 99-106.
127. Bishop, D.T., et al., *Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma*. J Natl Cancer Inst, 2002. **94**(12): p. 894-903.
128. Rizos, H., et al., *Multiple abnormalities of the p16INK4a-pRb regulatory pathway in cultured melanoma cells*. Melanoma Res, 1999. **9**(1): p. 10-9.
129. Becker, T.M., et al., *The melanoma-associated 24 base pair duplication in p16INK4a is functionally impaired*. Int J Cancer, 2005. **117**(4): p. 569-73.

130. Kurz, D.J., et al., *Senescence-associated (beta)-galactosidase reflects an increase in lysosomal mass during replicative ageing of human endothelial cells*. J Cell Sci, 2000. **113 (Pt 20)**: p. 3613-22.
131. Matrai, J., M.K. Chuah, and T. VandenDriessche, *Recent advances in lentiviral vector development and applications*. Mol Ther, 2010. **18**(3): p. 477-90.
132. Coelen, R.J., D.G. Jose, and J.T. May, *The effect of hexadimethrine bromide (polybrene) on the infection of the primate retroviruses SSV 1/SSAV 1 and BaEV*. Arch Virol, 1983. **75**(4): p. 307-11.
133. Davis, H.E., J.R. Morgan, and M.L. Yarmush, *Polybrene increases retrovirus gene transfer efficiency by enhancing receptor-independent virus adsorption on target cell membranes*. Biophys Chem, 2002. **97**(2-3): p. 159-72.
134. Nasri, M., A. Karimi, and M. Allahbakhshian Farsani, *Production, purification and titration of a lentivirus-based vector for gene delivery purposes*. Cytotechnology, 2014.
135. Smith, P.K., et al., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*. Anal Biochem, 1985. **150**(1): p. 76-85.
136. Jamur, M.C. and C. Oliver, *Permeabilization of cell membranes*. Methods Mol Biol, 2010. **588**: p. 63-6.
137. Avwioro, G., *Histochemical uses of haematoxylin - A review*. JPCS, 2011. **1**: p. 24-34.
138. Brown, C.M. and K.D. Bidle, *Attenuation of virus production at high multiplicities of infection in Aureococcus anophagefferens*. Virology, 2014.
139. Scholzen, T. and J. Gerdes, *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. J Cell Physiol, 2000. **182**(3): p. 311-22.
140. Correia-Melo, C., D. Jurk, and J.F. Passos, *Robust multiparametric assessment of cellular senescence*. Methods Mol Biol, 2013. **965**: p. 409-19.
141. Serrano, M., et al., *Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a*. Cell, 1997. **88**(5): p. 593-602.
142. Jones, C.J., et al., *Evidence for a telomere-independent "clock" limiting RAS oncogene-driven proliferation of human thyroid epithelial cells*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(15): p. 5690-9.
143. Campisi, J., *Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors*. Cell, 2005. **120**(4): p. 513-22.
144. Petti, C., et al., *Coexpression of NRASQ61R and BRAFV600E in human melanoma cells activates senescence and increases susceptibility to cell-mediated cytotoxicity*. Cancer Res, 2006. **66**(13): p. 6503-11.
145. Funayama, R. and F. Ishikawa, *Cellular senescence and chromatin structure*. Chromosoma, 2007. **116**(5): p. 431-40.
146. Adams, P.D., *Remodeling of chromatin structure in senescent cells and its potential impact on tumor suppression and aging*. Gene, 2007. **397**(1-2): p. 84-93.

147. Ben-Porath, I. and R.A. Weinberg, *When cells get stressed: an integrative view of cellular senescence*. J Clin Invest, 2004. **113**(1): p. 8-13.
148. Campisi, J., *Aging, Cellular Senescence, and Cancer*. Annu Rev Physiol, 2012.
149. Haferkamp, S., et al., *Oncogene-induced senescence does not require the p16(INK4a) or p14ARF melanoma tumor suppressors*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(8): p. 1983-91.
150. Holland, E.A., et al., *Loss of heterozygosity and homozygous deletions on 9p21-22 in melanoma*. Oncogene, 1994. **9**(5): p. 1361-5.
151. Cristofalo, V.J., et al., *Replicative senescence: a critical review*. Mech Ageing Dev, 2004. **125**(10-11): p. 827-48.
152. Serrano, M. and M.A. Blasco, *Putting the stress on senescence*. Curr Opin Cell Biol, 2001. **13**(6): p. 748-53.
153. Jonsson, A., et al., *High frequency of p16(INK4A) promoter methylation in NRAS-mutated cutaneous melanoma*. J Invest Dermatol, 2010. **130**(12): p. 2809-17.
154. Campbell, S.L., et al., *Increasing complexity of Ras signaling*. Oncogene, 1998. **17**(11 Reviews): p. 1395-413.
155. Vojtek, A.B. and C.J. Der, *Increasing complexity of the Ras signaling pathway*. J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 19925-8.
156. Avruch, J., et al., *Ras activation of the Raf kinase: tyrosine kinase recruitment of the MAP kinase cascade*. Recent Prog Horm Res, 2001. **56**: p. 127-55.
157. Kolch, W., *Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions*. Biochem J, 2000. **351 Pt 2**: p. 289-305.
158. Rajalingam, K., et al., *Ras oncogenes and their downstream targets*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1177-95.
159. Wennerberg, K., K.L. Rossman, and C.J. Der, *The Ras superfamily at a glance*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 5): p. 843-6.
160. Downward, J., *Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(1): p. 11-22.
161. Eskandarpour, M., et al., *Oncogenic NRAS has multiple effects on the malignant phenotype of human melanoma cells cultured in vitro*. Int J Cancer, 2009. **124**(1): p. 16-26.
162. Leikam, C., et al., *Oncogene activation in melanocytes links reactive oxygen to multinucleated phenotype and senescence*. Oncogene, 2008. **27**(56): p. 7070-82.
163. Poynter, J.N., et al., *BRAF and NRAS mutations in melanoma and melanocytic nevi*. Melanoma Res, 2006. **16**(4): p. 267-73.
164. Zalaudek, I., et al., *The dermoscopic and histopathological patterns of nevi correlate with the frequency of BRAF mutations*. J Invest Dermatol, 2011. **131**(2): p. 542-5.
165. Marchetti, M.A., et al., *Melanocytic naevi with globular and reticular dermoscopic patterns display distinct BRAF V600E expression profiles and histopathological patterns*. Br J Dermatol, 2014. **171**(5): p. 1060-5.

166. Voß, M., *p16/INK4a controls the morphology program associated with cellular senescence*. 2005, Medizinische Universitätsklinik und Poliklinik Abteilung Innere Medizin I: Albert-Ludwigs-Universität Freiburg.
167. Beausejour, C.M., et al., *Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways*. *Embo j*, 2003. **22**(16): p. 4212-22.
168. Benanti, J.A. and D.A. Galloway, *Normal human fibroblasts are resistant to RAS-induced senescence*. *Mol Cell Biol*, 2004. **24**(7): p. 2842-52.
169. Lund, P., et al., *Oncogenic HRAS suppresses clusterin expression through promoter hypermethylation*. *Oncogene*, 2006. **25**(35): p. 4890-903.
170. Jiang, W., et al., *Clinically relevant genes and regulatory pathways associated with NRASQ61 mutations in melanoma through an integrative genomics approach*. *Oncotarget*, 2015. **6**(4): p. 2496-508.
171. Reifemberger, J., et al., *Frequent alterations of Ras signaling pathway genes in sporadic malignant melanomas*. *Int J Cancer*, 2004. **109**(3): p. 377-84.
172. De Luca, A., et al., *The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches*. *Expert Opin Ther Targets*, 2012. **16 Suppl 2**: p. S17-27.
173. Burotto, M., et al., *The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective*. *Cancer*, 2014. **120**(22): p. 3446-56.
174. Wajapeyee, N., et al., *Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7*. *Cell*, 2008. **132**(3): p. 363-74.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

München, den 09.01.2018

Larissa Joyce Mayer